

*ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS
INDUSTRIALES Y DE TELECOMUNICACIÓN*

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA



Trabajo Fin de Grado

***Optimización de Lab-on-Chip para el análisis de
fluorescencia en muestras líquidas***

Optimization of Lab-on-a-Chip for Fluorescence Analysis in Liquid Samples

Para acceder al Título de

Graduado en

Ingeniería de Tecnologías de Telecomunicación

Autora: Tairé Lanza Gutiez

Septiembre-2025

**GRADUADO EN INGENIERÍA DE TECNOLOGÍAS DE
TELECOMUNICACIÓN**

CALIFICACIÓN DEL TRABAJO FIN DE GRADO

Realizado por: Tairé Lanza Gutiez

Director del TFG: Luis Rodríguez Cobo, Celia Gomez Galdós

Título: “Optimización de Lab-on-Chip para el análisis de fluorescencia en muestras líquidas”

Title: “Optimization of Lab-on-a-Chip for Fluorescence Analysis in Liquid Samples”

Presentado a examen el día: 16 de septiembre de 2025

para acceder al Título de

**GRADUADO EN INGENIERÍA DE TECNOLOGÍAS DE
TELECOMUNICACIÓN**

Composición del Tribunal:

Presidente (Apellidos, Nombre): QUINTELA INCERA, MARIA ANGELES

Secretario (Apellidos, Nombre): FERNANDEZ FERNANDEZ, OSCAR

Vocal (Apellidos, Nombre): MIRAPEIX SERRANO, JESUS MARIA

Este Tribunal ha resuelto otorgar la calificación de:

Fdo: El Presidente

Fdo: El Secretario

Fdo: El Vocal

Fdo: El Director del TFG

(sólo si es distinto del Secretario)

Vº Bº del Subdirector

Trabajo Fin de Grado Nº

(a asignar por Secretaría)

Agradecimientos

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis tutores, Luis Rodríguez y Celia Gómez, por darme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo, por estar día a día acompañándome en el proceso y por transmitirme tanta ilusión y motivación.

A mi familia, por siempre estar. A mis padres, por su apoyo incondicional, su paciencia y el esfuerzo que han hecho para que pudiera llegar hasta aquí. Gracias por enseñarme el valor del esfuerzo y por acompañarme en cada paso de este camino.

A Irma y Llaguno, por ser mi motor y estar día a día conmigo durante estos cuatro años. Con vosotros todo ha sido más sencillo. De esta etapa me llevo no solo dos buenos compañeros, sino dos grandes amigos.

A Marian, mi referente, quien ha sido siempre un ejemplo tanto en lo académico como en lo personal. Gracias por confiar siempre en mí.

Y, en especial, este trabajo va para ti, abuelo. Por ser la persona que más orgulloso ha estado siempre de mí y por enseñarme lo bonito que es vivir, esforzarse y luchar por aquello que uno desea. Espero que, dondequiera que estés, puedas ver esto que tanto ansiabas: a tu nieta convirtiéndose en ingeniera.

Resumen

El presente Trabajo Fin de Grado aborda el diseño, fabricación, modelado, validación y simulación de un dispositivo *Lab-on-Chip (LoC)* destinado al análisis de fluorescencia en muestras líquidas, con el objetivo de contribuir al control de la calidad de agua mediante la detección de la fluorescencia emitida por cianobacterias. La estrategia seguida comienza con la revisión de los fundamentos teóricos de la fluorescencia, los sensores de fibra óptica y las técnicas de fabricación más relevantes para este tipo de dispositivos, como la impresión 3D y el grabado láser asistido por ataque químico (ULAE).

La metodología combina la aproximación experimental y la simulación. Por un lado, se procedió a la fabricación de un chip en un vidrio de sílice fundida mediante ULAE, integrado con fibras ópticas y montado en un soporte impreso en 3D de PLA, cuya función es aportar rigidez y estabilidad al sistema, sin contribuir a su comportamiento óptico. Con este prototipo, complementado con una fuente de excitación dispuesta a 90° respecto a la zona de la muestra y un espectrómetro como detector, se realizaron pruebas de fluorescencia en laboratorio. Estas permitieron validar el funcionamiento básico del sistema en diferentes configuraciones y, al mismo tiempo, identificar limitaciones relevantes. Por otro lado, de forma complementaria, se desarrolló un modelo del chip utilizando el software de simulación óptica Zemax OpticStudio, que permitió analizar la distribución de la luz en el interior de la muestra. A partir de estos resultados, se propuso una nueva geometría con el fin de optimizar la detección de la señal fluorescente.

En conjunto, este trabajo constituye un paso hacia el desarrollo de sensores ópticos miniaturizados para la monitorización ambiental, concretamente orientado a la detección de la fluorescencia emitida por cianobacterias, y sienta las bases para futuras mejoras dirigidas a aumentar la sensibilidad, la robustez y la versatilidad del diseño.

Palabras clave: Lab-on-Chip, fluorescencia, fibra óptica, Zemax, ULAE, microfluídica, cianobacterias, análisis de agua.

Abstract

This Final Degree Project addresses the design, fabrication, modeling, validation, and simulation of a Lab-on-Chip (LoC) device intended for fluorescence analysis in liquid samples, with the aim of contributing to water quality monitoring through the detection of fluorescence emitted by cyanobacteria. The approach begins with a review of the theoretical fundamentals of fluorescence, optical fiber sensors, and the most relevant fabrication techniques for this type of device, such as 3D printing and laser writing assisted by chemical etching (ULAE).

The methodology combines both experimental and simulation approaches. On the one hand, a chip was fabricated in fused silica glass using ULAE, integrated with optical fibers and mounted on a 3D-printed PLA holder, whose function is to provide rigidity and stability to the system without contributing to its optical behavior. With this prototype, complemented by an excitation source placed at 90° with respect to the sample region and a spectrometer as the detector, fluorescence tests were carried out in the laboratory. These tests allowed the validation of the basic operation of the system under different configurations and, at the same time, the identification of relevant limitations. On the other hand, as a complementary approach, a model of the chip was developed using the optical simulation software Zemax OpticStudio, which enabled the analysis of light distribution inside the sample. Based on these results, a new geometry was proposed in order to optimize the detection of the fluorescent signal.

Overall, this work represents a step forward in the development of miniaturized optical sensors for environmental monitoring, specifically aimed at detecting fluorescence emitted by cyanobacteria, and lays the groundwork for future improvements focused on increasing the sensitivity, robustness, and versatility of the design.

Keywords: Lab-on-Chip, fluorescence, optical fiber, Zemax, ULAE, microfluidics, cyanobacteria, water analysis.

Índice General

Agradecimientos.....	iv
Resumen	v
Abstract	vi
Índice General	vii
Índice de figuras	ix
Índice de tablas	xiii
Acrónimos	xiv
Capítulo 1: Introducción.....	1
1.1 Motivación: análisis de muestras líquidas	1
1.2 Fluorescencia como técnica de análisis	7
1.3 Plataformas de análisis: Off-Chip vs Lab-on-Chip	8
1.4 Fibra óptica: principios y aplicaciones	10
1.5 Estructura del trabajo.....	12
Capítulo 2: Marco Teórico	13
2.1 Espectroscopía de fluorescencia	13
2.2 Sensores de fibra óptica.....	16
2.3 Optimización geométrica en sistemas ópticos	21
2.4 Concepto Lab-On-Chip	24
2.5 Métodos de fabricación de Lab-on-Chip	25
Capítulo 3: Diseño del sistema	29
3.1 Placa y fibras ópticas	29
3.2 Fuente de luz y detector.....	31
3.3 Modelado del chip en Zemax	33
Capítulo 4: Metodología.....	41
4.1 Proceso de fabricación.....	41
4.2 Montaje del sistema óptico	47
4.3 Validación experimental	49
Capítulo 5: Resultados y análisis	52
5.1 Primera configuración	52
5.2 Segunda configuración	54
5.3 Dispositivo de referencia: LoC con pozo cuadrado	55
Capítulo 6: Limitaciones del sistema y análisis de causas	56

6.1 Baja fluorescencia detectada	56
6.2 Alineación manual.....	56
6.3 Posible daño en fibras ópticas	57
Capítulo 7: Conclusiones y líneas futuras	58
7.1 Conclusiones.....	58
7.2 Líneas Futuras.....	59
Anexo I: Resultados experimentales detallados	60
Anexo I.1) Primer día de medidas: prueba individual y total.....	60
Anexo I. 2) Segundo día de medidas: Medidas exhaustivas	62
Referencias	71

Índice de figuras

Figura 1: Esquema de una cromatografía en papel. La muestra se deposita sobre la fase estacionaria (papel), mientras que la fase móvil (disolvente) asciende por la fase estacionaria, arrastrando los distintos componentes según su afinidad, y permitiendo así su separación en los diferentes colores que componen la tinta inicial [4].	2
Figura 2: Esquema simplificado del funcionamiento de un espectrómetro de masas: la muestra se ioniza y vaporiza, los iones se aceleran y son desviados por un campo magnético según su relación masa/carga, generando un espectro con picos que indican la abundancia relativa de cada especie [5].	3
Figura 3: Esquema funcional de un dispositivo Lab-on-Chip (LoC). El diagrama muestra de forma general cómo entra la muestra en el chip, cómo se transporta y procesa en su interior mediante distintos módulos, y cómo finalmente se obtiene la señal de salida [7].	5
Figura 4: Representación conceptual de un sistema Lab-on-Chip (LoC), donde se ilustra de manera esquemática cómo integrar diversas funciones de laboratorio en un único dispositivo miniaturizado [17].	9
Figura 5: Esquema de niveles de energía que representa el proceso de fluorescencia. La molécula absorbe un electrón y transita del estado fundamental al estado excitado. Tras una relajación emite luz al volver al estado fundamental en forma de fotón [27].	14
Figura 6: Estructura básica de una fibra óptica. La propagación de la luz se mantiene dentro del núcleo gracias al fenómeno de reflexión interna total, que ocurre cuando el índice de refracción del núcleo (n_1) es mayor que el del recubrimiento (n_2), es decir, $n_1 > n_2$. La envoltura exterior proporciona protección mecánica a la fibra. [34].	16
Figura 7: Representación gráfica de la ley de Snell. Un rayo de luz incide sobre la superficie que separa dos medios con diferentes índices de refracción (n_1 y n_2), formando un ángulo de incidencia (θ_1) respecto a la normal. Al atravesar la superficie, el rayo se refracta formando un ángulo de refracción (θ_2) [35].	17
Figura 8: Ángulo de aceptación y apertura numérica (NA) en una fibra óptica. El cono de aceptación define el rango angular desde el cual la luz puede entrar en la fibra y mantenerse guiada en su interior. La apertura numérica depende de la diferencia entre los índices de refracción del núcleo (n_1) y del recubrimiento (n_2), determinando así la eficiencia de acoplamiento de luz en la fibra [36].	18
Figura 9: Comparativa del diámetro del núcleo en fibras ópticas. Las fibras multimodo tienen núcleos de mayor diámetro, lo que permite la propagación de varios modos de luz. En cambio, las fibras monomodo tienen núcleos mucho más estrechos, limitando la transmisión a un único modo para mayor alcance y precisión [38].	19
Figura 10: Propagación de la luz en fibras ópticas multimodo y monomodo. En la fibra multimodo, los rayos de luz recorren múltiples trayectorias internas, lo que provoca dispersión modal, es decir, un ensanchamiento del pulso óptico debido a la diferencia en los tiempos de propagación de cada modo. En la fibra monomodo, en cambio, la luz se transmite por un único modo, reduciendo este efecto y permitiendo enviar señales a mayores distancias con mayor fidelidad [Imagen generada con inteligencia artificial].	19
Figura 11: Tipos de fibras ópticas según el perfil de índice de refracción: multimodo de índice gradual (trayectorias curvas con menor dispersión), multimodo de índice escalonado	

(trayectorias rectas con mayor dispersión modal) y monomodo (único modo de propagación, ideal para largas distancias) [39].	20
Figura 12: Funcionamiento de una rejilla de Bragg en fibra óptica. La luz incide sobre el núcleo de la fibra óptica que contiene una rejilla de Bragg, una estructura periódica que refleja selectivamente una longitud de onda específica (espectro transmitido). La periodicidad de la rejilla determina la longitud de onda reflejada según la condición de Bragg, lo que permite su uso en aplicaciones como sensores y filtros ópticos [Imagen generada con inteligencia artificial].	20
Figura 13: Vista superior del chip y de la disposición de las fibras ópticas en el pozo, correspondiente al proyecto propuesto inicialmente por investigadores de la Universidad de Cantabria (UC) para la captura de señal fluorescente [30].	22
Figura 14: Vista superior del chip completo con las fibras alineadas mediante la estructura interna de vidrio, lo que favorece su correcta disposición y facilita la reproducibilidad entre medidas, aunque la estabilidad mecánica sigue siendo una limitación del diseño.	23
Figura 15: Esquema de una impresora 3D por inyección de material con curado mediante luz ultravioleta (UV). El cabezal de impresión deposita material del modelo y material de soporte sobre la plataforma de construcción, mientras las lámparas UV solidifican las capas de forma progresiva a lo largo de los ejes X, Y y Z [46].	26
Figura 16: Esquema del proceso de impresión 3D por estereolitografía (SLA). Un láser, controlado por galvanómetros, dirige un rayo sobre la resina líquida para solidificarla capa por capa. La pieza se forma progresivamente sobre la plataforma y el pistón, que descienden a medida que avanza la impresión [48].	26
Figura 17: Vista superior del chip con la representación esquemática de sus dimensiones globales (las dimensiones numéricas se especifican en la Tabla 4).	30
Figura 18: Vista lateral del chip. Se incluyen etiquetas cuyas dimensiones específicas se reconocen en las Tablas 5-6 .	30
Figura 19: Espectro de emisión del SuperLED rojo caracterizado experimentalmente. El pico máximo se localiza en 617.11 nm con un ancho de banda de 12.05 nm a -3 dB.	32
Figura 20: Curvatura de las fibras modelada en el diseño del sistema mediante elementos Torus Volume.	34
Figura 21: Vista general del sistema completo modelado en Zemax, mostrando la disposición espacial de las fibras y la fuente puntual, que permiten simular el comportamiento del diseño final.	34
Figura 23: Simulación en Zemax aplicando el principio de reversibilidad. Se muestran las posiciones de las cuatro fuentes puntuales empleadas, indicadas mediante segmentos perpendiculares a los canales de fibra (una de ellas resaltada en naranja). Los rayos generados forman una figura en estrella de cuatro brazos, que representa la región del pozo desde la cual la luz podría acoplarse a las fibras.	36
Figura 24: Aproximación geométrica de la región en forma de estrella obtenida en la simulación. La estrella se ha dividido en cuatro triángulos y un rectángulo central (en azul), cuyas áreas permiten estimar de manera sencilla la superficie total desde la cual la luz podría ser acoplada a las fibras.	36
Figura 22: Propagación de la luz en el interior de las fibras ópticas mediante la colocación de cuatro fuentes puntuales, una en cada fibra, para comprobar el guiado correcto hacia el detector.	37
Figura 25: Simulación en Zemax de la propagación de la fluorescencia emitida por las cianobacterias en el interior del pozo. Se representa la trayectoria de varios rayos	

generados en una fuente puntual colocada perpendicularmente al pozo y su detección en el punto de referencia A, situado en el borde lateral. El detector ocupa toda la altura del pozo (0,05 mm), permitiendo analizar la fracción de luz fluorescente que alcanza la pared lateral.	38
Figura 26: Configuración en Zemax del modelo Angle Scattering utilizado para simular la fluorescencia. Se fijó un trayecto medio de 0,1 mm para garantizar la interacción de los rayos dentro del pozo (0,5 mm de profundidad) y un ángulo de dispersión de 90°, reproduciendo el carácter isotrópico de la emisión fluorescente.	39
Figura 27: Distribución de la intensidad de luz simulada en el detector situado en el borde del pozo. El círculo negro marca la zona correspondiente al núcleo de la fibra, que es la única fracción de luz capaz de acoplarse y ser guiada hacia el espectrómetro. El recuadro superior amplía dicha región para visualizar con mayor detalle la señal detectada.	40
Figura 28: Figuras tomadas después de la inscripción y antes del etching (a) Reconstrucción del chip obtenida a partir de imágenes tomadas con el microscopio. Se aprecian los canales internos y la geometría general inscrita en el volumen del vidrio . (b) Fotografía del chip tomada con una cámara.	42
Figura 29: Figuras tomadas tras la etapa de pulido y antes del ataque químico (a) Reconstrucción a partir de fotografías microscópicas, con las etiquetas que identifican cada lateral. (b) Fotografía del chip real, donde también pueden observarse irregularidades en los laterales debidas a la pérdida de material durante el proceso de pulido.	43
Figura 30: (a) Imagen tomada con microscopio binocular que muestra la cavidad central del chip tras el ataque químico, con los cuatro canales completamente abiertos y verificados mediante la inserción de un desatascador para asegurar su continuidad. (b) Imagen reconstruida del chip tras completar todas las etapas del proceso de fabricación, incluyendo grabado láser, pulido y ataque químico. Se observa la apertura completa de los canales radiales observando la entrada de líquido en los mismos.	45
Figura 31: Imagen reconstruida del chip tras el proceso de grabado, pulido y ataque químico, donde se indican las dimensiones medidas de los canales y su disposición respecto al pozo central. Se aprecia la numeración asignada para cada segmento, utilizada posteriormente en la Tabla 8 de comparación.	46
Figura 32: Sistema completo montado sobre el soporte impreso en 3D.	47
Figura 33: Imágenes tomadas con microscopio binocular que muestran la inserción precisa de las cuatro fibras ópticas en los canales del chip. Se aprecia el acoplamiento correcto entre las fibras peladas y la cavidad central de análisis.	48
Figura 34: Vista superior del sistema montado sobre la estructura impresa en 3D, con las fibras ópticas fijadas e insertadas en el chip, listo para su conexión al espectrómetro.	49
Figura 35: Chip montado sobre el soporte de plástico, donde se aprecian las cuatro fibras ópticas fijadas con cinta adhesiva y numeradas del 1 al 4. Esta numeración se empleó posteriormente para identificar cada canal durante las medidas y facilitar el análisis comparativo de los resultados.	50
Figura 36: Espectros de emisión de fluorescencia normalizados obtenidos al medir con 1, 2, 3 y 4 fibras ópticas del LoC, acopladas conjuntamente a través de una misma aguja al espectrómetro. Se observa el pico dominante de la fuente de excitación (~617 nm) y un fondo ruidoso que dificulta discernir la fluorescencia en la zona ~650 nm.	53
Figura 37: Espectros de emisión de fluorescencia normalizados obtenidos con 1, 2, 3 y 4 fibras ópticas del LoC en la segunda configuración, con alineación individual frente a la rendija (slit) de entrada del espectrómetro. Se observa el pico estrecho de excitación en	

~617 nm y una elevación de la línea base alrededor de ~650 nm asociada a la fluorescencia. La visibilidad de esta emisión mejora al incrementar el número de fibras, alcanzando su máxima definición con cuatro fibras.	54
Figura 38: Espectros de emisión de fluorescencia normalizados obtenidos al medir con 1, 2 y 3 fibras ópticas del LoC de referencia (pozo cuadrado). En este caso, las medidas se adquirieron en condiciones de saturación del detector, lo que provoca el recorte del pico dominante de la fuente de excitación (~617 nm). A partir de ~640 nm se distingue la región de emisión, cuya visibilidad mejora al incrementar el número de fibras, mientras que el ruido aparente disminuye por efecto de la saturación.	55
Figura 39: Promedios espectrales obtenidos individualmente para cada fibra. a) Promedio espectral de la fibra 1. b) Promedio espectral de la fibra 2. c) Promedio espectral de la fibra 3. d) Promedio espectral de la fibra 4.	61
Figura 40: Promedio espectral obtenido al utilizar simultáneamente las cuatro fibras ópticas conectadas al espectrómetro. Se observa claramente el pico correspondiente a la fuente de excitación (LED rojo), así como una leve elevación del espectro en la zona próxima a 650 nm, indicativa de la fluorescencia emitida por las cianobacterias presentes en la muestra.	62
Figura 41: Espectros obtenidos para distintas combinaciones de fibras. [a] Espectro obtenidos con las fibras 1,2,4 [b] Espectro obtenidos con las fibras 2,4 [c] Espectro obtenido con la fibra 4.	64
Figura 42: Espectros obtenidos para distintas combinaciones de fibras. [a] Espectro obtenidos con las fibras 1,2,3 [b] Espectro obtenidos con las fibras 2,3 [c] Espectro obtenido con la fibra 2.	65
Figura 43: Espectros obtenidos para distintas combinaciones de fibras. [a] Espectro obtenidos con las fibras 2,3,4 [b] Espectro obtenidos con las fibras 3,4 [c] Espectro obtenido con la fibra 3.	66
Figura 44: Espectros obtenidos para distintas combinaciones de fibras. [a] Espectro obtenidos con las fibras 1,3,4 [b] Espectro obtenidos con las fibras 1,3 [c] Espectro obtenido con la fibra 1.	67
Figura 45: Espectro obtenidos con las fibras 1 y 2.	68
Figura 46: Espectro obtenidos con las cuatro fibras (1,2,3,4).	69
Figura 47: Espectros obtenidos con la disposición en línea de las fibras. [a] Fibras 1,2,3,4. [b] Fibras 1,3,4. [c] Fibras 1,4. [d] Fibra 1.	70

Índice de tablas

Tabla 1: Comparativa entre distintas técnicas de análisis de líquidos. Se resumen su funcionamiento básico, principales ventajas y limitaciones, destacando el papel del análisis óptico frente a los métodos tradicionales.	4
Tabla 2: Comparativa entre los términos μ TAS, LoC y dispositivos microfluídicos en cuanto a su grado de integración y funcionalidad.	10
Tabla 3: Longitudes de onda de excitación y emisión de algunos fluoróforos orgánicos comunes (Fluoresceína, Alexa Fluor y Cy).	15
Tabla 4: Dimensiones Globales (mm)	30
Tabla 5: Alturas (mm)	30
Tabla 6: Larguras (mm).....	30
Tabla 7: Comparativa de las dimensiones exteriores del chip antes y después del proceso de pulido. Se incluyen las longitudes de los cuatro lados y los ángulos entre ellos. Las medidas tras el pulido muestran desviaciones respecto al diseño teórico, manteniéndose inalteradas las dimensiones internas del pozo y los canales.	44
Tabla 8: Comparación de las dimensiones teóricas y las dimensiones reales del chip tras los procesos de pulido y etching. Se muestran las longitudes correspondientes a cada segmento (ver Figura 18), permitiendo analizar cómo se ha visto afectada la geometría final del dispositivo.	46

Acrónimos

LoC	<i>Lab-on-Chip</i>	Dispositivo microfluídico que integra procesos de laboratorio en un solo chip.
MIR	<i>Multiple Internal reflection</i>	Técnica óptica basada en múltiples reflexiones internas para aumentar la interacción luz-muestra.
μTAS	<i>Micro Total Analysis System</i>	Sistema microescala que realiza todo un análisis completo.
RTI	<i>Total Internal Reflection</i>	Principio óptico que mantiene la luz confinada mediante reflexión total en interfaces de distinto índice.
NA	<i>Numerical Aperture</i>	Parámetro que define el ángulo máximo de aceptación de luz en una fibra óptica.
PDMS	<i>Polidimetilsiloxano</i>	Polímero transparente y flexible usado en microchips.
FBG	<i>Fiber Bragg Grating</i>	Rejilla periódica en fibra que refleja selectivamente una longitud de onda para sensado.
ULAE	<i>Ultrafast Laser Assisted Etching</i>	Proceso de microfabricación en vidrio mediante láser de femtosegundos y ataque químico.
UV-Vis	<i>Ultravioleta-Visible</i>	Técnica que mide absorción de luz UV y visible.
UV	<i>Ultraviolet</i>	Rango del espectro electromagnético con longitudes de onda menores que la luz visible (10–400 nm).
MEMS	<i>Micro-Electro-Mechanical Systems</i>	Sistemas miniaturizados con partes mecánicas y eléctricas.
ICG	<i>Indocyanine Green</i>	Fluoróforo que emite en el infrarrojo cercano, usado en bioimagen y guiado quirúrgico.
SLA	<i>Stereolithography</i>	Técnica de impresión 3D que solidifica resina fotosensible capa a capa mediante un láser UV para crear microestructuras.

<i>HF</i>	<i>Hydrofluoric acid</i>	Reactivo químico que disuelve selectivamente vidrio en procesos de microfabricación como el ULAE.
<i>NaOH</i>	<i>Hidróxido de sodio</i>	Fórmula química de una base fuerte, comúnmente conocida como sosa cáustica, utilizada en laboratorio y en procesos industriales por su carácter corrosivo.
<i>LED</i>	<i>Light Emitting Diode</i>	Dispositivo semiconductor que emite luz cuando circula corriente eléctrica, usado como fuente de excitación en sistemas ópticos.
<i>PLA</i>	<i>Polylactic Acid</i>	Polímero biodegradable y termoplástico usado en impresión 3D, comúnmente empleado para fabricar soportes y prototipos.
<i>FDM</i>	<i>Fused Deposition Modeling</i>	Técnica de impresión 3D en la que un filamento termoplástico se funde y se deposita capa a capa para formar piezas.

Capítulo 1: Introducción

¿Alguna vez te has preguntado realmente qué contiene el agua que bebemos o los líquidos que utilizamos en la vida diaria? La respuesta no siempre es sencilla, y durante décadas ha requerido métodos complejos y laboriosos. Sin embargo, en los últimos años las técnicas ópticas se han consolidado como herramientas versátiles y eficaces para analizar líquidos con rapidez y precisión. Su integración en dispositivos miniaturizados, como los *Lab-on-Chip*, no solo facilita la monitorización de parámetros clave, sino que también abre la puerta a aplicaciones innovadoras en campos tan diversos como la salud, el medio ambiente o la industria. En este primer apartado se abordará con mayor detalle su importancia, así como las ventajas que ofrecen frente a los métodos tradicionales.

1.1 Motivación: análisis de muestras líquidas

A lo largo de la historia, analizar el entorno que nos rodea ha sido un hecho crucial para el desarrollo de la ciencia y la tecnología. Dicho entorno está compuesto por materia, que puede estar presente en sus tres estados fundamentales: sólido, líquido y gaseoso, aunque es el estado líquido el que aparece con más frecuencia en los procesos que sustentan la vida. De hecho, aproximadamente el 60–70 % de nuestro cuerpo es agua [1], y es en este medio donde ocurren múltiples reacciones y fenómenos físicos esenciales, como, por ejemplo, el transporte de oxígeno, sales y nutrientes a todas las células de nuestro cuerpo a través de sangre (compuesta en su mayoría por agua) [2]. Dada su gran presencia en nuestro día a día, es de vital importancia conocer más acerca de las características de este medio líquido, el agua.

Tener la capacidad de caracterizar las propiedades ópticas (como el índice de refracción, la fluorescencia...) y químicas (composición iónica, pH) del agua nos permite afrontar problemas reales que nos afectan en un amplio rango de campos como es la salud y el medio ambiente, con un impacto directo en nuestra calidad de vida. **Por ello, en este trabajo nos centraremos en la caracterización de muestras líquidas, y concretamente, propondremos herramientas ópticas capaces de analizar rápidamente la fluorescencia en volúmenes mínimos.**

Para poder obtener dichas propiedades, existen múltiples estrategias de análisis de líquidos. Entre ellas, la cromatografía, una técnica tradicional muy utilizada en ciencia e industria porque permite separar e identificar los diferentes componentes de una mezcla. Aunque existen distintos tipos (en papel, en capa fina, en columna o en gases), en este trabajo nos centramos en su aplicación al análisis de líquidos. El principio de funcionamiento consiste en hacer pasar la muestra por una fase móvil (un líquido que se desplaza) a través de una fase estacionaria (que permanece fija en un soporte). Según la afinidad de cada componente con una u otra fase, algunos avanzan más rápido y otros más despacio, lo que hace posible separarlos [3]. Sin embargo, a pesar de su sencillez, este método presenta

algunos inconvenientes. Las etapas de preparación complejas y los prolongados tiempos de análisis hacen de esta técnica un método ineficiente.

En la **Figura 1** se muestra de manera esquemática este proceso mediante cromatografía en papel, donde se aprecia cómo los diferentes compuestos ascienden a distinta velocidad y terminan distribuyéndose en franjas separadas.

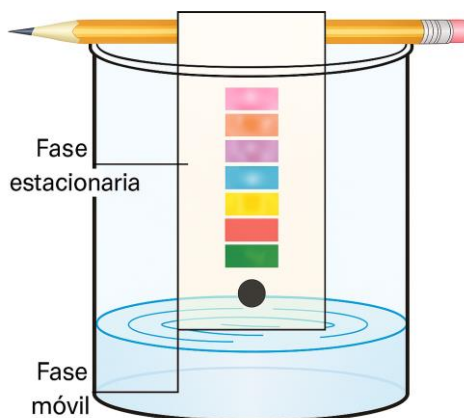


Figura 1: Esquema de una cromatografía en papel. La muestra se deposita sobre la fase estacionaria (papel), mientras que la fase móvil (disolvente) asciende por la fase estacionaria, arrastrando los distintos componentes según su afinidad, y permitiendo así su separación en los diferentes colores que componen la tinta inicial [4].

Otra técnica tradicional es la espectroscopía de masas, que se utiliza para identificar qué compuestos forman una muestra. El procedimiento consiste en ionizar las moléculas, es decir, darles carga eléctrica para poder manipularlas. Una vez cargadas, se separan en función de su relación masa/carga: esto significa que no se mide directamente su peso, sino cómo se comportan al moverse en un campo eléctrico o magnético según lo grandes que sean (masa) y la cantidad de carga que tengan. De esta manera, moléculas más ligeras o con más carga se desvían de forma distinta que las más pesadas o con menos carga, como podemos ver en la **Figura 2**. En nuestro caso, como trabajamos con muestras líquidas, es necesaria una fase previa que convierta esas moléculas en iones en fase gaseosa para que puedan ser analizadas correctamente dentro del espectrómetro. El resultado se representa en un espectro de masas, un gráfico compuesto por picos: cada pico corresponde a un compuesto de la muestra, y la altura de ese pico indica en qué cantidad está presente. Gracias a esto, la técnica permite no solo saber qué sustancias hay, sino también compararlas en función de su abundancia.

Espectrometría de masas

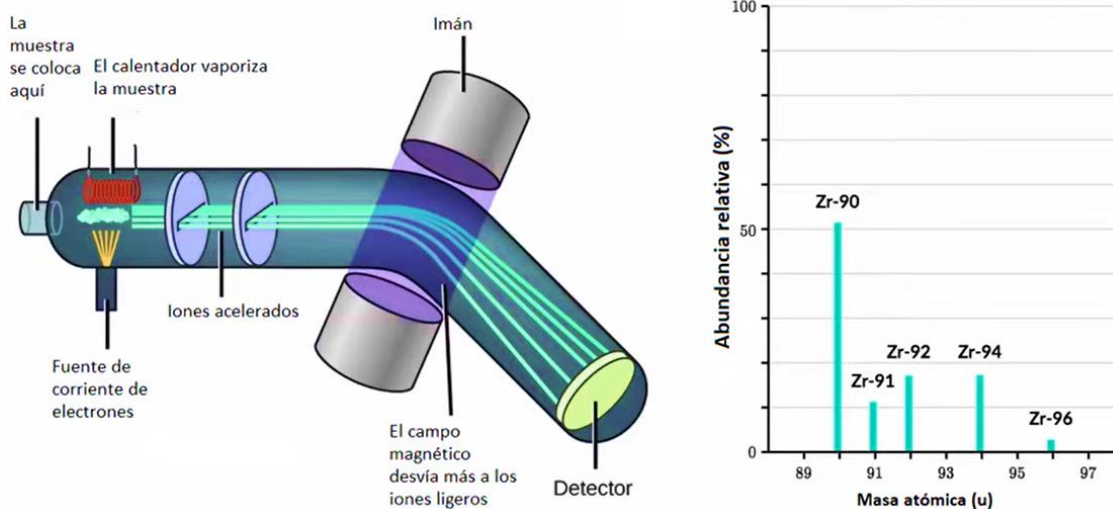


Figura 2: Esquema simplificado del funcionamiento de un espectrómetro de masas: la muestra se ioniza y vaporiza, los iones se aceleran y son desviados por un campo magnético según su relación masa/carga, generando un espectro con picos que indican la abundancia relativa de cada especie [5].

Pese a que la espectrometría de masas destaca por su gran sensibilidad y precisión, capaz de identificar compuestos incluso en mezclas muy complejas con cantidades mínimas de muestra, presenta también inconvenientes: requiere equipos costosos, una preparación previa de las muestras, en nuestro caso, biológicas mediante digestión (proceso químico en el que la muestra se descompone usando ácidos o calor para poder ser analizada), y un análisis especializado de los espectros, que puede resultar complejo.

Frente a estas limitaciones que presentan los métodos tradicionales, las técnicas ópticas han demostrado ser especialmente valiosas. Permiten medir propiedades como el índice de refracción, la absorbancia (cantidad de luz que una sustancia es capaz de absorber), la dispersión (cómo la luz se desvía al atravesar la muestra) y, en particular, la fluorescencia, un fenómeno mediante el cual ciertas moléculas emiten luz tras haber absorbido energía, normalmente en forma de radiación ultravioleta o visible, con un pequeño retardo temporal de apenas nanosegundos. Todo ello sin alterar la composición química de la muestra. Esta característica no destructiva resulta clave cuando se requiere conservar intacta la muestra original.

Veamos en la **Tabla 1** un pequeño resumen de las diferentes técnicas tradicionales frente a las técnicas ópticas.

Técnica	Principio de funcionamiento	Ventajas	Limitaciones
Cromatografía	Separación de componentes en una mezcla mediante dos fases: una móvil (disolvente) y una estacionaria (papel o resina).	-Buena para muestras complejas. -Aplicable a líquidos y gases. -Alta resolución (distingue componentes muy similares).	-Tiempo de análisis largos. -En algunos casos equipos costosos. -Requiere un ajuste cuidadoso de las condiciones (fase móvil, fase estacionaria, temperatura).
Espectrometría de masas	Analiza los componentes tras descomponer la muestra químicamente	-Muy precisa y detallada	-Costosa. -Lenta. -Requiere proceso de digestión.
Técnicas ópticas	Analiza cómo se comporta la luz al pasar por la muestra (fluorescencia, etc.)	-Rápidas -No destructivas -Aplicables en tiempo real	-A veces requieren alineación cuidadosa. -Control de interferencias.

Tabla 1: Comparativa entre distintas técnicas de análisis de líquidos. Se recoge el principio de funcionamiento, así como las principales ventajas y limitaciones de la cromatografía, la espectrometría de masas y las técnicas ópticas, destacando cómo estas últimas ofrecen rapidez y aplicabilidad en tiempo real frente a métodos más tradicionales.

Las ventajas que presentan las técnicas ópticas frente a otros métodos tradicionales de análisis de líquidos, como se resume en la **Tabla 1**, han favorecido su integración en plataformas miniaturizadas, como los dispositivos *Lab-on-Chip*. Estos dispositivos consisten en sistemas a microescala que integran canales microfluídicos y diferentes unidades funcionales dentro de un mismo chip, permitiendo realizar análisis completos con pequeñas cantidades de muestra y bajo consumo de reactivos. La **Figura 3** muestra un esquema funcional típico de un dispositivo LoC, con sus principales bloques de operación. Cuando a esta infraestructura microfluídica se le añaden componentes ópticos capaces de guiar y/o detectar luz, se habla de sistemas optofluídicos, los cuales permiten realizar análisis completos en volúmenes mínimos con espectroscopía integrada [6].

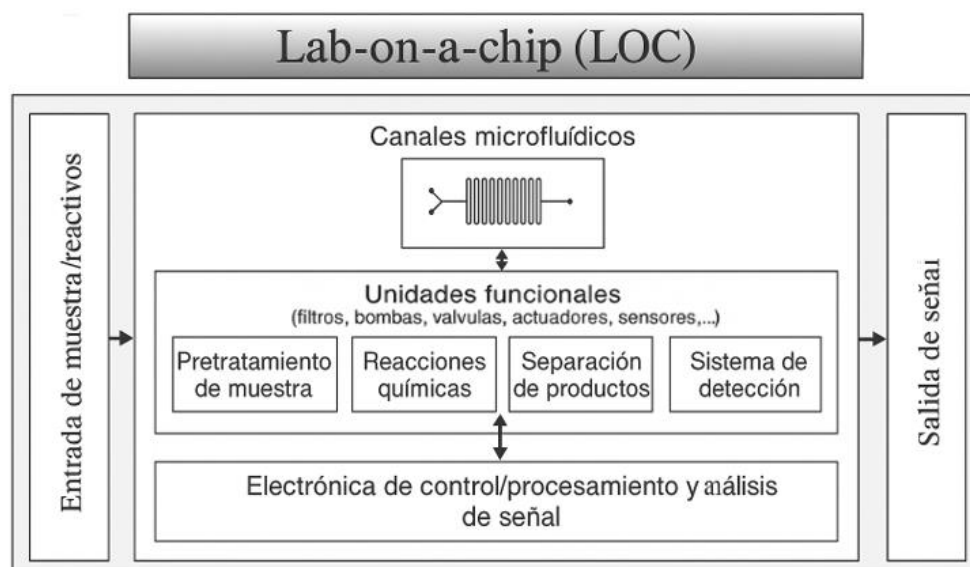


Figura 3: Esquema funcional de un dispositivo *Lab-on-Chip* (LoC). El diagrama muestra de forma general cómo entra la muestra en el chip, cómo se transporta y procesa en su interior mediante distintos módulos, y cómo finalmente se obtiene la señal de salida [7].

Las técnicas ópticas resultan de gran utilidad en campos tan diversos como el bioanálisis, la monitorización ambiental, y las industrias farmacéutica y alimentaria.

En el ámbito del bioanálisis, por ejemplo, permiten detectar biomarcadores: moléculas presentes en fluidos corporales como la sangre o la saliva, cuyo aumento o disminución puede alertar de alteraciones fisiológicas antes de que se manifiesten síntomas visibles. Esta capacidad de detección temprana favorece un diagnóstico más rápido y eficaz, lo que a menudo reduce los tiempos de tratamiento y mejora el pronóstico clínico [8].

Un ejemplo representativo de esta tecnología es un dispositivo LoC optofluídico diseñado para integrar canales de fluidos a escala microscópica con elementos ópticos en un solo chip. Este sistema emplea el principio de reflexión interna múltiple (MIR) para guiar la luz eficientemente a través de su estructura, mejorando la sensibilidad del análisis. Gracias a esta configuración, es capaz de detectar fluoresceína (un compuesto fluorescente comúnmente utilizado como marcador en bioanálisis por su bajo coste y elevada sensibilidad) a concentraciones tan bajas como 8 nM [9]. Todo ello se consigue en cuestión de segundos y sin necesidad de añadir reactivos complejos adicionales.

En la industria farmacéutica y alimentaria, el análisis óptico de líquidos es clave para asegurar que los productos cumplan con los estándares de calidad y seguridad exigidos. Esto se logra, en muchos casos, mediante técnicas ópticas en línea, que permiten monitorizar la muestra durante el proceso de producción sin interrumpirlo. Una de las más comunes es la espectroscopía UV-Vis, que mide la cantidad de luz absorbida en las regiones ultravioleta y visible del espectro, permitiendo cuantificar principios activos o verificar la pureza del producto.

Además, técnicas como la fluorescencia se emplean para detectar impurezas o cambios en la composición. Estas mediciones, rápidas y no invasivas, optimizan la eficiencia del proceso y aseguran un control de calidad más fiable y automatizado [10] [11].

Asimismo, en el ámbito medioambiental, las técnicas ópticas permiten monitorizar continuamente la calidad del agua y detectar contaminantes antes de que alcancen niveles peligrosos. Al tratarse de métodos no invasivos y sin contacto, los sensores ópticos pueden instalarse de forma permanente en cauces naturales y emitir alertas en tiempo real ante cualquier variación significativa [12]. Estos dispositivos miden parámetros como la absorbancia en longitudes de onda específicas, asociadas a la presencia de metales pesados o al aumento de turbidez por materia orgánica. Cuando los valores medidos superan ciertos umbrales preestablecidos, el sistema activa alarmas automáticas (como señales visuales o notificaciones digitales), que permiten una intervención rápida para evitar daños ambientales o riesgos para la salud pública.

Dada la relevancia de las técnicas ópticas en múltiples sectores, resulta evidente la necesidad de trasladar estas capacidades analíticas fuera del laboratorio, directamente al entorno de trabajo. Esto es especialmente útil en situaciones críticas como urgencias médicas, zonas remotas o entornos naturales como el cauce de un río, donde se requiere obtener resultados casi en tiempo real, sin depender de infraestructuras voluminosas ni de personal especializado. Además, la vigilancia continua de parámetros críticos (por ejemplo, la concentración de cianobacterias en embalses, cuya proliferación puede liberar toxinas nocivas, o la concentración de un fármaco en sangre durante una intervención) exige un nivel de automatización y fiabilidad difícil de alcanzar con equipos convencionales. En este contexto, los sistemas ópticos destacan por su gran versatilidad, ya que permiten integrarse en dispositivos compactos, móviles y de bajo coste, capaces de operar de forma autónoma con una mínima intervención humana.

Medir con precisión las propiedades ópticas de los líquidos no es solo una cuestión teórica, sino una herramienta clave con aplicaciones directas y necesarias. Estas incluyen desde el traslado del laboratorio al entorno real (como en zonas remotas, contextos clínicos o fábricas), hasta la detección precoz de biomarcadores, el control de calidad de fármacos y alimentos, o la vigilancia continua de la calidad del agua. La combinación de fotónica y microfluídica en dispositivos compactos y accesibles permite no solo abaratar y acelerar los análisis, sino también llevar la tecnología a contextos donde la inmediatez y la fiabilidad son decisivas.

Este trabajo toma como reto precisamente eso: diseñar y validar un Lab-on-Chip óptico capaz de trasladar la precisión de un gran laboratorio al mundo real, comenzando por el agua —nuestro recurso más vital— como primer gran escenario de aplicación.

1.2 Fluorescencia como técnica de análisis

Hasta ahora hemos revisado algunos ejemplos de cómo la óptica puede emplearse en el análisis de líquidos en distintos ámbitos. Uno de los fenómenos más utilizados en dichos métodos de análisis es la fluorescencia.

La fluorescencia es un fenómeno óptico, en concreto es un tipo particular de luminiscencia. Este proceso consiste en que ciertas sustancias, tras absorber luz de una determinada longitud de onda, emiten luz a una longitud de onda mayor. Es importante destacar que para que una sustancia sea fluorescente tiene que ser capaz de absorber energía en forma de radiación electromagnética y después emitir parte de esa energía en una longitud de onda diferente, en este caso, mayor. Este proceso ocurre de manera prácticamente instantánea y es muy utilizado en el análisis de muestras ya que tiene una alta especificidad y sensibilidad [13].

De este fenómeno óptico es importante destacar su alta sensibilidad, entendida como la capacidad para detectar compuestos presentes en concentraciones muy bajas. Esta es una de las principales ventajas de la fluorescencia, ya que permite analizar cantidades mínimas de sustancias en muestras complejas. En nuestro caso, aprovechamos los pigmentos fotosintéticos de las cianobacterias (clorofilas y ficobiliproteínas) como analito, una sustancia específica cuya presencia se desea medir, ya que emiten una fluorescencia intensa y específica. Estos pigmentos actúan como fluoróforos naturales, es decir, moléculas capaces de absorber luz a una determinada longitud de onda y emitir inmediatamente parte de esa energía en una longitud de onda mayor. Como resultado de esto, liberan una señal luminosa que destaca incluso en muestras de agua muy complejas. Así, se plantea la posibilidad de detectar con precisión la presencia de cianobacterias y, en consecuencia, evaluar la calidad del agua de forma rápida y confiable.

Además, estas ventajas de la fluorescencia pueden ampliarse cuando se combinan con tecnologías como los Lab-on-Chip. Estas miniaturizadas “fábricas de análisis” concentran en un solo chip todas las etapas del ensayo, reduciendo drásticamente tiempos, costos y volúmenes de muestra. Más adelante detallaremos en qué consisten exactamente estos dispositivos y cómo permiten aprovechar al máximo la sensibilidad y rapidez de los métodos fluorescentes.

1.3 Plataformas de análisis: Off-Chip vs Lab-on-Chip

Los sistemas *Off-Chip* representan el enfoque más tradicional en el análisis de muestras. En este tipo de plataformas, las etapas de preparación, reacción y detección se llevan a cabo de manera independiente, utilizando equipos distintos para cada una de ellas. Este tipo de configuración requiere el uso de instrumentos generalmente voluminosos, costosos y no integrados entre sí, lo que implica mayor ocupación de espacio y recursos. Por ejemplo, en espectroscopía de fluorescencia convencional, se prepara la muestra en una cubeta, se introduce en un espectrómetro de bancada (instrumento de sobremesa que permite analizar muestras mediante la detección de luz emitida o absorbida) y, si es necesario, se analiza posteriormente con un microscopio óptico equipado con un detector externo [14] [15]. Aunque este enfoque ofrece una gran flexibilidad en el tipo de muestras que acepta y proporciona al sistema gran versatilidad para adaptarse a distintos sistemas de análisis, que puede aceptar, así como una elevada exactitud, también presenta importantes limitaciones operativas que afectan a su eficiencia y aplicabilidad fuera del laboratorio.

Una de las limitaciones más destacadas de los sistemas *Off-Chip* es la necesidad de realizar múltiples transferencias manuales entre instrumentos. Al no estar los procesos integrados, el usuario debe manipular físicamente la muestra en cada etapa, lo que no solo añade tiempo, sino que incrementa el riesgo de contaminación, errores de manipulación o incluso pérdida del analito, especialmente cuando se trabaja con volúmenes pequeños. Además, cada traslado implica limpiar y preparar nuevos recipientes, lo que multiplica los recursos necesarios.

Otra limitación evidente es su baja portabilidad. Estos sistemas solo pueden utilizarse en entornos de laboratorio, dado su tamaño y dependencia de condiciones controladas, lo que impide realizar análisis *in situ*. Esto obliga a trasladar las muestras, con el consiguiente riesgo de deterioro y pérdida de fiabilidad en los resultados.

Por otro lado, la fuerte dependencia del operador también afecta a la fiabilidad de los resultados. La intervención humana genera variabilidad entre análisis, exige formación especializada y está sujeta a errores. De hecho, se ha estimado que hasta un 39 % de los errores en procedimientos analíticos se deben directamente a fallos humanos, como errores en la preparación de muestras (16 %), introducción de datos (13 %) o en cálculos y diluciones (10 %) [16].

Todas estas limitaciones han impulsado la evolución hacia sistemas más compactos, automatizados y portátiles, como los *Lab-on-Chip*, que tratan de resolver estos inconvenientes mediante la integración de funciones en un único dispositivo.

Los LoC son dispositivos miniaturizados que integran en un solo chip una o varias de las etapas de un análisis químico o bioquímico (desde la manipulación de la muestra hasta su detección), reproduciendo en un espacio reducido algunas de las funciones básicas de un laboratorio completo. Esta integración aporta una serie de ventajas clave frente a los métodos convencionales:

- **Miniaturización:** reduce drásticamente el tamaño del sistema, lo que permite usar bajos volúmenes de muestra, ahorrar reactivos y generar menos residuos.

- **Agrupación:** al integrar todos los procesos en un único dispositivo, se logra una mayor automatización, reducción del error humano y mejora en la reproducibilidad de los resultados.
- **Portabilidad:** su diseño compacto facilita el uso *in situ* y en entornos descentralizados, entendidos como aquellos fuera del laboratorio convencional, como centros de salud rurales, puntos de control ambiental o situaciones de emergencia.

Gracias a estas propiedades, los LoC se han convertido en una herramienta clave para aplicaciones que requieren resultados inmediatos (como el diagnóstico médico o el control ambiental), tal y como se ilustra en la **Figura 4**, que representa de forma conceptual la integración de todas las fases de un laboratorio en un solo chip.

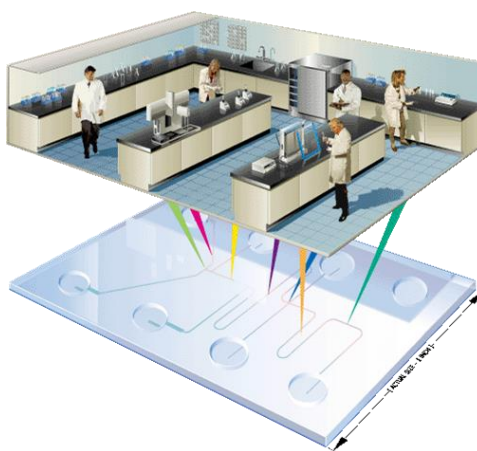


Figura 4: Representación conceptual de un sistema Lab-on-Chip (LoC), donde se ilustra de manera esquemática cómo integrar diversas funciones de laboratorio en un único dispositivo miniaturizado [17].

El desarrollo de los dispositivos microfluídicos ha permitido manipular y controlar pequeños volúmenes de líquido a través de canales microscópicos, constituyendo la base física de la mayoría de las plataformas actuales. A partir de esta tecnología surgieron los dispositivos *Lab-on-Chip* (LoC), que representan un término más general para describir cualquier sistema miniaturizado capaz de realizar una o varias etapas de un análisis en un único chip. Finalmente, los *Micro Total Analysis Systems* (μ TAS) constituyen una evolución más compleja de los LoC, ya que hacen referencia a sistemas totalmente integrados a microescala que replican todas las funciones de un laboratorio en un solo dispositivo, desde la preparación de la muestra hasta la detección y análisis de los resultados [18].

Dispositivos microfluídicos	<i>Lab-on-Chip</i> (LoC)	<i>Micro Total Analysis Systems</i> (μ TAS)
Estructuras que manipulan y controlan pequeños volúmenes de líquido mediante canales a microescala	Término general para sistemas miniaturizados capaces de realizar una o varias etapas del análisis	Son sistemas totalmente integrados , replican todas las funciones de un laboratorio

Tabla 2: Comparativa entre los términos dispositivos microfluídicos, LoC y μ TAS en cuanto a su grado de integración y funcionalidad.

La optofluídica combina microfluídica y óptica para guiar y detectar luz directamente dentro del chip, lo que permite mejorar la eficiencia y reducir el tamaño de los sistemas de lectura. Esta tecnología resulta clave en la integración de sensores dentro de plataformas compactas como los *Lab-on-Chip* [19]. Por otro lado, los *Optical MEMS* (*Optical Micro-Electro-Mechanical*) incorporan componentes ópticos móviles a escala micrométrica, como espejos o microlentes [20].

En conjunto, todas estas tecnologías confluyen en una misma dirección: la de hacer el análisis más rápido, más accesible y eficiente. Los LoC no solo heredan lo mejor de la microfluídica y la óptica, sino que también permiten romper con las limitaciones de los sistemas analíticos tradicionales. En el contexto de este trabajo, su relevancia radica en ofrecer una plataforma ideal para integrar técnicas espectroscópicas avanzadas en espacios reducidos, permitiendo analizar muestras líquidas con alta sensibilidad, rapidez y en condiciones más versátiles. Por ello, comprender su fundamento y evolución resulta esencial para valorar su potencial como solución tecnológica en el campo de los sensores ópticos.

1.4 Fibra óptica: principios y aplicaciones

En el desarrollo de sistemas ópticos integrados dentro de plataformas miniaturizadas, como es el caso de ciertos dispositivos *Lab-on-Chip* optofluídicos, es fundamental contar con elementos capaces de guiar la luz de forma eficiente, precisa y controlada. En este contexto, la fibra óptica se ha consolidado como una tecnología clave, no solo por su capacidad para transportar señales luminosas, sino también por su potencial como componente de detección en sistemas miniaturizados.

La fibra óptica es un filamento delgado y flexible, fabricado habitualmente en vidrio o plástico, que permite guiar la luz a lo largo de su interior con mínimas pérdidas. Su funcionamiento se basa en el fenómeno de la reflexión interna total: cuando se cumplen las condiciones adecuadas de índice de refracción y ángulo de incidencia, la luz no se refracta hacia el exterior, sino que se refleja completamente dentro de la fibra, quedando confinada en su interior y propagándose de forma eficiente a lo largo de la misma. Una explicación más detallada de este principio se desarrollará en el apartado **2.2 Sensores de fibra óptica** [21].

Las principales ventajas de la fibra óptica incluyen su alta eficiencia de transmisión, resistencia a interferencias electromagnéticas, ligereza y la posibilidad de integrarse fácilmente en sistemas compactos y complejos. No obstante, también presenta ciertas limitaciones, como su fragilidad mecánica (especialmente en las versiones de vidrio), los costes asociados al acoplamiento preciso de luz y su sensibilidad a curvaturas pronunciadas, que pueden provocar pérdidas de señal [22].

Las aplicaciones de la fibra óptica abarcan desde las telecomunicaciones y la instrumentación médica, hasta el desarrollo de sensores ópticos para entornos industriales, biomédicos y medioambientales, siendo este último el ámbito de interés de este trabajo [23]. Estos sensores emplean la luz como medio de detección, midiendo cómo varía sus propiedades (como intensidad, fase o longitud de onda) al atravesar un medio o al reflejarse en él, en función de parámetros físicos o químicos como temperatura, presión, índice de refracción o composición. Los sensores pueden clasificarse como pasivos o activos: los primeros detectan cambios en una señal de luz externa que pasa a través del sensor, mientras que los segundos emiten su propia señal de luz y analizan cómo esta se ve modificada al interactuar con el entorno.

En el marco de este proyecto, se utilizará la fibra óptica como componente sensor en un dispositivo *Lab-on-Chip*, en este caso, con el objetivo de detectar la fluorescencia natural emitida por cianobacterias en muestras de agua. Esto permitirá realizar un análisis rápido de la presencia de cianobacterias, sensible y con un volumen mínimo de muestra, adecuado para sistemas portátiles y de bajo coste.

1.5 Estructura del trabajo

Con el objetivo de facilitar la comprensión del desarrollo, este Trabajo Fin de Grado se organiza en siete capítulos principales, además del anexo y las referencias finales. La memoria se ha planteado con una estructura progresiva, que parte de los fundamentos teóricos y del contexto general, para después centrarse en el diseño y modelado del chip, continuar con la parte experimental y, finalmente, exponer los resultados, conclusiones y posibles líneas de mejora. A continuación, se presenta la estructura del documento:

- **El Capítulo 1** introduce el contexto general del estudio, destacando la motivación, la relevancia de las técnicas ópticas para el análisis de líquidos y el potencial de los dispositivos Lab-on-Chip como plataforma de integración.
- **El Capítulo 2** expone los fundamentos teóricos necesarios, incluyendo la fluorescencia, los sensores de fibra óptica, la optimización geométrica en sistemas ópticos, concepto de LoC y algunos métodos de fabricación aplicables a chips microfluídicos.
- **El Capítulo 3** describe el diseño del sistema propuesto, detallando la geometría del chip, las fibras ópticas utilizadas, la fuente de luz y el modelado óptico en Zemax.
- **El Capítulo 4** presenta la metodología experimental, desde los procesos de fabricación del chip hasta el montaje del sistema y la validación en laboratorio.
- **El Capítulo 5** recoge los resultados obtenidos y su análisis, con especial atención al procesamiento de la señal óptica y a la evaluación de distintos métodos de acoplamiento.
- **El Capítulo 6** aborda los problemas encontrados, discutiendo sus posibles causas y planteando hipótesis que permiten comprender mejor las limitaciones observadas.
- **El Capítulo 7** expone las conclusiones generales del trabajo, junto con posibles líneas futuras orientadas a mejorar la sensibilidad, la robustez y la aplicabilidad del sistema, especialmente en el ámbito de la monitorización medioambiental.

Finalmente, se incluyen las referencias bibliográficas empleadas y un anexo, en el que se recopila material complementario, como un análisis más detallado de los resultados experimentales y otros contenidos de apoyo que, sin ser imprescindibles para seguir el desarrollo del trabajo, pueden resultar útiles para profundizar en algunos aspectos.

Capítulo 2: Marco Teórico

En esta sección se exponen los fundamentos teóricos que sustentan el desarrollo del dispositivo que se plantea en este trabajo, abordando desde las bases físicas de la fluorescencia hasta las tecnologías de fabricación que hacen posible su implementación en formato *Lab-on-Chip*.

En primer lugar, en la sección 2.1 se describe el fenómeno físico de la fluorescencia, explicando los procesos de excitación y emisión de luz, así como los parámetros que la caracterizan y sus principales fluoróforos. A continuación, la sección 2.2 aborda los sensores de fibra óptica, describiendo sus fundamentos de propagación, los distintos tipos y configuraciones, así como sus aplicaciones en detección y sensado óptico. Posteriormente, en la sección 2.3, se analiza la importancia del diseño geométrico en la eficiencia de los sistemas ópticos, con ejemplos de optimización en la disposición de fibras y cavidades. Seguidamente, en la sección 2.4, se introduce el concepto de *Lab-on-Chip*, definiendo sus características, componentes y ventajas frente a métodos tradicionales. Finalmente, la sección 2.5 presenta las principales técnicas de fabricación de dispositivos *Lab-on-Chip*, destacando metodologías como la impresión 3D y ULAE.

2.1 Espectroscopía de fluorescencia

Cuando se trata de analizar líquidos con rapidez y precisión, las técnicas ópticas se han convertido en una de las opciones más potentes. En particular, la espectroscopía es un conjunto de métodos que permiten estudiar cómo interacciona la luz con la materia, midiendo la radiación absorbida o emitida por una muestra. Entre ellas, la espectroscopía de fluorescencia destaca por su alta sensibilidad y por ser una técnica poco invasiva. Se basa en el fenómeno físico de la fluorescencia, en el que una molécula absorbe luz (normalmente en el rango ultravioleta o visible) y, casi de inmediato, emite esa energía también en forma de luz, pero a una longitud de onda mayor [24].

Este proceso ocurre en cuestión de nanosegundos. Una molécula está formada por átomos que contienen electrones distribuidos en distintos niveles de energía. Cuando la molécula recibe radiación de excitación (absorbe un fotón), uno de sus electrones asciende desde el estado fundamental hasta un nivel energético superior, denominado estado excitado; a este fenómeno se le conoce como absorción. Esta configuración es inestable, por lo que el electrón solo permanece allí durante una fracción de segundo. Antes de emitir luz, parte de la energía puede perderse en forma de transiciones no radiativas, hasta alcanzar el nivel más bajo dentro del estado excitado. Finalmente, al retornar al estado fundamental, el electrón libera energía en forma de un fotón: esta emisión corresponde a la fluorescencia (**Figura 5**) [25]. Es importante destacar que, debido a la pérdida previa de energía, el fotón emitido presenta menor energía y, por tanto, mayor longitud de onda que el fotón absorbido, fenómeno conocido como desplazamiento de Stokes [26].

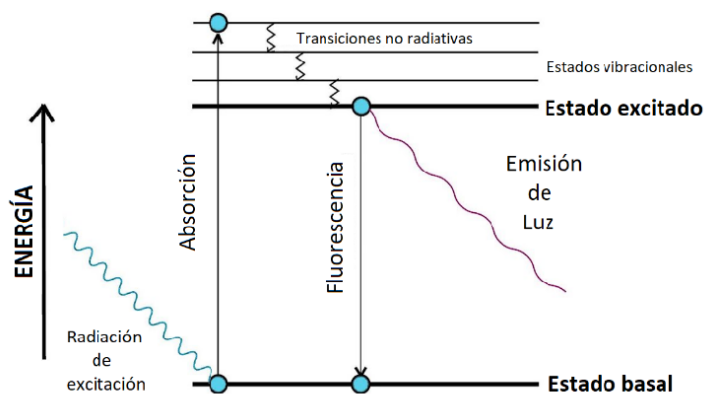


Figura 5: Esquema de niveles de energía que representa el proceso de fluorescencia. La molécula absorbe un electrón y transita del estado fundamental al estado excitado. Tras una relajación emite luz al volver al estado fundamental en forma de fotón [27].

El fenómeno de la fluorescencia se caracteriza por un parámetro fundamental llamado tiempo de vida de fluorescencia, que corresponde al tiempo medio que una molécula permanece en estado excitado antes de emitir un fotón y regresar al estado fundamental. Este valor depende de la naturaleza de la molécula fluorescente (denominada fluoróforo) así como de las condiciones del entorno (como el pH, la temperatura o la viscosidad), y proporciona información útil sobre el medio en el que se encuentra la muestra [28].

Ahora bien, no todas las moléculas pueden emitir fluorescencia. Para que una sustancia pueda emitir luz debe comportarse como un fluoróforo, es decir, ser capaz de absorber luz a una determinada longitud de onda (espectro de excitación) y reemitirla en otra distinta, normalmente más larga (espectro de emisión). Existen fluoróforos naturales y sintéticos. Un ejemplo especialmente útil en estudios de calidad del agua son los pigmentos fotosintéticos presentes en cianobacterias, como las clorofilas o las ficobiliproteínas. Estos compuestos absorben eficientemente luz en el rango del azul o del verde (longitudes de onda entre 450–550 nm) y emiten luz en el rojo o infrarrojo cercano (longitudes de onda superiores a 600 nm), lo que genera una señal óptica que puede detectarse mediante sensores específicos [29].

En general, los fluoróforos orgánicos más utilizados presentan tiempos de vida muy breves, típicamente en el rango de 1 a 10 nanosegundos. Entre ellos se encuentran la fluoresceína, los colorantes Alexa Fluor (como Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 405) y la familia Cy (Cy3, Cy5), todos ampliamente empleados por su alta intensidad de emisión y buena estabilidad en medios biológicos [30]. En la **Tabla 3** se muestran algunos de los fluoróforos más utilizados, junto con sus longitudes de onda de excitación y emisión características.

Fluoróforo	Excitación (nm)	Emisión (nm)
Fluoresceína	498	517
Alexa Fluor 405	401	422
Alexa Fluor 488	499	520
Cy3	554	566
Cy5	647	665

Tabla 3: Longitudes de onda de excitación y emisión de algunos fluoróforos orgánicos comunes (Fluoresceína, Alexa Fluor y Cy).

Los fluoróforos sintéticos, a diferencia de los orgánicos naturales, se diseñan artificialmente en el laboratorio con el objetivo de unirse a moléculas específicas y emitir luz de forma más intensa o estable. Su principal ventaja es que pueden adaptarse a distintas aplicaciones, como técnicas de bioimagen o marcaje celular, permitiendo mejorar la precisión en la detección [31].

Además, el comportamiento óptico de un fluoróforo se describe mediante su espectro, que es la representación de cómo responde a distintas longitudes de onda de luz. En fluorescencia, se distinguen dos espectros clave: el espectro de excitación y el de emisión. El espectro de excitación muestra qué longitudes de onda son más eficaces para excitar a la molécula mientras que el espectro de emisión, por su parte, representa las longitudes de onda de la luz emitida cuando la molécula retorna a su estado fundamental. En la mayoría de los casos, la luz emitida tiene una longitud de onda mayor (y, por tanto, menor energía) que la luz absorbida. Tal y como mencionamos en la **Figura 4**, esta diferencia entre ambas se conoce como desplazamiento de Stokes, y es fundamental para diseñar sistemas de detección eficaces: permite utilizar filtros que bloqueen la luz de excitación mientras dejan pasar la señal de emisión, mejorando así la sensibilidad y reduciendo el ruido [28].

Las características del fenómeno de la fluorescencia hacen posible su aplicación en un amplio rango de campos. En medicina, por ejemplo, se emplea para identificar biomarcadores (moléculas presentes en fluidos corporales como sangre, saliva o suero, cuyo aumento o disminución puede alertar de alteraciones fisiológicas antes de que se manifiesten síntomas visibles), asociados a enfermedades. Un caso representativo es el cáncer de mama, donde se utilizan fluoróforos como el verde de indocianina (ICG) para guiar al cirujano durante la intervención. Estos compuestos iluminan con fluorescencia los ganglios linfáticos centinela y los márgenes tumorales, ayudando a extirpar únicamente el tejido afectado y preservando al máximo el sano, lo que mejora significativamente el pronóstico del paciente [32]. En medioambiente, la fluorescencia sirve para controlar la presencia de microorganismos o contaminantes en agua. Y en sectores industriales como el alimentario o el farmacéutico, se utiliza para comprobar la calidad de los productos en tiempo real y sin interrumpir el proceso de producción.

En definitiva, la espectroscopía de fluorescencia es una técnica que combina muchas cualidades deseables: es sensible, específica, rápida, y se adapta a diferentes contextos. Por todo ello, en este trabajo se adopta como técnica de referencia para analizar la fluorescencia de muestras líquidas.

2.2 Sensores de fibra óptica

En los sistemas de análisis óptico, como los que se emplean en dispositivos LoC, la transmisión y la recolección eficiente de luz son elementos clave. Una de las tecnologías que mejor resuelve esta necesidad son los sensores de fibra óptica, que permiten guiar la luz hasta zonas muy concretas del dispositivo, o recogerla desde espacios de difícil acceso, con mínimas pérdidas y sin interferencias externas. Pero para entender su utilidad, es necesario comenzar explicando qué es una fibra óptica y cómo funciona.

Una fibra óptica es una guía de onda dieléctrica (es decir, un material aislante que no conduce la corriente eléctrica, pero permite la propagación de campos electromagnéticos, como la luz) en forma de filamento cilíndrico, compuesta típicamente por dos materiales concéntricos con diferentes índices de refracción: un núcleo (*core*), por donde se propaga la luz, y un revestimiento (*cladding*) que lo rodea y confina la luz en su interior. El núcleo está fabricado con un material de mayor índice de refracción (n_1) que el del revestimiento (n_2), de modo que se establece una interfaz entre ambos, como se puede apreciar en la **Figura 6**. Esta diferencia en los índices de refracción es la clave para que el fenómeno de reflexión total interna ocurra, permitiendo la propagación eficiente de la luz en trayectorias múltiples a lo largo del núcleo [33].

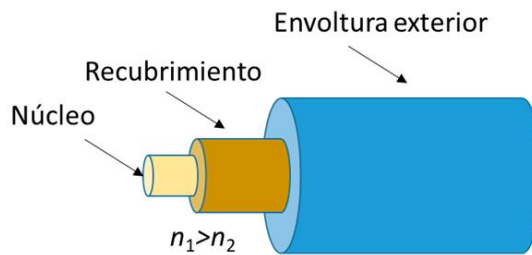


Figura 6: Estructura básica de una fibra óptica. La propagación de la luz se mantiene dentro del núcleo gracias al fenómeno de reflexión interna total, que ocurre cuando el índice de refracción del núcleo (n_1) es mayor que el del revestimiento (n_2), es decir, $n_1 > n_2$. La envoltura exterior proporciona protección mecánica a la fibra. [34]

Cuando un rayo de luz incide desde un medio con mayor índice de refracción (el núcleo) hacia otro con menor índice de refracción (el revestimiento), sufre refracción y se desvía al pasar la frontera entre ambos (ver **Figura 7**). Sin embargo, si el ángulo de incidencia excede un valor determinado llamado ángulo crítico (θ_c), el rayo ya no puede refractarse al segundo medio, y en su lugar, se refleja completamente dentro del primero. Este principio se conoce como reflexión total interna. El ángulo crítico depende de los índices de refracción según la ley de Snell:

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2$$

Sabiendo que cuando el ángulo de refracción alcanza los 90° (el rayo deja de propagarse en el segundo medio), se define el ángulo crítico θ_c . En ese caso, $\sin \theta_2 = 1$

$$\theta_c = \arcsin\left(\frac{n_1}{n_2}\right)$$

donde $n_1 > n_2$. Para que la luz se mantenga confinada en el núcleo, debe entrar con un ángulo superior a θ_c , medido respecto a la normal en la interfaz núcleo-revestimiento. Esta condición es lo que garantiza una guía eficiente de la señal óptica a lo largo de trayectos extensos sin pérdida significativa de energía fuera de la fibra.

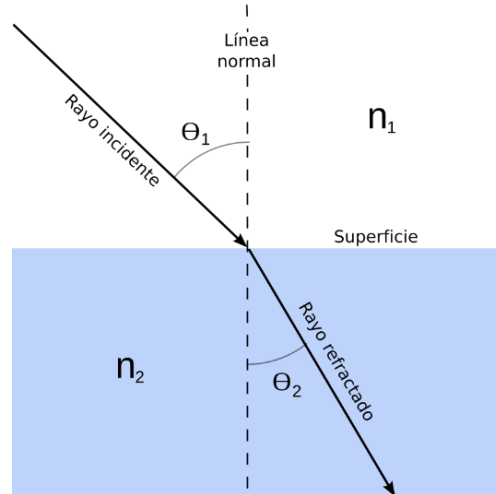


Figura 7: Representación gráfica de la ley de Snell. Un rayo de luz incide sobre la superficie que separa dos medios con diferentes índices de refracción (n_1 y n_2), formando un ángulo de incidencia (θ_1) respecto a la normal. Al atravesar la superficie, el rayo se refracta formando un ángulo de refracción (θ_2) [35].

Además, para mejorar la aceptación de luz externa, las fibras se diseñan con un ángulo de aceptación máximo, relacionado con la apertura numérica (NA), que define el rango angular desde el cual la luz puede ser acoplada a la fibra:

$$NA = \sqrt{n_1^2 - n_2^2}$$

donde n_1 es el índice de refracción del núcleo y n_2 el del revestimiento.

El valor de NA determina el cono de aceptación, entendido como el volumen angular dentro del cual los rayos de luz incidentes pueden entrar en el núcleo de la fibra y ser guiados correctamente. Cualquier otro rayo que incida desde fuera del cono de aceptación será refractado y no podrá permanecer confinado dentro del núcleo.

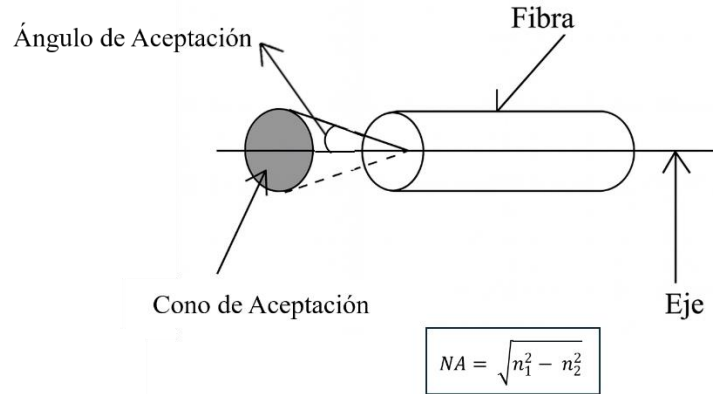


Figura 8: Ángulo de aceptación y apertura numérica (NA) en una fibra óptica. El cono de aceptación define el rango angular desde el cual la luz puede entrar en la fibra y mantenerse guiada en su interior. La apertura numérica depende de la diferencia entre los índices de refracción del núcleo (n_1) y del recubrimiento (n_2), determinando así la eficiencia de acoplamiento de luz en la fibra [36].

La apertura numérica influye directamente en la capacidad de recolección de luz, lo que resulta crucial en aplicaciones de sensores ópticos. Gracias a estos principios, las fibras ópticas no solo permiten una transmisión eficiente de luz, sino que también pueden utilizarse como parte de sensores ópticos miniaturizados, donde la luz debe propagarse confinada en trayectos controlados.

Aunque el principio de funcionamiento (basado en la RTI) es el mismo en todos los casos, existen diferentes tipos de fibras ópticas, clasificados según su diseño estructural y el modo de propagación de la luz. Dependiendo del modo de propagación de la luz, se distinguen dos categorías principales: fibras monomodo y fibras multimodo. Aunque más adelante hablaremos de algunas con diseños estructurales particulares.

Las fibras monomodo poseen un núcleo muy estrecho, típicamente con un diámetro de unos 8–10 μm , que permite que la luz se propague solo en un único modo, es decir, siguiendo un camino axial, alineado con el eje central de la fibra. Este tipo de guiado minimiza la dispersión y permite que la señal óptica llegue al otro extremo de la fibra sin grandes distorsiones, lo que resulta ideal para transmisiones de alta precisión o a largas distancias. En cambio, las fibras multimodo tienen núcleos más anchos (normalmente 50 o 62,5 μm), lo que permite que la luz se propague simultáneamente por varios caminos diferentes dentro de la fibra, cada uno con una trayectoria distinta (ver **Figura 9**). A este fenómeno se le conoce como dispersión modal, y ocurre porque cada modo recorre una distancia ligeramente diferente, provocando que los impulsos ópticos lleguen desfasados al receptor. Esto limita el alcance y la velocidad de transmisión, aunque a cambio las fibras multimodo son más fáciles de alinear y acoplar a fuentes de luz [37]. Esto se debe a que el mayor diámetro del núcleo en las fibras multimodo facilita la recolección de luz, de modo que la alineación con la fuente no requiere tanta precisión como en el caso de las fibras monomodo.

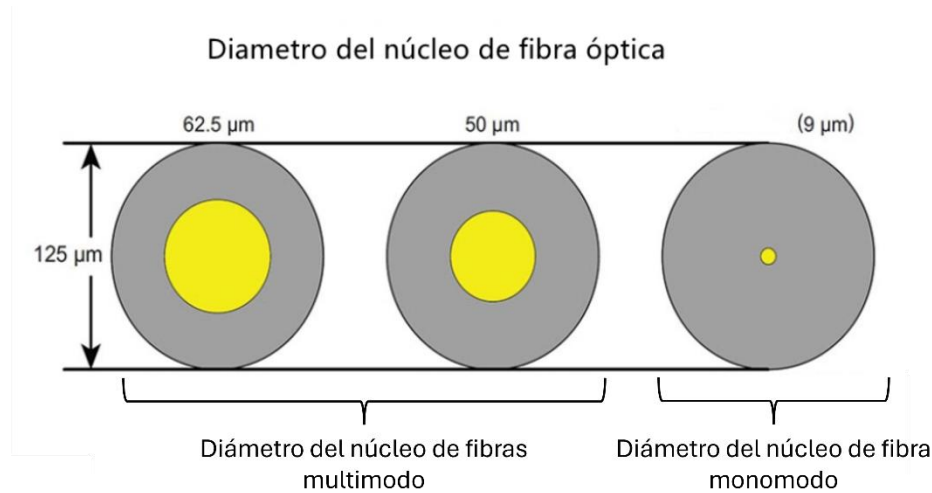


Figura 9: Comparativa del diámetro del núcleo en fibras ópticas. Las fibras multimodo tienen núcleos de mayor diámetro, lo que permite la propagación de varios modos de luz. En cambio, las fibras monomodo tienen núcleos mucho más estrechos, limitando la transmisión a un único modo para mayor alcance y precisión [38].

Esta diferencia en el diámetro del núcleo provoca que la señal se propague de manera diferente, en la **Figura 10** veremos el comportamiento de los rayos de luz en el interior de la fibra monomodo y multimodo.

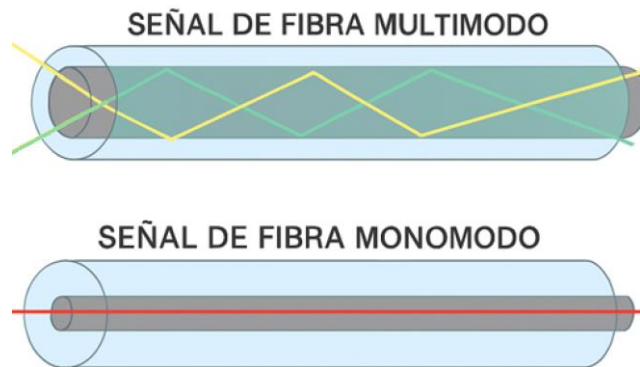


Figura 10: Propagación de la luz en fibras ópticas multimodo y monomodo. En la fibra multimodo, los rayos de luz recorren múltiples trayectorias internas, lo que provoca dispersión modal, es decir, un ensanchamiento del pulso óptico debido a la diferencia en los tiempos de propagación de cada modo. En la fibra monomodo, en cambio, la luz se transmite por un único modo, reduciendo este efecto y permitiendo enviar señales a mayores distancias con mayor fidelidad [Imagen generada con inteligencia artificial].

Además, otra diferencia clave radica en el perfil de índice de refracción (ver **Figura 11**), que describe cómo varía el índice óptico desde el centro del núcleo hasta el revestimiento. En fibras de perfil escalonado (o salto de índice), el índice cambia bruscamente entre el núcleo y el revestimiento. En las de índice gradual (o gradiente de índice), el índice disminuye de forma continua hacia el exterior, haciendo que los rayos se curven suavemente en lugar de reflejarse bruscamente. Este diseño reduce la dispersión modal y mejora el rendimiento en ciertas aplicaciones.

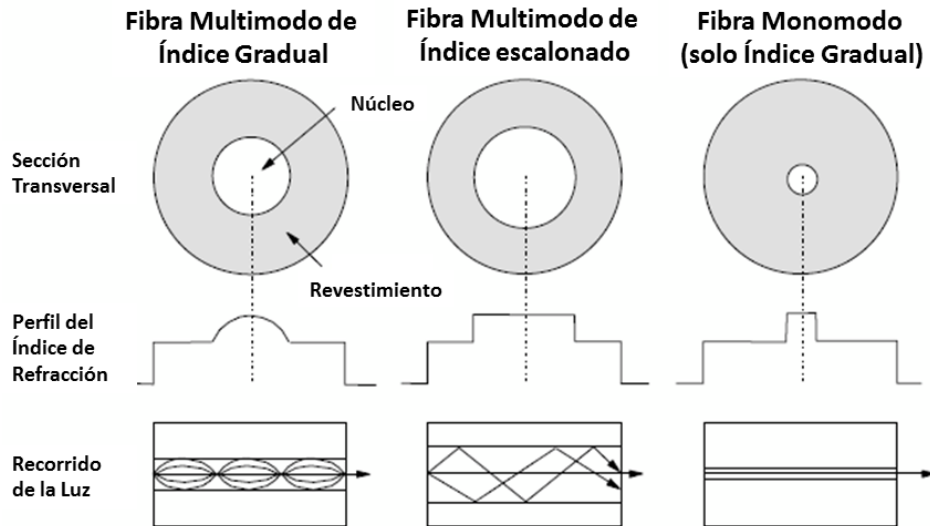


Figura 11: Tipos de fibras ópticas según el perfil de índice de refracción: multimodo de índice gradual (trayectorias curvas con menor dispersión), multimodo de índice escalonado (trayectorias rectas con mayor dispersión modal) y monomodo (único modo de propagación, ideal para largas distancias) [39].

A parte de las fibras monomodo y multimodo convencionales, existen diseños especializados que permiten aprovechar la fibra no solo como guía de luz, sino también como sensor óptico. Entre estas, destacan las fibras con rejillas de Bragg (FBG, por sus siglas en inglés), que presentan una estructura periódica en el núcleo capaz de reflejar selectivamente determinadas longitudes de onda. Cuando esta estructura se ve alterada por cambios en temperatura, presión o deformación, también cambia la separación entre las líneas de la rejilla, lo que provoca una variación en la longitud de onda de la luz reflejada. Midiendo estos cambios, es posible monitorizar en tiempo real el entorno físico de la fibra con alta precisión y hacer que funcione como un sensor [38].

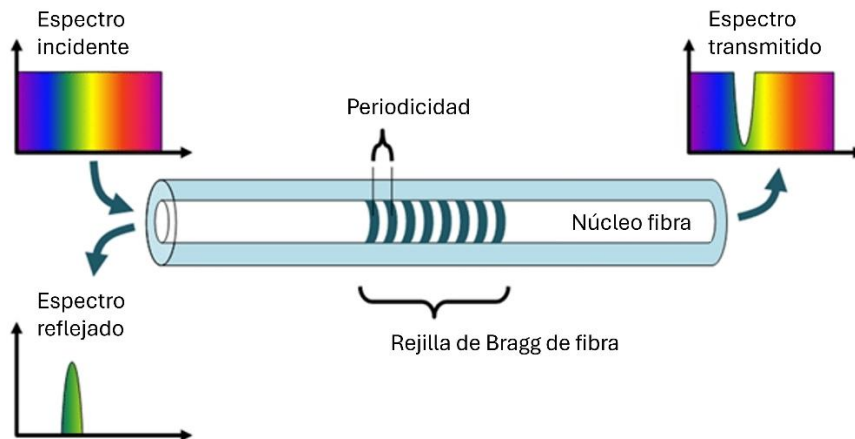


Figura 12: Funcionamiento de una rejilla de Bragg en fibra óptica. La luz incide sobre el núcleo de la fibra óptica que contiene una rejilla de Bragg, una estructura periódica que refleja selectivamente una longitud de onda específica (espectro transmitido). La periodicidad de la rejilla determina la longitud de onda reflejada según la condición de Bragg, lo que permite su uso en aplicaciones como sensores y filtros ópticos [Imagen generada con inteligencia artificial].

Otra variante son las fibras que incorporan cavidades Fabry-Pérot, donde la luz queda confinada entre dos superficies reflectantes formando una interferencia. Esta configuración permite medir parámetros como el índice de refracción, la concentración química o incluso la presión interna, ya que pequeñas variaciones externas afectan la interferencia generada.

En dispositivos miniaturizados como los LoC, la fibra óptica puede cumplir diversas funciones en función de su diseño. En nuestro caso específico, utilizaremos fibra multimodo que servirá como un medio de guiado de luz, operando como conexión entre el sistema de detección y la muestra. Esta característica facilita la recolección de señales de fluorescencia sin recurrir a la integración de componentes voluminosos o frágiles. Debido a su flexibilidad, la fibra se puede insertar con facilidad en los canales del microdispositivo o situarse cerca de la zona donde ocurre la reacción o el fenómeno de interés.

En este trabajo se emplean fibras multimodo debido a que, por sus características, resultan especialmente adecuadas para aplicaciones en microdispositivos. Su mayor diámetro facilita el acoplamiento de la luz y permite recolectar de manera eficiente la fluorescencia generada en el reducido volumen del chip, asegurando además una conexión directa con el espectrómetro.

2.3 Optimización geométrica en sistemas ópticos

En los sistemas ópticos miniaturizados, no basta con elegir buenos materiales o fuentes de luz potentes; la geometría del diseño también tiene un papel determinante en la eficiencia de recolección y transmisión de señales ópticas. La forma, el tamaño y la disposición relativa de los elementos influyen directamente en cómo se propaga la luz, cómo se acopla a detectores y cuánta señal útil se puede captar. En otras palabras, un buen diseño geométrico puede amplificar notablemente el rendimiento de un sistema sin necesidad de añadir componentes adicionales.

Un proyecto relevante de esta estrategia se ha desarrollado en nuestra universidad, la Universidad de Cantabria (UC). Dicho experimento se centró en el diseño y fabricación de un sensor óptico para el análisis de fluorescencia en muestras líquidas, basado en una placa de sílice fundida que incorpora un pozo central de geometría cuadrada destinado a contener la muestra. En cada uno de los cuatro lados del pozo se ubicaron fibras ópticas, dispuestas de manera equidistante para captar la fluorescencia desde distintas direcciones y mejorar la recolección de señal, tal y como se ve en la **Figura 13**. Esta configuración permite capturar la luz fluorescente desde diferentes ángulos, rodeando así prácticamente toda la muestra. Es importante destacar que la luz de excitación no proviene de una fibra lateral, sino que se dirige perpendicularmente desde la parte superior del pozo, incidiendo de forma perpendicular (90°) sobre la muestra líquida [39].

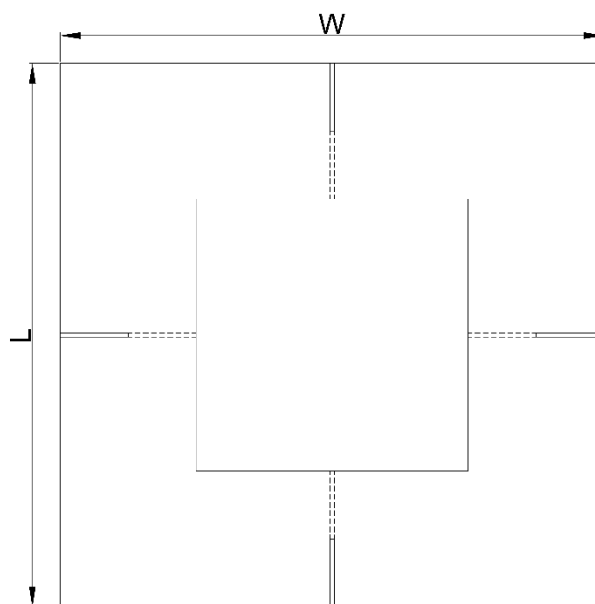


Figura 13: Vista superior del chip y de la disposición de las fibras ópticas en el pozo, correspondiente al proyecto propuesto inicialmente por investigadores de la Universidad de Cantabria (UC) para la captura de señal fluorescente [30].

En el diseño propuesto por los investigadores de la Universidad de Cantabria, las fibras ópticas llegaban con su revestimiento plástico únicamente hasta el borde del vidrio en cada lado. A partir de ese punto y hasta el interior del pozo, el tramo de fibra quedaba sin dicho recubrimiento plástico, de modo que el conjunto *core-cladding* permanecía expuesto y en contacto directo con la muestra. Esto permitía que la luz emitida por la muestra acoplase directamente al núcleo, aunque también presentaba un inconveniente: ese segmento de fibra carecía de protección mecánica y no estaba enterrado en el vidrio, lo que lo hacía especialmente vulnerable a roturas durante la manipulación o el montaje.

Esta limitación será abordada en futuros rediseños del dispositivo, donde se buscará mantener la ventaja óptica de un acoplamiento directo al núcleo, pero mejorar la robustez mecánica mediante un ajuste de la geometría del vidrio o una integración que proporcione mayor soporte a la fibra en la zona crítica.

El diseño fue fabricado mediante grabado con láser ultrarrápido y asistido por ataque químico (ULAE), cuya descripción detallada se presenta en el apartado 2.5.2, y que será también la técnica empleada en el presente trabajo, tal como se expone en la sección 4.1 dedicada al proceso de fabricación.

Además de mejorar la sensibilidad, esta aproximación permitió reducir el volumen mínimo necesario para el análisis, lo que resulta especialmente útil cuando se trabaja con muestras biológicas o ambientales escasas. Y dado que las fibras estaban fijadas mediante una estructura personalizada y alineadas con precisión gracias a la fabricación interna del vidrio (**Figura 14**), el sistema ofrecía una buena reproducibilidad entre medidas, si bien la estabilidad mecánica constituía todavía una limitación del diseño, aspecto que se tendrá en cuenta en futuros desarrollos.

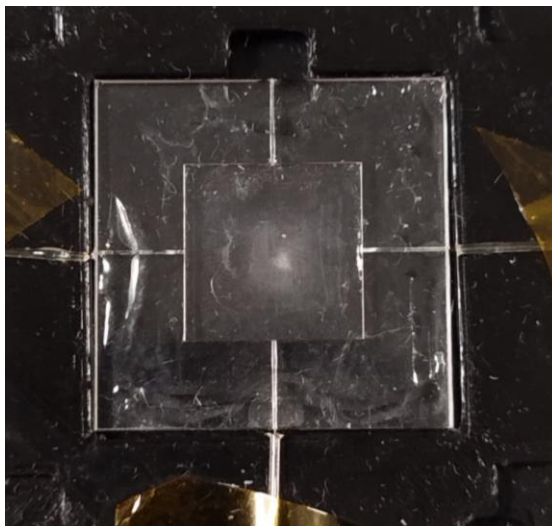


Figura 14: Vista superior del chip completo con las fibras alineadas mediante la estructura interna de vidrio, lo que favorece su correcta disposición y facilita la reproducibilidad entre medidas, aunque la estabilidad mecánica sigue siendo una limitación del diseño.

El resultado fue un dispositivo compacto y portátil que, en las pruebas realizadas con clorofila pura y un cultivo de cianobacterias, permitió aumentar la intensidad de la señal fluorescente recolectada mediante una disposición geométrica eficaz. La mejora de la señal se atribuyó al hecho de captar fluorescencia desde varios puntos de detección, lo que demuestra que aumentar el número de fibras resulta beneficioso para incrementar la intensidad medida.

Esta aproximación sentó las bases para explorar en mayor profundidad el papel que juega la geometría del pozo y la disposición de las fibras en la eficiencia de captura de luz, tema que se abordará específicamente en el presente trabajo. Partiendo de este planteamiento, surge la hipótesis de que aún es posible mejorar la recolección óptica explorando variantes geométricas. En este trabajo se estudia si la geometría cuadrada del pozo es la más adecuada o si otras formas pudieran mejorar el acoplamiento, así como el papel que desempeña el tamaño del pozo en la eficiencia de captura.

En este trabajo se plantean propuestas de rediseño, que posteriormente se evalúan mediante simulaciones ópticas, con el objetivo de identificar configuraciones geométricas más eficaces. Cabe destacar que el propósito no es únicamente miniaturizar el sistema, sino considerarlo desde su geometría óptica y anticipar cómo se comportará la luz en la estructura real.

2.4 Concepto Lab-On-Chip

La tendencia hacia la miniaturización en el ámbito de la ciencia y la ingeniería ha dado lugar a una categoría de dispositivos que revolucionan la forma en la que se analizan sustancias: los sistemas LoC. Tal y como su nombre indica, un *Lab-On-Chip* busca recrear las funciones de un laboratorio en un solo chip, integrando algunos procesos como el muestreo, la mezcla, la reacción, la separación o la detección dentro de un mismo sistema.

Un Lab-on-a-Chip (LoC) es un dispositivo miniaturizado que integra una o varias funciones de laboratorio sobre una plataforma de dimensiones reducidas, generalmente suele estar comprendido entre 1 y 10 milímetros cuadrados con canales microfluídicos de anchura del orden de 100 μm a 500 μm , lo que facilita su integración en plataformas portátiles o de análisis en tiempo real [40].

Este concepto se fundamenta en la microfluídica, la cual consiste en la manipulación exacta de pequeños volúmenes de fluidos (del orden de microlitros) mediante canales que tienen al menos una dimensión en el rango de los micrómetros, conocidos como microcanales. Al disminuir las dimensiones de los sistemas, se logra no solo un significativo ahorro de reactivos, sino también un aumento en la velocidad de los procesos.

No todos los LoC deben replicar todas las funciones de un laboratorio tradicional, en la mayoría de los casos, como el abordado en este trabajo, se integran únicamente las etapas relevantes para una tarea específica. En este caso, el sistema desarrollado está orientado al análisis óptico de muestras líquidas mediante fluorescencia, y, por tanto, se enfoca en integrar funciones como el confinamiento de la muestra, la excitación luminosa y la recogida eficiente de señal.

En el caso concreto de este trabajo, el Lab-on-a-Chip desarrollado integra: (i) un pozo redondo central micrométrico donde se deposita la muestra líquida, (ii) cuatro canales radiales que permiten la inserción precisa de fibras ópticas, (iii) una fuente de excitación óptica (SuperLED rojo) centrada sobre el pozo y (iv) Además, el sistema se completa con un espectrómetro compacto ubicado *off-chip*, encargado de la detección espectral. El pozo y los canales están grabados en una placa de vidrio de sílice mediante la técnica ULAE (descrita en el apartado 2.5.2), que permite fabricar estructuras internas de alta precisión y estabilidad, ideales para aplicaciones ópticas.

Una de las principales ventajas estos dispositivos es su capacidad para realizar análisis con un consumo mínimo de muestra y reactivos, lo que reduce costes y residuos. Su tamaño compacto facilita la portabilidad y permite su uso en entornos fuera del laboratorio. Además, al integrar varias etapas del análisis en un solo dispositivo, se eliminan muchas manipulaciones manuales, lo que disminuye el riesgo de contaminación, errores humanos y pérdida de muestra. Esta automatización parcial mejora la reproducibilidad de los resultados y permite desarrollar sistemas más rápidos, fiables y autónomos. Gracias a estas características, los LoC son especialmente adecuados para aplicaciones que requieren análisis rápidos, sensibles y repetibles, como el diagnóstico biomédico, el control ambiental o la monitorización de procesos industriales.

Como acabamos de mencionar uno de los campos donde más se ha aplicado esta tecnología es en el diagnóstico biomédico. Existen chips capaces de realizar análisis de sangre, detectar virus o medir concentraciones de biomarcadores con una sola gota de fluido [41]. También se emplean en análisis ambientales, como en la detección de contaminantes en agua, donde la integración de sensores ópticos permite analizar directamente la fluorescencia natural o inducida de ciertas sustancias [42].

Por todo esto, el enfoque *Lab-on-Chip* se presenta como una de las mejores opciones para la integración de sistemas ópticos de análisis basados en fluorescencia. En este trabajo se plantea una mejora de este tipo de sistemas mediante la optimización geométrica del acoplamiento óptico entre la muestra líquida y los detectores. Cabe destacar que, dado su diseño, la aplicación inicial de este dispositivo se orienta al análisis medioambiental, motivo por el cual se han realizado pruebas con muestras de cianobacterias, como se detallará más adelante.

2.5 Métodos de fabricación de Lab-on-Chip

La fabricación de dispositivos *Lab-on-Chip* ha evolucionado considerablemente en los últimos años, impulsada por el desarrollo de técnicas capaces de crear estructuras microfluídicas con alta resolución, buena transparencia óptica y geometrías personalizadas. Dos de las tecnologías más relevantes en este campo son la impresión 3D, especialmente sobre polímeros transparentes, y el grabado con láser ultrarápido y asistido por ataque químico, conocido como ULAE (*Ultrafast Laser-Assisted Etching*). Ambas tecnologías permiten la creación de dispositivos funcionales, pero presentan diferencias sustanciales en términos de materiales, precisión, y aplicaciones.

2.5.1 Impresión 3D

La impresión 3D se ha convertido en una herramienta muy accesible y flexible para la fabricación rápida de dispositivos LoC. En especial, las tecnologías basadas en estereolitografía (SLA) o PolyJet.

La tecnología PolyJet funciona de manera muy similar a las impresoras 3D convencionales de chorro de tinta, pero en vez de inyectar tinta inyectan gotas de plástico fotosensible. Mientras un cabezal se va moviendo por la base de impresión capa por capa, una fuente de luz ultravioleta va curando al mismo tiempo la resina, como podemos observar en la **Figura 15** [43].

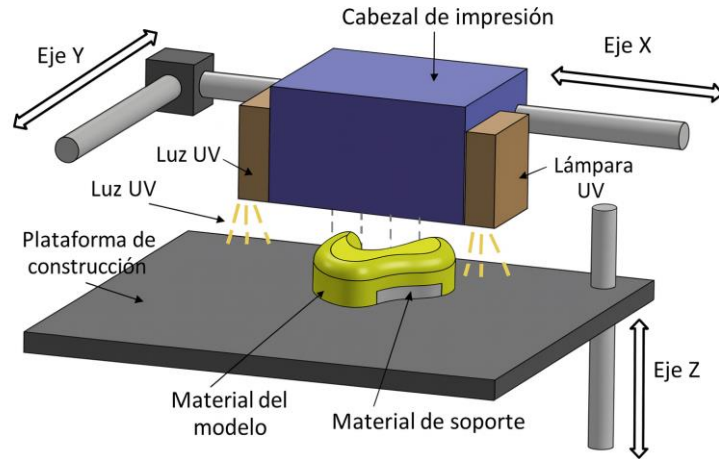


Figura 15: Esquema de una impresora 3D por inyección de material con curado mediante luz ultravioleta (UV). El cabezal de impresión deposita material del modelo y material de soporte sobre la plataforma de construcción, mientras las lámparas UV solidifican las capas de forma progresiva a lo largo de los ejes X, Y y Z [46].

Por otro lado, la estereolitografía (SLA) es una técnica de impresión 3D que, aunque comparte similitudes con PolyJet en cuanto al uso de resinas fotosensibles, presenta diferencias importantes en su funcionamiento. Como se muestra en la **Figura 16** la impresión comienza con la carga de resina líquida en un tanque. A medida que avanza la fabricación, la plataforma de impresión desciende capa a capa, dejando entre ella y el fondo del tanque una fina película de resina. Un láser ultravioleta (UV), controlado por galvanómetros (dispositivos electromecánicos que mueven espejos para dirigir el haz de luz con precisión), traza la sección transversal del objeto 3D sobre la superficie de resina, endureciéndola selectivamente. El modelo se va formando mediante la sucesiva fotopolimerización de capas, con espesores que pueden ser inferiores a 100 micras, lo que permite obtener estructuras con alta resolución y acabado superficial liso [44].

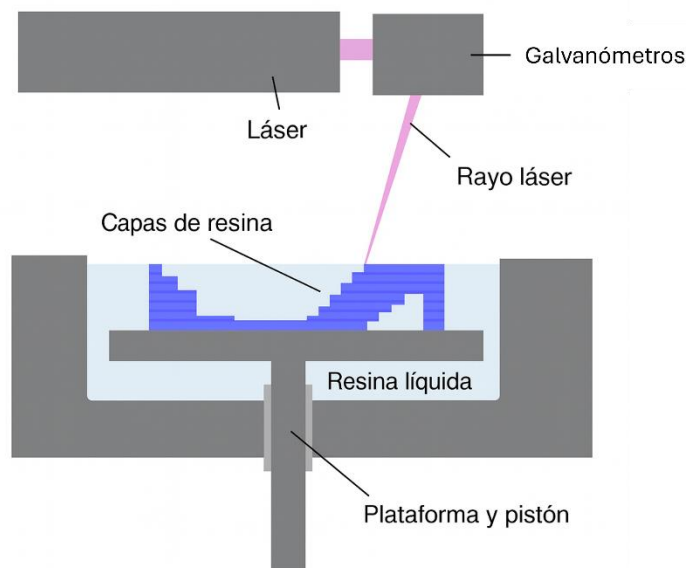


Figura 16: Esquema del proceso de impresión 3D por estereolitografía (SLA). Un láser, controlado por galvanómetros, dirige un rayo sobre la resina líquida para solidificarla capa por capa. La pieza se forma progresivamente sobre la plataforma y el pistón, que descienden a medida que avanza la impresión [48].

Las tecnologías basadas en resinas fotosensibles permiten imprimir microcanales y estructuras transparentes directamente en diferentes polímeros como la resina acrílica o el polímero polidimetilsiloxano (PDMS). Estos materiales presentan una transparencia óptica suficiente para aplicaciones básicas de fluorescencia, además de una compatibilidad razonable con fluidos biológicos.

Junto a estas técnicas, otra alternativa muy extendida es la impresión 3D por deposición de filamento fundido (FDM), en la que un filamento termoplástico, habitualmente PLA (ácido poliláctico), se funde y deposita capa por capa hasta conformar la pieza final. Aunque su resolución es inferior a la de métodos como PolyJet o SLA, la impresión FDM destaca por su bajo coste, accesibilidad y rapidez, lo que la hace idónea para la fabricación de soportes o estructuras auxiliares. En este trabajo, esta técnica se emplea para producir el soporte en PLA de la pieza descrita más adelante.

Una de las principales ventajas de la impresión 3D es la rapidez de prototipado: con una impresora 3D de sobremesa, es posible diseñar e imprimir un chip funcional en cuestión de horas, sin necesidad de salas limpias ni equipos costosos. Además, permite una personalización del diseño, útil en investigación o pruebas clínicas donde cada muestra puede requerir condiciones específicas [45].

Sin embargo, la impresión 3D también presenta limitaciones relevantes, especialmente cuando se requiere alta calidad óptica. Una de las principales desventajas es la aparición de rugosidades superficiales derivadas del propio proceso de fabricación por capas. Aunque algunas impresoras pueden alcanzar resoluciones inferiores a 100 micras, estas capas siguen generando irregularidades microscópicas que pueden interferir con el paso de la luz, generar dispersión no deseada o dificultar el acoplamiento con componentes ópticos como fibras. Además, la variabilidad en la homogeneidad del material, especialmente en resinas fotosensibles, puede afectar a la transparencia y al índice de refracción local del dispositivo, comprometiendo así su rendimiento en aplicaciones donde se requiere una interacción precisa entre luz y muestra. Por todo ello, a pesar de su versatilidad y bajo coste, la impresión 3D no siempre resulta adecuada para fabricar sistemas ópticos que exigen una superficie lisa, alineación precisa y estabilidad mecánica [46].

2.5.2 ULAE

El método ULAE (*Ultrafast Laser Assisted Etching*) permite fabricar microestructuras tridimensionales en el interior de materiales transparentes con gran precisión, siendo especialmente empleado en vidrio de sílice fundida (*fused silica*), que es el material utilizado en este trabajo. Este procedimiento se divide en dos etapas fundamentales, la primera comienza con la irradiación de regiones específicas del material mediante un láser de pulsos ultracortos, del orden de los femtosegundos (10^{-15} segundos). Es importante destacar que, en este contexto, irradiar significa aplicar energía láser en una región muy localizada, con un spot de aproximadamente 2 μm de diámetro bajo las condiciones de mayor precisión alcanzables en nuestro montaje. La interacción de estos pulsos con la red atómica del material genera una modificación localizada de su estructura interna, lo que produce un daño controlado sin necesidad de eliminar material. Esta

alteración sirve como zona selectiva para el posterior ataque químico mediante *etching*, ya que las regiones modificadas presentan mayor susceptibilidad a la disolución. En la segunda etapa de este proceso, el chip se sumerge en una disolución de hidróxido de sodio (NaOH), una base capaz de atacar selectivamente las regiones previamente irradiadas. En nuestro caso, las zonas modificadas se grabaron con una velocidad de aproximadamente 300 μm por hora, mientras que las regiones no modificadas se vieron afectadas a una tasa mucho menor, cercana a 1 μm por hora. Esto permite eliminar únicamente las regiones irradiadas, generando canales y cavidades ópticas de manera controlada. Como resultado, se pueden generar canales, cavidades ópticas y estructuras tridimensionales complejas con alta resolución, gran transparencia y buena compatibilidad con aplicaciones ópticas exigentes [47].

Del proceso ULAE obtenemos un dispositivo compacto, transparente y con una geometría de alta precisión perfecto para la integración de fibras ópticas. Como ya hemos mencionado antes, usamos vidrio, un material rígido que no se deforma fácilmente lo que significa que, si integramos una fibra óptica en una posición concreta dentro de él, la posición no cambiará ni se moverá con el uso de este mejorando así la eficiencia del sistema.

Además, el vidrio presenta propiedades ópticas excelentes: es altamente transparente, no genera autofluorescencia y es compatible con un amplio rango de longitudes de onda. La autofluorescencia se define como la emisión de luz por parte de materiales o biomoléculas cuando son excitados por radiación, incluso en ausencia de fluoróforos externos. Este fenómeno puede incrementar el ruido de fondo y reducir la sensibilidad en sistemas de detección óptica. En este sentido, el vidrio ofrece una ventaja frente a otros materiales al carecer prácticamente de autofluorescencia, lo que lo convierte en un sustrato idóneo para dispositivos de fluorescencia [48].

Aunque este método posea muchas ventajas, también presenta ciertas limitaciones. Entre sus principales desventajas se encuentra el mayor coste del equipo y del proceso, así como una menor flexibilidad para hacer cambios rápidos en el diseño, es por esto por lo que no es la opción más adecuada para prototipado rápido y si lo es cuando se busca rendimiento óptico, estabilidad estructural y reproducibilidad.

Capítulo 3: Diseño del sistema

El sistema que se propone en este trabajo tiene como objetivo la detección de fluorescencia en muestras líquidas, concretamente cianobacterias. Para ello, se plantea un dispositivo *Lab-on-Chip* compuesto por tres elementos principales: una fuente de luz, una placa de análisis con inserción de fibras ópticas y un sistema de detección óptica basado en espectroscopía.

Este diseño constituye una primera propuesta funcional, sobre la cual se realizarán pruebas experimentales en laboratorio. Posteriormente, se explorarán posibles mejoras mediante simulaciones ópticas con el software Zemax, con el objetivo de optimizar la geometría del sistema (apartado 3.3).

3.1 Placa y fibras ópticas

El diseño del sistema propuesto se basa en una pieza de sílice fundida de dimensiones $10 \times 10 \times 1$ mm, sobre la cual se ha definido un pozo central cilíndrico de 1,75 mm de diámetro y 0,5 mm de profundidad. Este pozo, con una capacidad máxima aproximada de 1,227 μL , actúa como cavidad de análisis para contener la muestra líquida (en nuestro caso, cianobacterias) y permitir su interacción con la luz de excitación, así como la posterior recolección de la fluorescencia emitida mediante fibras ópticas.

En cada uno de los cuatro laterales del pozo se han diseñado canales radiales con dos secciones de diámetro distinto tendiendo en consideración el tamaño de la fibra que íbamos a usar, en nuestro caso: 100-140 μm de diámetro (*core-cladding*). La sección más interna, en contacto directo con la muestra, presenta un diámetro reducido, ya que está destinada a alojar la parte desnuda de la fibra óptica, es decir, sin recubrimiento plástico (ver **Figura 17**). Esto permite aproximar el núcleo de la fibra al volumen de análisis, maximizando la eficiencia de captación de la señal fluorescente. A partir de esa sección interna, el canal se ensancha para permitir la inserción de la fibra con su recubrimiento exterior intacto. Esta característica representa una ventaja funcional clave, ya que proporciona una mayor protección mecánica a la fibra, facilita su manipulación sin riesgo de rotura y asegura una fijación más estable frente a movimientos o impactos leves durante el montaje.

Además, se optó por una disposición simétrica de cuatro fibras ópticas equidistantes, situadas en los laterales del pozo. Esta configuración tiene como objetivo mejorar la eficiencia en la recolección de la señal fluorescente y permite captar la señal desde distintos ángulos alrededor de la muestra. El diseño geométrico del chip se muestra en las **Figuras 17 y 18**, mientras que las dimensiones exactas de cada elemento se recogen en las **Tablas 4,5 y 6**.

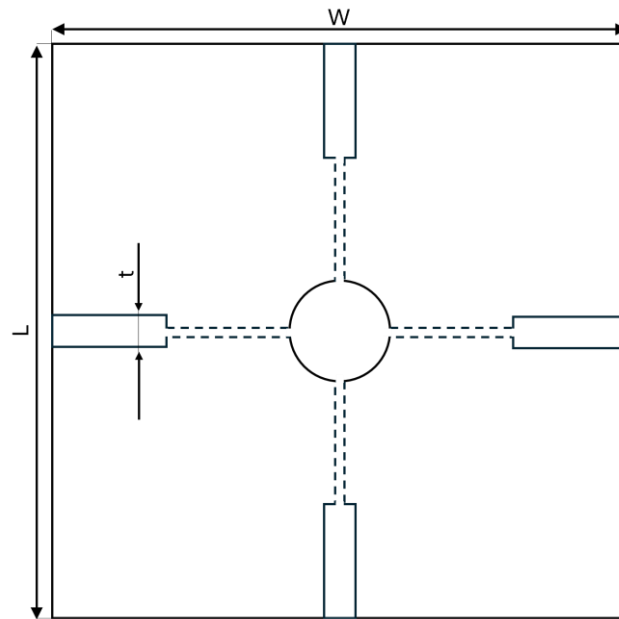


Figura 17: Vista superior del chip con la representación esquemática de sus dimensiones globales (las dimensiones numéricas se especifican en la **Tabla 4**).

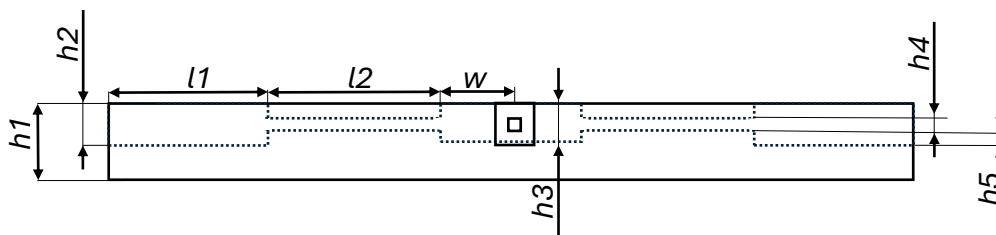


Figura 18: Vista lateral del chip. Se incluyen etiquetas cuyas dimensiones específicas se recogen en las **Tablas 5-6**.

Tabla 4: Dimensiones globales de la placa de vidrio utilizada como base del chip, indicando ancho (W), largo (L) y ancho del canal (t) en milímetros.

W	L	t
10	10	0,55

Tabla 5: Alturas relevantes en la geometría del chip obtenidas del diseño teórico, expresadas en milímetros.

$h1$	$h2$	$h3$	$h4$	$h5$
1	0,6	0,5	0,155	0,2

Tabla 6: Longitudes características de los canales del chip ($l1$ y $l2$) y radio del pozo central (w), expresados en milímetros.

$l1$	$l2$	w (radio del pozo)
2	2,14	0,875

En conjunto, el diseño de la placa y la disposición simétrica de las fibras ópticas están pensados para favorecer una recogida de señal homogénea y estable. Esta configuración sienta las bases para su integración con los módulos de iluminación y detección que se describen a continuación.

3.2 Fuente de luz y detector

En este diseño, la excitación de la muestra se realiza con un LED rojo de alta intensidad (SuperLED). La razón principal de su elección es que su longitud de onda de emisión coincide con la adecuada para excitar los pigmentos fotosintéticos presentes en las cianobacterias. Aunque un láser podría ofrecer un espectro más estrecho y selectivo, su mayor potencia puede resultar excesiva para este tipo de muestras biológicas, con riesgo de fotodaño. El uso de un LED, en cambio, garantiza la intensidad suficiente para inducir fluorescencia, al mismo tiempo que aporta ventajas adicionales como mayor seguridad, menor coste, tamaño compacto y bajo consumo energético, lo que lo convierte en una fuente más adecuada para la integración en un sistema portátil.

Con el fin de conocer con precisión las características espectrales de la fuente de iluminación empleada (SuperLED), se llevó a cabo su caracterización experimental mediante espectroscopía. Para ello, el LED iluminó directamente la entrada de una fibra óptica, que guió la luz hasta el espectrómetro utilizado como detector. En la **Figura 19** se muestra el espectro de emisión registrado.

El análisis espectral reveló un pico máximo de emisión centrado en 617,11 nm, con una intensidad relativa de 55,241 unidades. El ancho de banda a -3 dB fue de 12,05 nm, lo que indica una fuente relativamente monocromática cuya forma espectral, próxima a una curva gaussiana, resulta adecuada para aplicaciones de excitación óptica selectiva.

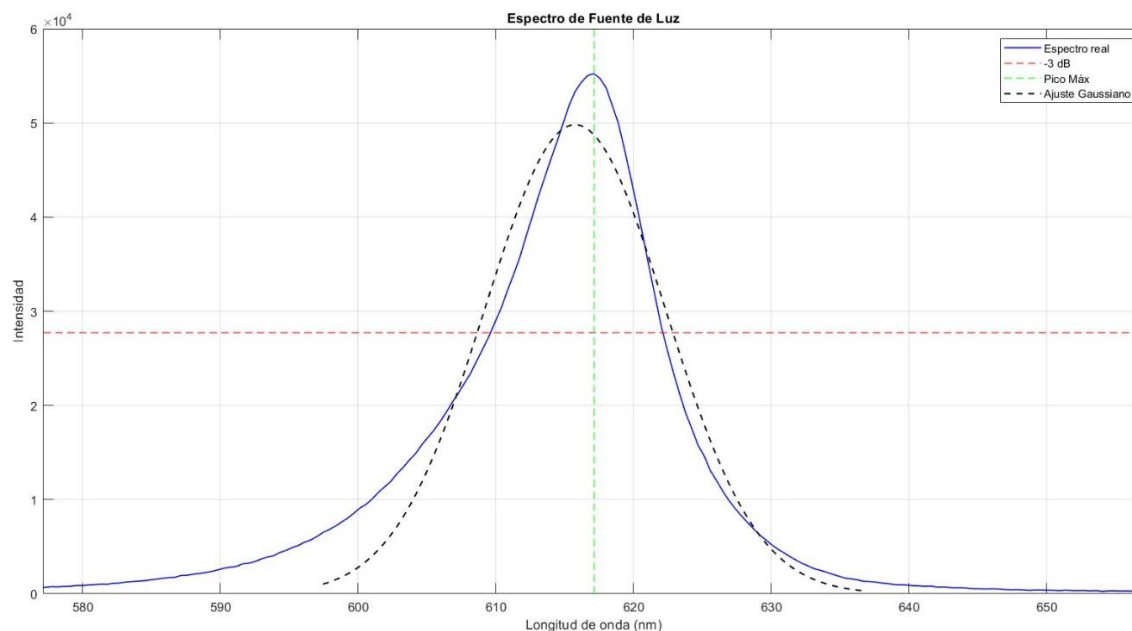


Figura 19: Espectro de emisión del SuperLED rojo caracterizado experimentalmente. El pico máximo se localiza en 617.11 nm con un ancho de banda de 12.05 nm a -3 dB.

Gracias a sus dimensiones reducidas y su bajo coste, este tipo de fuente es fácilmente integrable en configuraciones compactas como la propuesta en este sistema, pudiendo colocarse directamente sobre el pozo con un ángulo perpendicular de incidencia.

La detección de la señal fluorescente se realiza mediante un espectrómetro Maya, al que la luz llega a través de las fibras ópticas insertadas en la placa. Este equipo cuenta con una *slit* (ranura de entrada), por lo que resulta necesario un acoplamiento preciso para garantizar la recogida de la señal. Para ello, se emplearon dos configuraciones distintas: en la primera, las cuatro fibras se agruparon en una única aguja hueca para facilitar su alineación conjunta con la *slit*; en la segunda, se utilizaron cuatro agujas independientes dispuestas en línea, cada una alojando una fibra óptica, lo que permitió ajustar mejor su distribución respecto a la ranura. Esta doble configuración permitió comparar la eficiencia de acoplamiento y la estabilidad de la señal en diferentes condiciones de detección.

De este modo, el sistema queda completamente definido, desde la iluminación de la muestra mediante la fuente de luz hasta la detección espectral de la señal óptica a través del espectrómetro.

3.3 Modelado del chip en Zemax

Para analizar y optimizar el comportamiento óptico del chip desarrollado, se empleó el software Zemax OpticStudio, ampliamente utilizado en el diseño y análisis de sistemas ópticos por su capacidad de simular trayectorias de rayos y modelar entornos tridimensionales. La elección de Zemax se basó en su versatilidad, precisión y en la posibilidad de emular condiciones experimentales realistas antes de fabricar físicamente el dispositivo.

El diseño se llevó a cabo en el entorno *Non-Sequential Mode*, ideal para sistemas donde la luz puede dispersarse, reflejarse o refractarse de forma múltiple y en distintas direcciones. Este modo permite modelar componentes de forma individual, analizar rayos independientes y cuantificar eficiencias en cada etapa del sistema óptico.

El proceso de modelado comenzó creando un objeto que simula el cuerpo principal del chip, representado en el programa como *Rectangular Volume*. Este objeto, con forma de paralelepípedo, se configuró con el material *Fused Silica* para reproducir las propiedades ópticas del vidrio de sílice fundida utilizado en el prototipo. Todas las dimensiones empleadas en esta etapa del modelado corresponden a las medidas teóricas iniciales del sistema.

Posteriormente, para simular las cuatro fibras ópticas se hizo uso de dos tipos de objetos del programa: *Cylinder Volume* y *Torus Volume* (objetos geométricos de tipo cilindro). Los primeros se emplearon para modelar los tramos rectos de las fibras, mientras que los segundos permitieron representar de manera más realista los tramos curvados, simulando dichas curvaturas sin perder continuidad geométrica ni alterar el comportamiento óptico esperado. A diferencia del cuerpo principal, a las fibras se les asignó el material BASF5 (vidrio). Cada “fibra” fue posicionada radialmente tomando como referencia el centro del pozo, de modo que quedaran alineadas con la geometría teórica de los canales diseñados. Como en la simulación no se incluyó el *cladding*, se consideró que las caras de estas “fibras” eran reflectivas, lo que permite imitar el principio de reflexión interna total que gobierna el guiado de la luz en fibras ópticas reales.

Para agilizar el proceso de diseño y facilitar las modificaciones posteriores, se empleó la herramienta *Pick Up* de Zemax. Esta funcionalidad permite que ciertos parámetros sean dependientes de otros, de modo que cualquier cambio en la geometría principal se refleje automáticamente en los elementos relacionados, permitiendo modificar el modelo fácilmente y buscar su mejor configuración. Por ejemplo, las fibras están configuradas para permanecer siempre conectadas al pozo: si se cambia el tamaño o la forma del pozo, las fibras se reposicionan de forma automática manteniéndose alineadas. De igual manera, características como el grosor o el material de las fibras se vincularon mediante *Pick Up*, de forma que al modificar una de ellas, los cambios se aplican simultáneamente a todas. Este enfoque permite trabajar de manera mucho más eficiente ante los ajustes y variaciones que requieren las simulaciones.

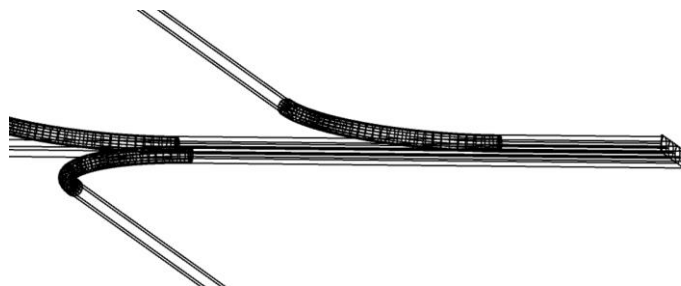


Figura 20: Curvatura de las fibras modelada en el diseño del sistema mediante elementos Torus Volume.

La fuente de iluminación empleada en la simulación fue una fuente puntual (*Point Source*), un objeto disponible en el programa para representar un emisor localizado. Se configuró con una longitud de onda de 617 nm, correspondiente al máximo de emisión del SuperLED utilizado en el montaje experimental, con el fin de reproducir las condiciones reales de excitación de la muestra.

Para registrar la luz transmitida se utilizó un detector de superficie cuadrada (*Rectangle Detectors*) al que le llegaban las cuatro fibras juntas, simulando así lo que haremos a continuación en el laboratorio. En nuestro caso, este detector está haciendo de espectrómetro.

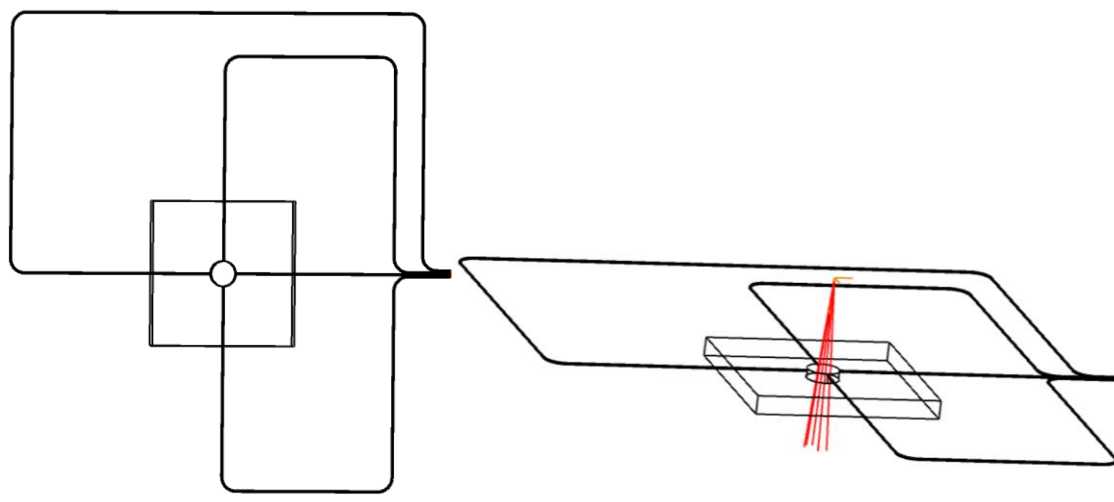


Figura 21: Vista general del sistema completo modelado en Zemax, mostrando la disposición espacial de las fibras y la fuente puntual, que permiten simular el comportamiento del diseño final.

En conjunto, este modelado en Zemax proporciona una representación fiel y flexible del sistema diseñado, sirviendo como herramienta de apoyo para futuras comparaciones con los resultados experimentales y para la exploración de posibles mejoras en configuraciones posteriores.

Una vez finalizado el diseño completo, las simulaciones se organizaron en dos etapas principales. En la primera, se evaluó la capacidad de recolección del sistema, analizando el área del pozo iluminada por las cuatro fibras ópticas dispuestas radialmente. En la segunda etapa, se estudió la capacidad de detección en presencia de cianobacterias, dividiendo el análisis en dos partes: por un lado, la detección de la emisión hasta la punta de la fibra situada en el pozo, y por otro, la propagación de esa señal desde dicha punta hasta el detector. De esta manera, se pudo comprobar de forma progresiva que el sistema cumplía con las funciones de guiado y acoplamiento de la luz previstas en el diseño.

En la primera etapa se estudió la capacidad de recolección, para ello se aplicó el principio de reversibilidad de los rayos. Este principio, uno de los fundamentos de la óptica geométrica, establece que, si un rayo de luz puede ir de un punto A a un punto B, también puede recorrer exactamente el mismo camino en sentido contrario. En nuestro caso, si la fluorescencia generada en el centro del pozo puede entrar en la fibra óptica bajo cierto ángulo, entonces, de forma inversa, un rayo que salga de la fibra con ese mismo ángulo también llegará al centro del pozo siguiendo la misma trayectoria.

Para realizar esta prueba de manera más realista, es necesario tener en cuenta el ángulo de aceptación de la fibra, que está determinado por su apertura numérica (NA). En nuestro caso, la NA es de 0,28, lo que implica que solo los rayos que entren con un ángulo menor o igual al definido por el cono de aceptación podrán ser guiados por la fibra. Este ángulo se calcula mediante la relación:

$$NA = n \cdot \sin(\theta)$$

donde n es el índice de refracción del medio externo (en este caso aire, $n \approx 1$) y θ el semiángulo del cono de aceptación. Sustituyendo obtenemos:

$$0,28 = 1 \cdot \sin(\theta) \rightarrow \theta = \arcsin(0,28) \approx 16,3^\circ$$

Por tanto, configuramos en Zemax cada fuente con un cono de emisión de $16,3^\circ$, orientadas hacia el centro del pozo y colocadas en los canales ópticos.

Al emitir los rayos desde las cuatro fuentes virtuales ubicadas en el interior de las fibras hacia el centro se genera una figura en forma de estrella de 4 brazos (ver **Figura 23**), que representa la zona del pozo desde la cual los rayos, por reversibilidad, podrían entrar de nuevo en las fibras.

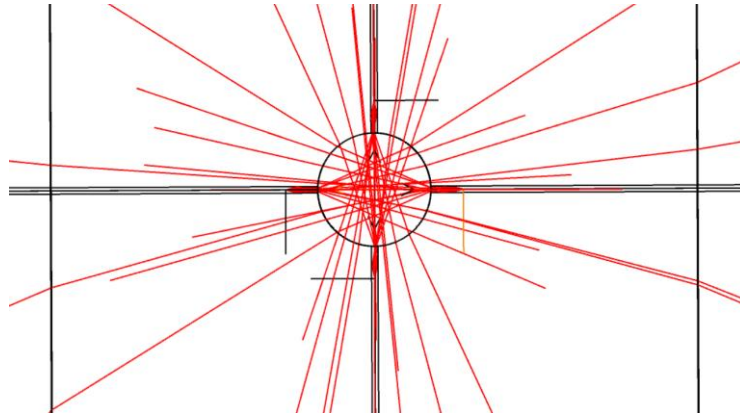


Figura 22: Simulación en Zemax aplicando el principio de reversibilidad. Se muestran las posiciones de las cuatro fuentes puntuales empleadas, indicadas mediante segmentos perpendiculares a los canales de fibra (una de ellas resaltada en naranja). Los rayos generados forman una figura en estrella de cuatro brazos, que representa la región del pozo desde la cual la luz podría acoplarse a las fibras.

Para estimar de manera sencilla la fracción de luz de la generada en el centro del pozo sería captada por las fibras, se realizó una aproximación geométrica basada en la figura en forma de estrella obtenida en la simulación.

El área de esa estrella se aproximó dividiéndola en elementos simples: cuatro triángulos correspondientes a cada brazo y un rectángulo central. Sumando esas superficies se obtuvo el área total iluminada como se ilustra en la **Figura 24**.

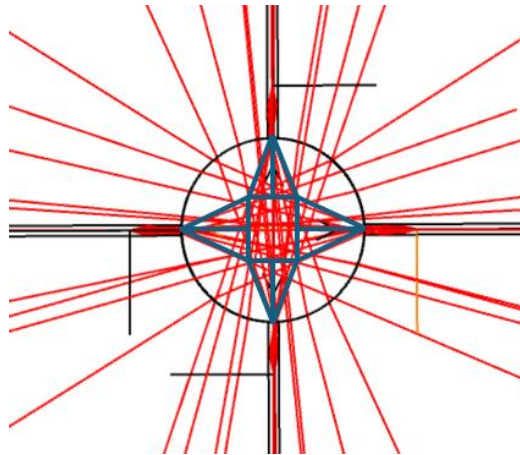


Figura 23: Aproximación geométrica de la región en forma de estrella obtenida en la simulación. La estrella se ha dividido en cuatro triángulos y un rectángulo central (en azul), cuyas áreas permiten estimar de manera sencilla la superficie total desde la cual la luz podría ser acoplada a las fibras.

Por otro lado, el área del círculo que define el pozo se tomó como referencia del 100% de la superficie disponible, y el área de la estrella representó aproximadamente un 45,3% del total del pozo.

Cabe señalar que este análisis corresponde a una aproximación bidimensional en planta, lo que permite estimar de manera sencilla la fracción de superficie del pozo desde la cual los rayos podrían acoplarse a las fibras. Aunque no representa de forma explícita la tercera dimensión (profundidad), este resultado es consistente con la geometría cilíndrica del

pozo y proporciona una buena primera aproximación de la eficiencia de recolección.

A partir de esta representación, se propone la geometría en forma de estrella como base para optimizar el diseño, de modo que únicamente se fabrique la región del pozo desde la cual la fluorescencia puede ser realmente recogida por las fibras.

En una segunda etapa, se comprobó que cada una de las cuatro fibras modeladas guiara correctamente la luz hacia el detector. Para ello, se colocó una fuente de luz puntual en el interior de cada fibra de manera individual, observando cómo los rayos se propagaban por ella mediante múltiples reflexiones internas. Este procedimiento permitió visualizar cómo la luz se propagaba a lo largo del volumen cilíndrico de la fibra y verificar que llegaba efectivamente al detector final.

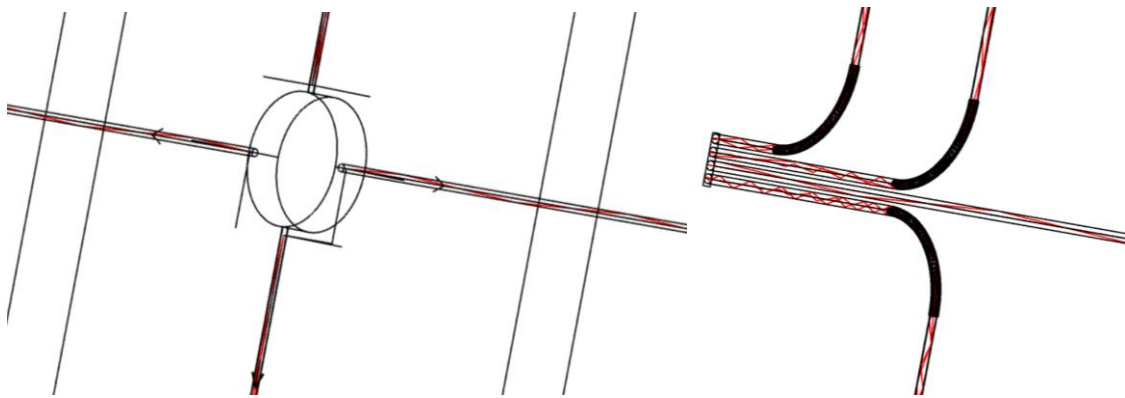


Figura 24: Propagación de la luz en el interior de las fibras ópticas mediante la colocación de cuatro fuentes puntuales, una en cada fibra, para comprobar el guiado correcto hacia el detector.

Finalmente, se llevó a cabo una prueba destinada a comprobar si la fluorescencia emitida por las cianobacterias en el interior del pozo podía propagarse desde la fuente hasta el punto A definido previamente como referencia. Para ello, se colocó una fuente puntual perpendicular en el centro del pozo y un detector en el borde lateral, ocupando toda la altura de este (0,5 mm).

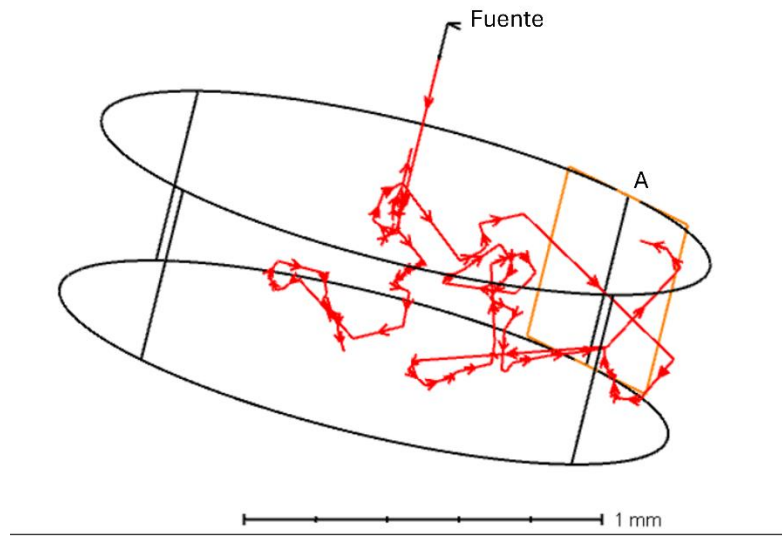


Figura 25: Simulación en Zemax de la propagación de la fluorescencia emitida por las cianobacterias en el interior del pozo. Se representa la trayectoria de varios rayos generados en una fuente puntual colocada perpendicularmente al pozo y su detección en el punto de referencia A, situado en el borde lateral. El detector ocupa toda la altura del pozo (0,05 mm), permitiendo analizar la fracción de luz fluorescente que alcanza la pared lateral.

La fluorescencia se simuló en Zemax empleando el modelo *Angle Scattering*, que permite representar de manera simplificada la emisión en medios dispersivos mediante tres parámetros principales:

- **Trayecto medio (Mean Path):** determina la distancia media que recorre un rayo dentro del volumen antes de ser dispersado, en nuestro caso, por las cianobacterias. Por lo tanto, este valor puede representar un promedio de la distancia entre cianobacterias. Como se aprecia en la **Figura 26**, se configuró un trayecto medio de 0,1 mm, valor elegido porque garantiza que en la reducida escala del pozo (profundidad de 0,5 mm) los rayos interactúen con el medio y se produzca la dispersión, evitando que atraviesen el volumen sin modificarse.
- **Ángulo máximo de dispersión:** define la apertura del cono en el que se redistribuyen los rayos tras la dispersión. El ángulo de dispersión se fijó en 90° , lo que implica que los rayos se emiten en todas las direcciones posibles dentro del espacio frontal, reproduciendo el carácter isotrópico (hacia todas las direcciones por igual) propio de la fluorescencia.
- **Wavelength Shift (cambio de longitud de onda):** simula que la luz, al ser reemitida, no tiene la misma longitud de onda que la de entrada, sino que se desplaza hacia longitudes de onda más largas, en nuestro caso, pasamos de 617 nm (excitación) a 650 nm (principal pico de emisión de fluorescencia de las cianobacterias).

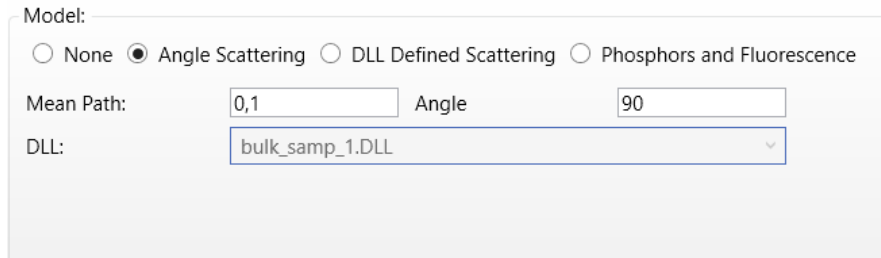


Figura 26: Configuración en Zemax del modelo *Angle Scattering* utilizado para simular la fluorescencia. Se fijó un trayecto medio de 0,1 mm para garantizar la interacción de los rayos dentro del pozo (0,5 mm de profundidad) y un ángulo de dispersión de 90°, reproduciendo el carácter isotrópico de la emisión fluorescente.

El programa asigna probabilidades a que la luz se mantenga en la misma longitud de onda de excitación o que cambie a otra mayor (la de emisión). Para determinar el *Wavelength Shift* se le asignaron los siguientes parámetros:

- **(1,1,0.5):** significa que la longitud de onda 1 (617 nm, correspondiente a la fuente de excitación) se mantiene en un 50 % de los rayos.
- **(1,2,0.5):** indica que la longitud de onda 1 (617 nm) tiene un 50 % de probabilidad de transformarse en la longitud de onda 2 (650 nm), que representa la emisión fluorescente de las cianobacterias.

De esta forma, el modelo reproduce un escenario simplificado donde la mitad de la señal detectada corresponde a la luz directa de la fuente y la otra mitad a la fluorescencia reemitida. Esto permite reflejar de manera realista el comportamiento del sistema dentro de las limitaciones de la simulación.

En este enfoque, basta con utilizar un único detector, ya que la señal registrada puede extrapolarse a las cuatro fibras por simetría. Sin embargo, únicamente se considera válida la luz que incide en la zona correspondiente al núcleo de la fibra (ver **Figura 27**), dado que solo esa fracción puede acoplarse y ser guiada hacia el espectrómetro.

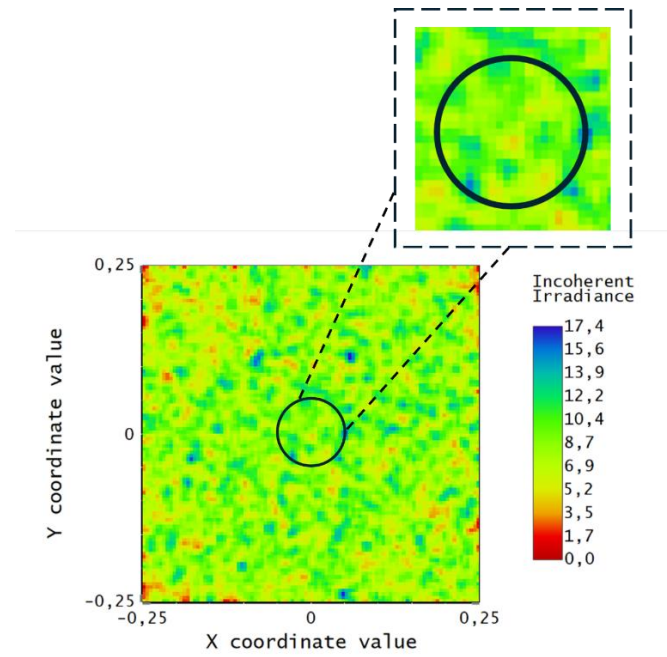


Figura 27: Distribución de la intensidad de luz simulada con Zemax OpticStudio en el detector situado en el borde del pozo. El círculo negro delimita la zona correspondiente al núcleo de la fibra, que es la única fracción de luz capaz de acoplarse y ser guiada hacia el espectrómetro. El recuadro superior amplía dicha región para visualizar con mayor detalle la señal detectada.

Capítulo 4: Metodología

Una vez definido el sistema completo, este capítulo se centra en la descripción de la metodología empleada para su desarrollo y validación. Se detallan los procedimientos experimentales realizados en laboratorio, incluyendo cada una de las etapas de fabricación del chip (apartado 4.1: Proceso de fabricación), el montaje completo del sistema óptico (apartado 4.2: Montaje del sistema) y la validación experimental (apartado 4.3: Validación experimental).

4.1 Proceso de fabricación

En este apartado se detalla de forma cronológica el proceso llevado a cabo para la fabricación del sistema de detección óptica desarrollado en este trabajo. Se comienza describiendo el procedimiento de grabado láser con femtosegundos utilizado para estructurar el chip de vidrio (apartado 4.1.1), seguido de las etapas de pulido (4.1.2) y ataque químico (apartado 4.1.3), necesarias para liberar los canales internos. Finalmente, se expone la fabricación de una estructura de soporte personalizada mediante impresión 3D, diseñada para mejorar la manipulación y protección del dispositivo.

4.1.1 Primera etapa del proceso ULAE: Grabado Láser

Tal y como se explicó previamente en el apartado 2.5.2, la tecnología ULAE (*Ultrafast Laser Assisted Etching*) consta de dos etapas principales: el grabado láser con pulsos ultrarrápidos y el posterior ataque químico selectivo. En este apartado se aborda únicamente la primera de ellas, correspondiente al grabado láser. Esta técnica se seleccionó por su elevada precisión, que permite generar geometrías tridimensionales en materiales transparentes como el vidrio, minimizando la generación de calor. En nuestro caso, se aplicó a un bloque de vidrio de sílice fundida, empleando un láser de femtosegundos ($1 \text{ fs} = 10^{-15} \text{ s}$).

El vidrio de sílice se limpia cuidadosamente antes del grabado, con el objetivo de eliminar cualquier residuo o impureza que pueda interferir en el proceso. Una vez limpio, se fija sobre un portavidrios mediante una gota de esmalte y este mismo a la plataforma móvil, lo que permite mantenerlo estable durante la inscripción sin dañar el material. Durante el proceso, el haz láser permanece fijo, y es la etapa móvil de precisión la que se desplaza para trazar las trayectorias deseadas en el interior del vidrio, permitiendo así la definición exacta de los canales y cavidades del chip. En las siguientes dos figuras se muestra el aspecto del chip tras completar esta primera etapa de grabado. Puede observarse que, salvo en las zonas sombreadas correspondientes a las áreas modificadas por la acción del láser, el material permanece aparentemente intacto, lo que confirma que el proceso de inscripción no daña el vidrio fuera de las regiones deseadas.

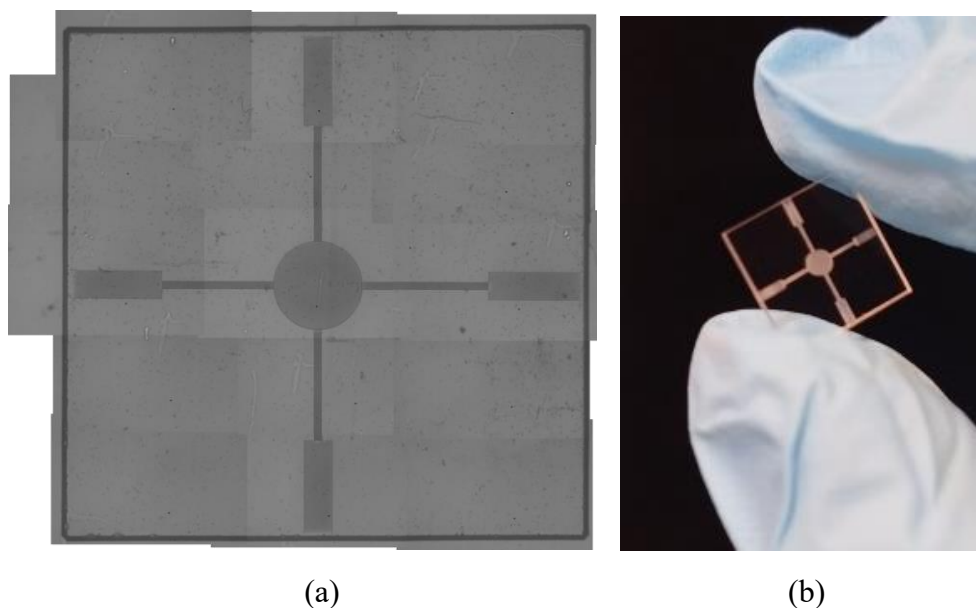


Figura 28: Figuras tomadas después de la inscripción y antes del *etching* (a) Reconstrucción del chip obtenida a partir de imágenes tomadas con el microscopio. Se aprecian los canales internos y la geometría general inscrita en el volumen del vidrio. (b) Fotografía del chip tomada con una cámara.

4.1.2 Proceso de pulido para exponer los canales

Una vez finalizado el grabado por láser, se observó que algunos canales no llegaban completamente hasta los extremos del chip, quedando ligeramente truncados en los laterales. Este detalle es relevante, ya que, durante el posterior proceso de ataque químico, esas zonas inaccesibles no serían correctamente disueltas, al no estar expuestas directamente al reactivo.

Para solventar este problema, se procedió al pulido de los cuatro lados del chip utilizando una pulidora. En este equipo, el chip se apoyaba sobre un brazo móvil que lo presionaba contra un plato giratorio cubierto con una lija, de manera que cada lateral se pulía de forma controlada al ir rotando la pieza. Este paso permitió eliminar los bordes del vidrio no grabados y exponer los extremos de los canales inscritos, asegurando así su comunicación directa con el exterior. Gracias a este pulido, el líquido de *etching* puede penetrar de forma homogénea desde ambos extremos de cada canal, permitiendo un ataque uniforme y completo. El estado final del chip tras esta etapa puede observarse en la **Figura 29**, donde se muestran imágenes representativas justo antes de proceder al ataque químico.

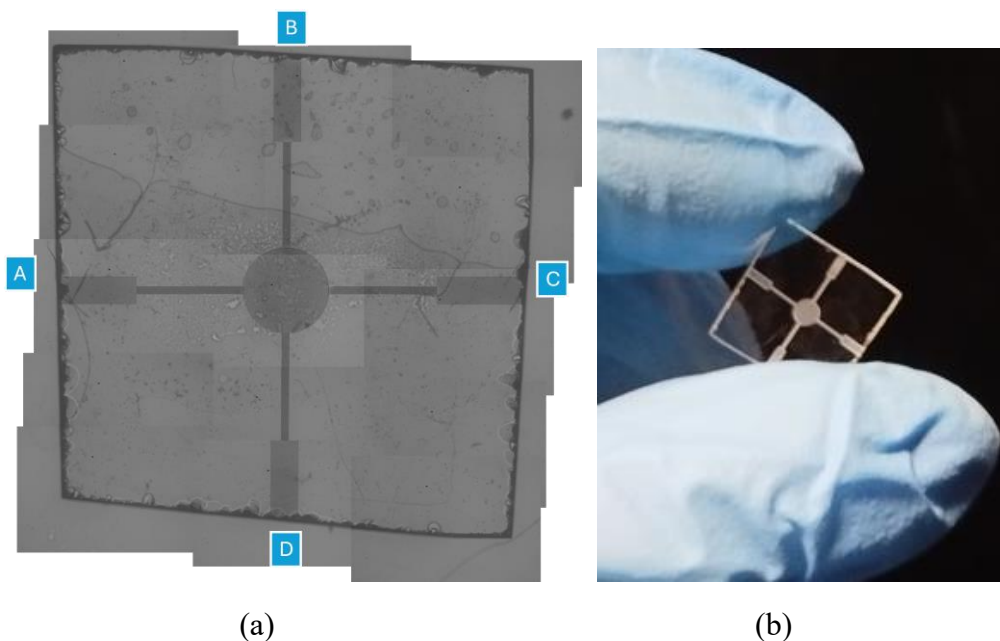


Figura 29: Figuras tomadas tras la etapa de pulido y antes del ataque químico (a) Reconstrucción a partir de fotografías microscópicas, con las etiquetas que identifican cada lateral. (b) Fotografía del chip real, donde también pueden observarse irregularidades en los laterales debidas a la pérdida de material durante el proceso de pulido.

No obstante, tras el proceso de pulido se observaron variaciones apreciables en las dimensiones del chip respecto a las medidas teóricas iniciales. Al retirar material con la pulidora se produjo una reducción no uniforme en los bordes laterales, lo que no solo modificó ligeramente el tamaño del chip, sino que también afectó la ortogonalidad y rectitud de los bordes. Esta alteración debe tenerse en cuenta en la etapa de montaje y diseño del soporte 3D.

Es importante señalar que el proceso de pulido afectó únicamente a la geometría exterior del chip y a la longitud de los canales internos en su tramo más ancho, destinado a la inserción de las fibras con recubrimiento plástico. En esta zona, el pulido permitió eliminar las partes truncadas, pero sin modificar la anchura de los canales. Por otro lado, ni las dimensiones del pozo central ni las de los tramos estrechos de los canales se vieron alteradas, ya que no fueron alcanzados por esta etapa. Las medidas obtenidas tras el pulido se recogen en la **Tabla 7** y se corresponden con los lados etiquetados como A, B, C y D en la **Figura 29**, lo que permite relacionar los valores numéricos con cada orientación del chip.

Etapa del proceso	Lado A (mm)	Lado B (mm)	Lado C (mm)	Lado D (mm)	Ángulos entre lados (°) AB,BC,CD,DA
Diseño teórico	10	10	10	10	90/90/90/90
Tras el pulido	9,19	9,4	9,86	9,72	87,9/89,97/ 85,88/96,24

Tabla 7: Comparativa de las dimensiones exteriores del chip antes y después del proceso de pulido. Se incluyen las longitudes de los cuatro lados y los ángulos entre ellos. Las medidas tras el pulido muestran desviaciones respecto al diseño teórico, manteniéndose inalteradas las dimensiones internas del pozo y los canales.

4.1.3 Etching

Una vez completado el grabado con láser y el pulido, el chip se somete a la segunda etapa del proceso ULAE: el ataque químico selectivo (*etching*). El objetivo de este paso es eliminar de forma selectiva las regiones del vidrio previamente modificadas. Para ello se utiliza una disolución al 5 % en masa de NaOH, preparada a partir de 5,7 g de hidróxido sódico (NaOH) disueltos en 108,4 g de agua destilada. Utilizar el 95% de agua y un 5% de NaOH permite obtener una mezcla suficientemente agresiva para actuar sobre las zonas alteradas sin comprometer la integridad estructural del resto del material.

Dado que el NaOH es un compuesto cáustico y puede liberar vapores irritantes, todo el procedimiento se realizó dentro de una campana extractora y con una ventilación adecuada del entorno, de manera que se garantizaran las condiciones de seguridad necesarias durante el ataque químico.

Además de la composición de la mezcla, la temperatura de la solución es un parámetro crítico durante el proceso. El chip se introdujo en la disolución a 85 °C, y se mantuvo una monitorización periódica de la temperatura, que se mantuvo estable en torno a ± 1 °C a lo largo de todo el ataque.

Para calcular el tiempo de inmersión necesario, se consideró la longitud total del canal más largo del chip, estimada en $10^4 \mu\text{m}$ (10 mm), y una velocidad de disolución típica de 300 $\mu\text{m/h}$. Se tomó como referencia este valor porque representa el caso más restrictivo: el canal más largo es el que requiere mayor tiempo para completarse, de modo que garantizando su apertura se asegura también la de los canales más cortos. El tiempo teórico de grabado se calculó como:

$$t = \frac{10^4 \mu\text{m}}{300 \mu\text{m/h}} \approx 33,33 \text{ h}$$

Como el reactivo ataca desde ambos extremos del canal, el recorrido efectivo se reduce a la mitad, lo que equivale a un tiempo final de exposición de:

$$t_{\text{final}} = \frac{33,33 \text{ h}}{2} \approx 16,65 \text{ h} \equiv 16\text{h y } 39 \text{ min}$$

En la práctica, sin embargo, se dejó el chip en la disolución durante un tiempo mayor (aproximadamente 21 h 45 min, desde las 13:05 h hasta las 10:50 h del día siguiente) con el objetivo de garantizar que todos los canales quedaran completamente abiertos.

Finalmente, el chip se lavó cuidadosamente con agua para detener la acción del reactivo y evitar que este continuara atacando el vidrio más allá de lo necesario.

Aunque en algunos casos puede ser necesario el uso de ultrasonidos (generan pequeñas burbujas en el agua que, al explotar, ayudan a limpiar y arrastrar posibles restos en los canales, funcionando como un lavado profundo), en este experimento no fue necesario, ya que el ataque fue limpio y uniforme. Para comprobar que los canales estaban completamente libres, se utilizó una varilla metálica fina que se introdujo manualmente en cada uno de los cuatro canales, verificando así que no quedaban obstrucciones tras el ataque químico, como se muestra en la **Figura 30**.

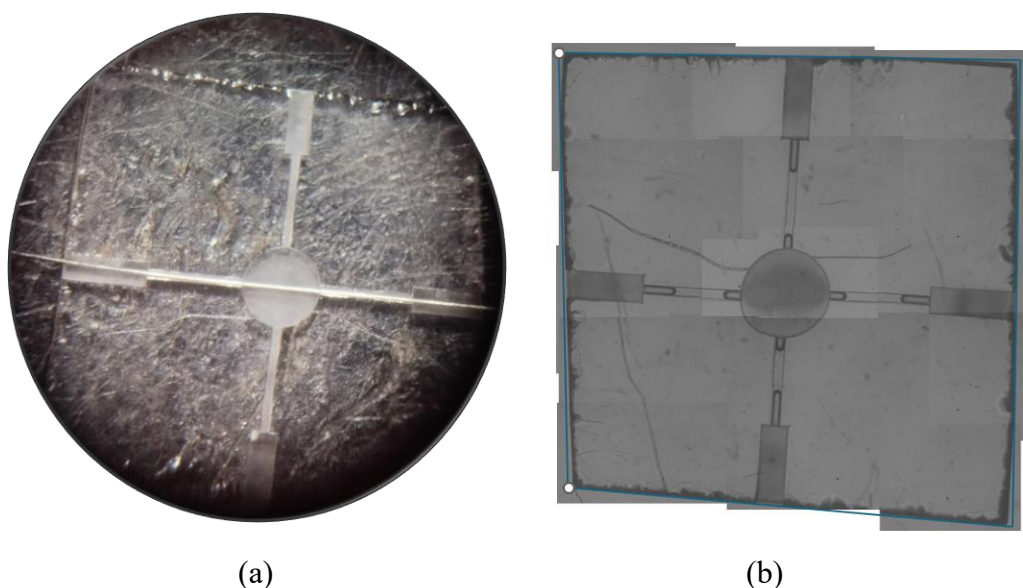


Figura 30: (a) Imagen tomada con microscopio binocular que muestra la cavidad central del chip tras el ataque químico, con los cuatro canales completamente abiertos y verificados mediante la inserción de un desatascador para asegurar su continuidad. (b) Imagen reconstruida del chip tras completar todas las etapas del proceso de fabricación, incluyendo grabado láser, pulido y ataque químico. Se observa la apertura completa de los canales radiales observando la entrada de líquido en los mismos.

Tras este último paso, las dimensiones de nuestro chip han variado ligeramente con respecto al inicio. En la **Tabla 8** se muestran las nuevas dimensiones asociadas a las etiquetas de la **Figura 31**, lo que permite analizar cómo se ha visto afectada la geometría final del dispositivo.

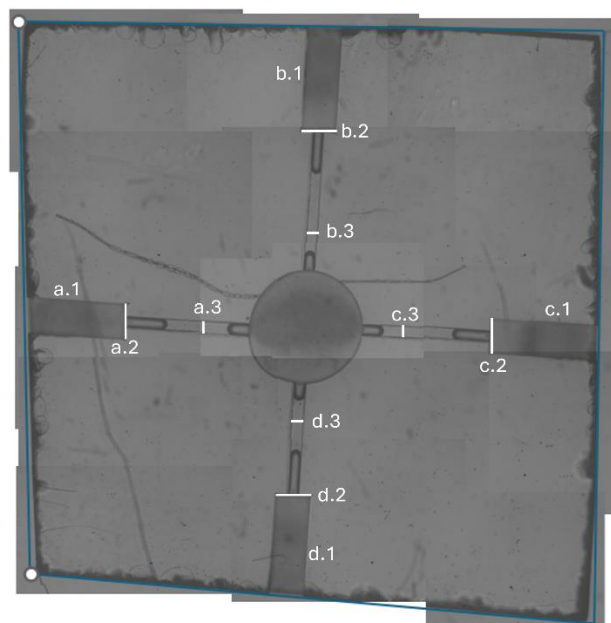


Figura 31:Imagen reconstruida del chip tras el proceso de grabado, pulido y ataque químico, donde se indican las dimensiones medidas de los canales y su disposición respecto al pozo central. Se aprecia la numeración asignada para cada segmento, utilizada posteriormente en la **Tabla 8** de comparación.

Etapas del proceso	a.1	a.2	a.3	b.1	b.2	b.3	c.1	c.2	c.3	d.1	d.2	d.3
Diseño teórico	2	0,550	0,155	2	0,550	0,155	2	0,550	0,155	2	0,550	0,155
Tras el pulido y etching	1,436	0,525	0,160	1,550	0,525	0,160	1,596	0,525	0,160	1,455	0,525	0,160

Tabla 8: Comparación de las dimensiones, todas en **mm**, de diseño y las dimensiones reales del chip tras los procesos de pulido y etching. Se muestran las longitudes correspondientes a cada segmento (ver **Figura 18**),

Hemos de tener en cuenta que los lados del chip y sus correspondientes ángulos no se ven alterados en este paso, por lo que mantienen las dimensiones especificadas en la **Tabla 7**. Respecto al diámetro del pozo, pasamos de los 1,75 mm de diseño a 1,77 mm medidos, debido al ataque químico, que actúa de manera general sobre todo el volumen del vidrio, afectando también a la geometría del pozo central.

4.1.4 Soporte en máquina 3D

Para mejorar la manipulación y protección del chip durante las fases experimentales, se diseñó y fabricó una estructura plástica de soporte mediante impresión 3D. Esta pieza fue modelada siguiendo las nuevas dimensiones y ángulos del chip tras pasar por el pulido y *etching*, permitiendo su encaje exacto y seguro. Su principal función es proporcionar estabilidad mecánica y portabilidad, evitando movimientos o vibraciones no deseadas durante su transporte o uso.

Además, se incorporó un soporte auxiliar en forma de bobina, colocado en la parte inferior de la estructura principal. Esta modificación permite enrollar y recoger las fibras ópticas cuando no se están utilizando, evitando así que queden sueltas o expuestas a daños accidentales. Esta mejora, sencilla pero efectiva, facilita el almacenamiento y la conservación del montaje completo entre experimentos.

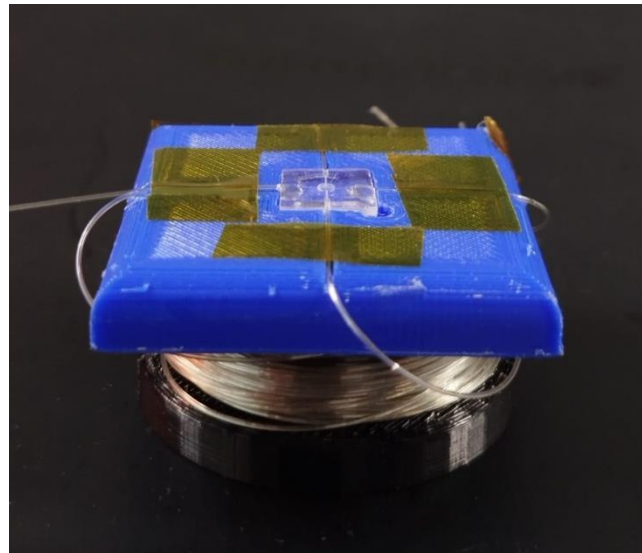


Figura 32: Sistema completo montado sobre el soporte impreso en 3D.

4.2 Montaje del sistema óptico

Una vez fabricados y preparados todos los elementos del sistema por separado: chip, fibras ópticas, soporte, muestra, fuente y detector, se procedió al montaje final del dispositivo óptico. Esta etapa consistió en la integración de las fibras ópticas en el chip y la preparación del conjunto para su funcionamiento completo.

El primer paso fue cortar segmentos de fibra óptica lo suficientemente largos como para garantizar la conexión con el espectrómetro en el laboratorio. Se optó por longitudes generosas, ya que cualquier exceso puede recogerse sin dificultad mediante el sistema de enrollado incorporado en la estructura impresa en 3D. A continuación, se procedió al pelado de la fibra, retirando cuidadosamente la cubierta plástica externa. Es importante destacar que

solo se peló la sección correspondiente a la parte que quedaría enterrada en el canal interno del chip, cuya longitud es de 2,14 mm. Esta medida se corresponde con el diseño original, que se ha mantenido intacto en la fabricación.

Una vez pelada, la fibra se limpió minuciosamente con alcohol etílico para eliminar cualquier residuo o partícula que pudiera interferir con la transmisión óptica. Seguidamente, se utilizó un *fiber cleaver*, herramienta especializada para obtener un corte perpendicular y limpio en el extremo de la fibra, lo que resulta esencial para maximizar el acoplamiento de luz. Finalmente, la fibra preparada se introdujo en los canales del chip con la ayuda de un microscopio binocular, lo que permitió comprobar visualmente su correcta alineación y ajuste. Este proceso se repitió para cada una de las cuatro fibras, quedando fijadas en sus respectivos canales, como se muestra en la **Figura 33**.

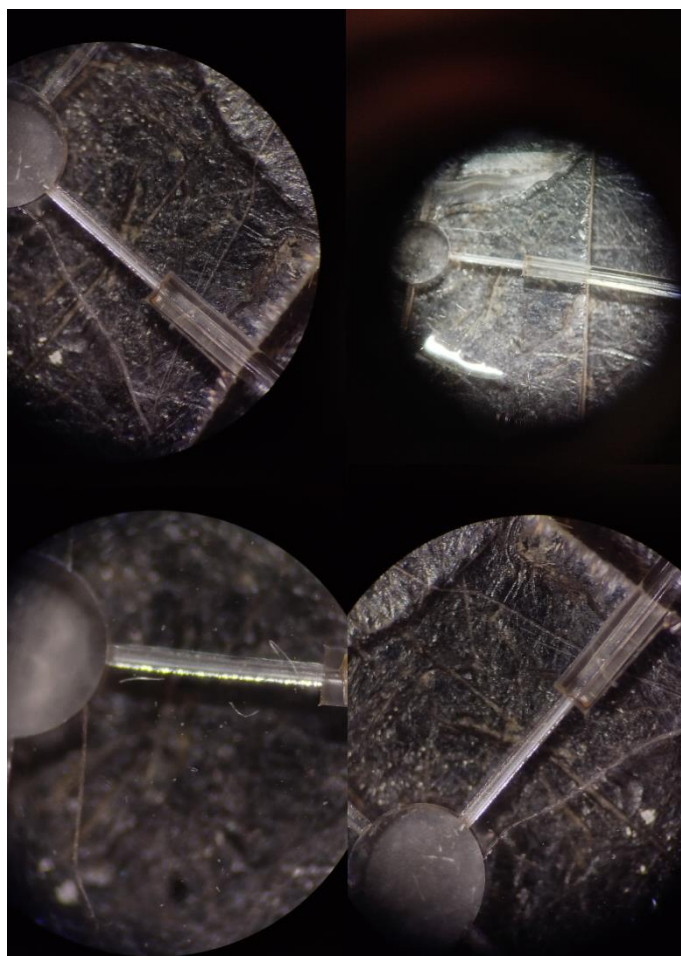


Figura 33: Imágenes tomadas con microscopio binocular que muestran la inserción precisa de las cuatro fibras ópticas en los canales del chip. Se aprecia el acoplamiento correcto entre las fibras peladas y la cavidad central de análisis.

Una vez verificado que la fibra óptica estaba correctamente alineada y encajada en su canal correspondiente, se procedió a su fijación definitiva. Para ello, se aplicó una pequeña gota de adhesivo óptico en la zona de la fibra que quedaba fuera del vidrio, es decir, la parte no enterrada en el canal. Este tipo de pegamento está específicamente formulado para aplicaciones ópticas y requiere curado mediante exposición a luz ultravioleta.

Para asegurar una polimerización completa y homogénea del adhesivo, se utilizó una lámpara UV, posicionada estratégicamente en distintos ángulos alrededor del chip, lo que permitió un secado uniforme en toda la superficie. El proceso de curado se realizó de manera individual para cada fibra, aplicando aproximadamente 3 minutos de exposición a máxima intensidad. De este modo, tras repetir el procedimiento en las cuatro fibras, todas quedaron firmemente fijadas y correctamente alineadas en sus respectivos canales.

Una vez fijadas las cuatro fibras ópticas y comprobada su estabilidad, se procedió a colocar cuidadosamente el chip en la estructura impresa en 3D diseñada previamente. Con este paso se dio por finalizado el montaje del chip con sus fibras integradas en el soporte, quedando el conjunto listo para su conexión con los elementos ópticos externos (fuente de excitación y espectrómetro) y su posterior puesta en funcionamiento.

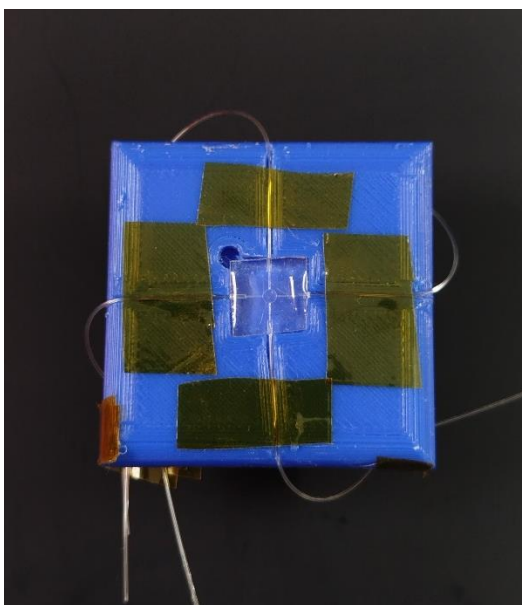


Figura 34: Vista superior del sistema montado sobre la estructura impresa en 3D, con las fibras ópticas fijadas e insertadas en el chip, listo para su conexión al espectrómetro.

4.3 Validación experimental

En esta etapa se llevó a cabo la puesta en marcha y la comprobación funcional del sistema completo, verificando que cada una de las fibras ópticas acopladas al chip fuese capaz de recoger señal de forma individual. Como referencia, se empleó también un LoC con pozo cuadrado, que permitió realizar posteriormente una comparación directa de los resultados obtenidos con nuestro prototipo.

El procedimiento comenzó comprobando fibra a fibra. Para cada prueba se procedió a preparar la fibra óptica correspondiente y colocarla en un conector comercial que garantizase un acoplamiento estable con el espectrómetro.

Con el fin de organizar las pruebas experimentales y facilitar el análisis de los resultados, se procedió a numerar individualmente cada una de las fibras ópticas insertadas en el chip, tal y como se muestra en la **Figura 35**. Esta numeración permitió identificar en todo momento qué fibra estaba en uso durante cada medida, asegurando la trazabilidad del experimento y evitando confusiones entre configuraciones. Gracias a este sistema de referencia, fue posible comparar de manera ordenada el comportamiento de cada fibra de forma individual, así como analizar de manera más clara las distintas combinaciones empleadas en las sesiones de medida.

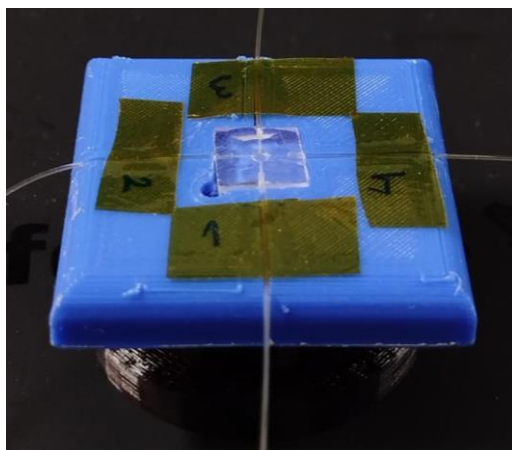


Figura 35: Chip montado sobre el soporte de plástico, donde se aprecian las cuatro fibras ópticas fijadas con cinta adhesiva y numeradas del 1 al 4. Esta numeración se empleó posteriormente para identificar cada canal durante las medidas y facilitar el análisis comparativo de los resultados.

Una vez las fibras listas y numeradas, se procedió a la preparación de la muestra. Para ello se utilizó una pipeta, la cual debía cargarse con la cantidad exacta de muestra líquida necesaria para llenar el pozo central del chip. Este volumen se calculó a partir de la geometría del pozo, considerado como un cilindro de altura $h = 0,5 \text{ mm}$ y radio $r = 0,887 \text{ mm}$. Aplicando la fórmula del volumen del cilindro:

$$V = \pi r^2 h$$

$$V = \pi \cdot (0,887 \text{ mm})^2 \cdot 0,5 \text{ mm} = 1,227 \text{ mm}^3$$

Dado que $1 \text{ mm}^3 = 1 \mu\text{L}$, el volumen calculado corresponde a $1,227 \mu\text{L}$. En la práctica se cargó aproximadamente $1 \mu\text{L}$ de muestra por simplicidad (la pipeta va de $0,5$ - $10 \mu\text{L}$).

Una vez preparado el chip con la muestra, se colocó la primera fibra en el espectrómetro y se realizó la medición correspondiente. Este procedimiento se repitió de forma independiente para cada una de las cuatro fibras, verificando así la correcta propagación de la señal y la capacidad de detección individual de cada canal.

A continuación, se procedió a evaluar el sistema utilizando dos, tres y cuatro fibras simultáneamente, explorando todas las combinaciones posibles entre los cuatro canales disponibles.

Para ello fue necesario replantear el acoplamiento al espectrómetro, ya que no disponíamos de un conector comercial que permitiese unir dos fibras ópticas en una misma entrada. Como solución práctica se planteó una primera idea: la Configuración 1. En esta primera aproximación, se evaluó el rendimiento del sistema cuando todas las fibras ópticas se acoplaron de manera conjunta a través de una misma aguja conectada al espectrómetro. Esta configuración, además de simplificar en principio el montaje experimental, requiere un alineamiento manual muy precisa de las fibras en el interior de la aguja, lo cual resulta una tarea especialmente compleja y delicada. Para obtener las distintas medidas, se procedió a retirar las fibras de forma individual, registrando los espectros en cada caso hasta completar el análisis con todas ellas.

De este modo se evaluaron todas las configuraciones posibles en esta configuración, registrando la señal obtenida en cada caso. En total se consideraron **15 combinaciones distintas**: cuatro con una sola fibra, seis con pares de fibras, cuatro con tres fibras y una con las cuatro fibras simultáneamente. Para mantener el control del procedimiento, cada fibra fue previamente etiquetada con un número identificador.

Esta estrategia respondía a la idea más directa de coleccionar la señal de forma conjunta, pero no tenía en cuenta la geometría real de la entrada del detector, basada en una rendija (*slit*). Para adaptar mejor el acoplamiento a esta condición experimental, se planteó una segunda configuración en la que cada fibra se insertó en una aguja independiente montada en un tapón adaptado al espectrómetro. El tapón incorporaba cuatro orificios alineados, cada uno con su respectiva aguja, de modo que las salidas de las fibras quedaban paralelas y ordenadas frente al plano de detección. De este modo se buscaba optimizar el acoplamiento óptico y permitir que la señal de múltiples fibras se registrase de forma más eficiente en el detector. En esta configuración se realizaron cuatro medidas, correspondientes a la disposición de cuatro, tres, dos y una fibra en línea.

Por último, para disponer de una comparación directa con nuestro prototipo, se realizaron medidas sobre el LoC de referencia con pozo cuadrado. Dado que su cavidad presenta geometría y dimensiones distintas, fue necesario calcular previamente el volumen de muestra a dispensar. A partir de las medidas del lado y la profundidad del pozo:

$$V = \text{lado} \cdot \text{lado} \cdot \text{profundidad}$$

$$V = 10 \cdot 10 \cdot 0,5 = 50 \text{ mm}^3$$

Y dado que $1 \text{ mm}^3 = 1 \mu\text{L}$, se obtuvo un volumen de $50 \mu\text{L}$, que se cargó con la pipeta. El protocolo de medida fue análogo al descrito en las configuraciones anteriores: cargar la muestra, alineación de las fibras, adquisición espectral y posterior procesado bajo las mismas condiciones, en este caso, bajo la Configuración I.

Capítulo 5: Resultados y análisis

En este capítulo se presentan y analizan los resultados experimentales obtenidos a partir del sistema de detección óptica desarrollado. Tras las fases de diseño, fabricación y montaje del dispositivo, se llevaron a cabo diferentes pruebas en el laboratorio con el objetivo de evaluar su funcionamiento y capacidad para detectar la fluorescencia emitida por muestras líquidas de cianobacterias.

Para simplificar la interpretación global de los resultados, el análisis se ha organizado en función del número de fibras en uso, considerando los casos de una, dos, tres y cuatro fibras simultáneamente. En cada situación se muestran y discuten los espectros obtenidos, analizando la capacidad del sistema para recoger la señal y detectar la fluorescencia en relación con el grado de acoplamiento óptico alcanzado.

Además, se comparan dos métodos de conexión al espectrómetro: por un lado, introduciendo todas las fibras en una misma aguja (Sección 5.1, Primera configuración), y por otro, insertando cada fibra en una aguja independiente (Sección 5.2, Segunda configuración). Finalmente, se incluye un análisis comparativo con un dispositivo de referencia (LoC con pozo cuadrado), descrito en la Sección 5.3

El análisis detallado y exhaustivo de todos los resultados de cada una de las combinaciones de fibras evaluadas se incluye en el **Anexo I**, donde se estudian de forma sistemática todas las configuraciones posibles.

5.1 Primera configuración

El objetivo de este estudio fue comprobar la capacidad del sistema para recolectar la señal de manera integrada, así como identificar las limitaciones derivadas de las pérdidas de acoplamiento y de la dificultad en la manipulación manual.

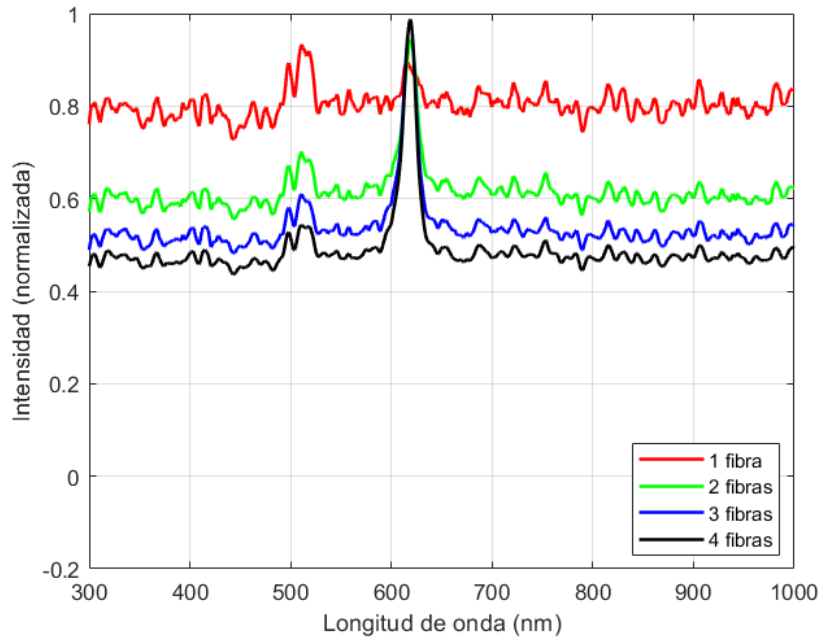


Figura 36: Espectros de emisión de fluorescencia normalizados obtenidos al medir con 1, 2, 3 y 4 fibras ópticas del LoC, acopladas conjuntamente a través de una misma aguja al espectrómetro. Se observa el pico dominante de la fuente de excitación (~ 617 nm) y un fondo ruidoso que dificulta discernir la fluorescencia en la zona ~ 650 nm.

Al analizar los espectros obtenidos con 1, 2, 3 y 4 fibras acopladas conjuntamente (**Figura 36**), se observa en todos los casos un pico estrecho alrededor de 617 nm, atribuible a la fuente de excitación (SuperLED rojo). Es importante destacar que, todos los espectros mostrados corresponden al promedio de varias medidas realizadas para cada configuración de número de fibras.

En la configuración de una fibra (curva roja) se observa un nivel de ruido elevado, lo que dificulta distinguir con claridad la posible contribución de fluorescencia en torno a 650 nm. Al pasar a la configuración de dos fibras (curva verde), el espectro muestra una ligera mejora: el pico de fluorescencia comienza a definirse de manera más clara, aunque el ruido de fondo sigue siendo considerable.

En las configuraciones de tres (curva azul) y cuatro fibras (curva negra) la señal se estabiliza y el nivel de ruido disminuye. En particular, con cuatro fibras ya se aprecia con mayor claridad una elevación alrededor de 650 nm, compatible con la fluorescencia esperada, lo que indica que el acoplamiento simultáneo de varias fibras contribuye a mejorar la relación señal/ruido del sistema.

5.2 Segunda configuración

Con el objetivo de ajustar de manera más precisa el acoplamiento óptico, se propuso una segunda configuración en la que las fibras se dispusieron en línea, adaptándose a la geometría de la rendija (*slit*) de entrada del detector, como se comentó en el apartado 4.3. Como contrapartida, esta disposición requiere una alineación manual fina de la fila de agujas con la entrada del espectrómetro, lo que introduce cierta variabilidad entre medidas.

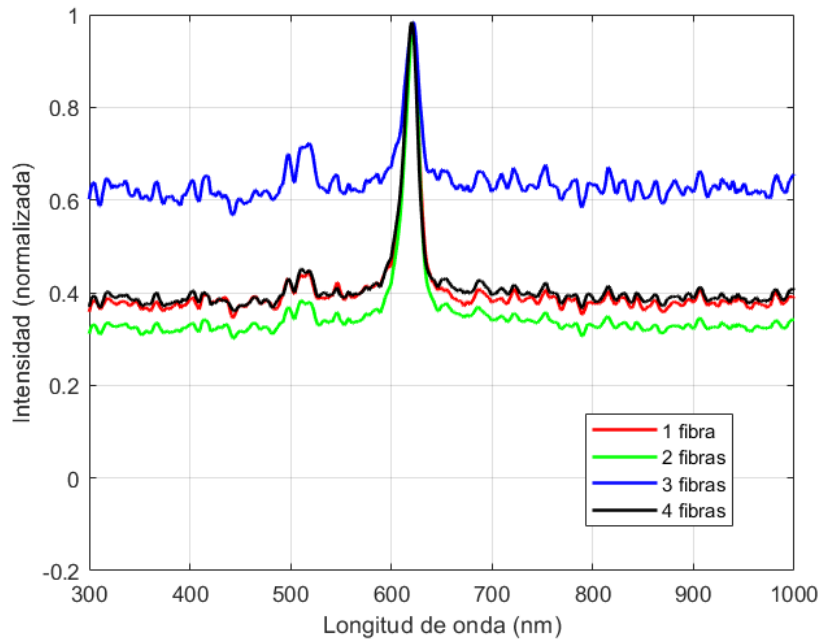


Figura 37: Espectros de emisión de fluorescencia normalizados obtenidos con 1, 2, 3 y 4 fibras ópticas del LoC en la segunda configuración, con alineación individual frente a la rendija (*slit*) de entrada del espectrómetro. Se observa el pico estrecho de excitación en ~ 617 nm y una elevación de la línea base alrededor de ~ 650 nm asociada a la fluorescencia. La visibilidad de esta emisión mejora al incrementar el número de fibras, alcanzando su máxima definición con cuatro fibras.

En la **Figura 37** se muestran los espectros normalizados obtenidos al acoplar cada fibra en una aguja independiente, correspondientes a la segunda configuración. Esta disposición permite un acoplamiento más acorde con la geometría de la rendija del espectrómetro y se refleja en una mejora de la relación señal-ruido en la región de emisión. Esta mejora en la relación señal-ruido se debe a que más señal entra de manera eficiente, por lo tanto, la señal útil aumenta respecto al ruido.

En todos los casos se identifica un pico estrecho en ~ 617 nm, correspondiente a la banda de excitación. A su derecha se observa una elevación del espectro en torno a 650 nm, que se distingue con mayor nitidez que en la configuración anterior y facilita la discriminación de la fluorescencia de las cianobacterias. Cabe destacar la curva de 4 fibras, que presenta la mejor visibilidad de la emisión y el menor ruido relativo, coherente con una mayor área de captación efectiva y, por tanto, con mayor sensibilidad del sistema.

No obstante, se observa que la traza de 3 fibras muestra una intensidad media superior al resto. Este efecto se atribuye a diferencias de acoplamiento derivadas del ajuste manual y no a un comportamiento intrínseco de la configuración con tres fibras. En conjunto, los resultados confirman que el acoplamiento individual de las fibras mejora la sensibilidad

frente a la guía única y que el rendimiento del sistema aumenta con el número de fibras utilizadas.

5.3 Dispositivo de referencia: LoC con pozo cuadrado

Para comparar el rendimiento de nuestro prototipo con un dispositivo de referencia, se realizaron medidas en las mismas condiciones experimentales sobre el LoC de pozo cuadrado descrito en el apartado 2.3 Optimización geométrica en sistemas ópticos, desarrollado por investigadores de la Universidad de Cantabria [39]. Se mantuvo la misma fuente de excitación, el espectrómetro (aunque en este caso en saturación) y el procesamiento de datos, de modo que las diferencias observadas puedan atribuirse al diseño del chip y al acoplamiento óptico.

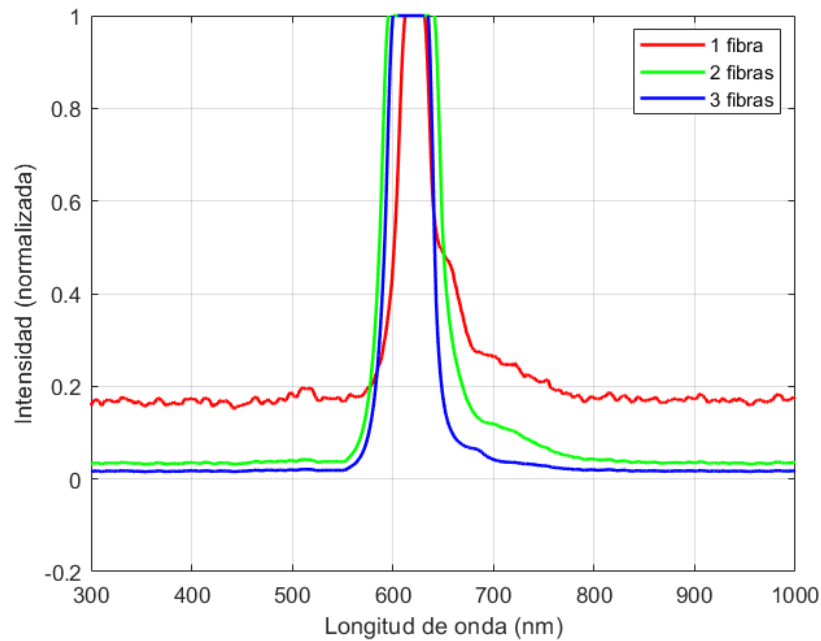


Figura 38: Espectros de emisión de fluorescencia normalizados obtenidos al medir con 1, 2 y 3 fibras ópticas del LoC de referencia (pozo cuadrado). En este caso, las medidas se adquirieron en condiciones de saturación del detector, lo que provoca el recorte del pico dominante de la fuente de excitación (~ 617 nm). A partir de ~ 640 nm se distingue la región de emisión, cuya visibilidad mejora al incrementar el número de fibras, mientras que el ruido aparente disminuye por efecto de la saturación.

Para realizar una comparación adecuada, es importante tener en cuenta que las medidas del LoC de referencia se adquirieron con el detector en saturación, a diferencia de nuestras medidas. Esta condición hace que el espectro del dispositivo de referencia presente menor ruido de fondo, pero impide una comparación cuantitativa de intensidades. Además, aunque el diseño original contemplaba cuatro fibras, durante la medición una de ellas se fracturó, por lo que esta serie incluye únicamente 1, 2 y 3 fibras. Aun así, la tendencia es clara: al aumentar el número de fibras, mejora la calidad de la señal y se potencia la visibilidad del pico de emisión de las cianobacterias (~ 650 nm). En consecuencia, la comparación debe interpretarse en términos cualitativos (presencia y claridad de la banda de emisión), y no en función de intensidades.

Capítulo 6: Limitaciones del sistema y análisis de causas

A lo largo del desarrollo experimental del sistema, surgieron diversos inconvenientes que afectaron de manera directa a la calidad y fiabilidad de las mediciones obtenidas. Estos inconvenientes no solo limitaron el rendimiento del prototipo en las condiciones actuales, sino que también ofrecieron información valiosa para comprender mejor las limitaciones del montaje. En este capítulo se exponen los principales problemas detectados, las hipótesis planteadas para explicar su origen y el razonamiento que llevó a identificarlos, con el fin de sentar las bases para futuras mejoras y optimizaciones del sistema.

6.1 Baja fluorescencia detectada

El principal problema observado durante las pruebas fue la baja intensidad de la señal de fluorescencia. Tras descartar que se debiera a fallos en las fibras ópticas o en el acoplamiento (ya que se recogía sin dificultad la señal del super-LED de excitación), se determinó que la causa más probable estaba relacionada con el reducido volumen del pozo central.

Un volumen tan pequeño implica dos limitaciones críticas:

- **Secado rápido de la muestra:** al ser excitada durante periodos prolongados con el super-LED, la muestra se evaporaba rápidamente, obligando a reponerla de forma continua.
- **Baja cantidad de cianobacterias:** el pequeño volumen contenía una cantidad reducida de organismos emisores, lo que disminuía la intensidad de fluorescencia detectada.

Además, este reducido tamaño complicaba la alineación manual del super-LED, ya que era difícil iluminar únicamente el pozo sin que el haz impactara directamente sobre alguna fibra, evitando así el paso de la luz a través del agua y reduciendo la fluorescencia efectiva.

6.2 Alineación manual

Tanto en la configuración inicial (todas las fibras en una única aguja) como en la configuración alternativa (línea de agujas acoplada al espectrómetro), la alineación con el plano de detección del espectrómetro se realizó manualmente. Este procedimiento, aunque viable, no garantiza precisión absoluta y puede provocar pérdidas de señal significativas si alguna fibra no coincide con la zona activa del detector o si no todas se encuentran correctamente niveladas.

En la configuración en línea, aunque el uso de un tapón acoplado al espectrómetro facilita el montaje, resulta imprescindible verificar que todas las fibras queden alineadas tanto en altura como en posición. Una fibra retrasada respecto a las demás no transmitirá luz de forma eficaz al detector. Esta limitación se presenta en ambas configuraciones, con el añadido de que en la disposición en línea es necesario ajustar manualmente la coincidencia

entre la fila de fibras y la del detector, lo que incrementa el riesgo de desalineación y pérdidas parciales de señal.

6.3 Posible daño en fibras ópticas

Durante las pruebas del segundo día se observó que la fibra 3 ofrecía resultados anómalos respecto a las demás. En mediciones donde participaba, la intensidad total descendía drásticamente, e incluso configuraciones con una sola fibra (excluyendo la 3) daban señales superiores.

Capítulo 7: Conclusiones y líneas futuras

7.1 Conclusiones

El objetivo de este Trabajo Fin de Grado fue diseñar, fabricar, montar y validar un sistema Lab-on-Chip para la detección óptica de cianobacterias en agua mediante fluorescencia.

El trabajo comenzó con el proceso de fabricación del chip, que incluyó todas las fases necesarias para obtener una estructura funcional en sílice. A continuación, se procedió al montaje del sistema completo, integrando las fibras ópticas y el soporte impreso en 3D, y finalmente se llevó a cabo la validación experimental del prototipo.

En esta fase de validación se probaron dos configuraciones distintas de acoplamiento de luz al espectrómetro. En la primera configuración, todas las fibras se acoplaron de manera conjunta a través de una única aguja conectada al detector. En la segunda configuración, por el contrario, se insertó cada fibra en una aguja independiente, de modo que sus salidas quedaban alineadas con la rendija (*slit*) del espectrómetro, obteniéndose una mejor respuesta en esta segunda configuración. Además, los resultados pusieron de manifiesto que, a mayor número de fibras, se incrementa la intensidad de la fluorescencia registrada y se pudo justificar con la simulación según el área de la zona de captación.

La segunda configuración mostró un mejor desempeño porque el acoplamiento y la disposición de las fibras coincidían con la geometría de la rendija (*slit*) del espectrómetro, lo que permitió un acoplamiento más eficiente de la señal. Estos hallazgos constituyen una evidencia experimental clara de la relevancia del diseño geométrico en la optimización del sistema.

A su vez, nuestro modelo óptico en Zemax OpticStudio permitió analizar la propagación de la luz en el interior del chip y determinar qué zona del pozo contribuía efectivamente a la recogida de fluorescencia. Con base en este estudio, se propuso una nueva geometría del pozo, con forma de estrella de cuatro puntas adaptada a dicha región de interés, con el objetivo de optimizar la captación de la señal fluorescente y mejorar el rendimiento global del sistema. La combinación de los resultados experimentales y de simulación ha aportado una visión más completa sobre las limitaciones del prototipo y sobre las posibilidades de mejora.

En conjunto, el proyecto ha proporcionado una validación experimental y un análisis de simulación que permiten comprender mejor el comportamiento del sistema LoC compuesto por el pozo y las cuatro fibras, y orientan hacia posibles optimizaciones en futuras versiones del dispositivo.

7.2 Líneas Futuras

Los resultados obtenidos y la experiencia adquirida durante el desarrollo del trabajo abren la puerta a nuevas oportunidades de mejora y expansión. Estas posibles líneas futuras no solo permitirían perfeccionar el sistema actual, sino también explorar su adaptación a diferentes contextos experimentales o aplicaciones prácticas.

Una de las líneas futuras principales consiste en la fabricación de un nuevo *Lab-on-Chip* que integre las ventajas del prototipo actual con las lecciones aprendidas de otros diseños de referencia. En particular, se propone mantener elementos positivos del chip fabricado, como la presencia de una doble anchura en la entrada del canal, que garantiza que solo el conjunto *core-cladding* esté en contacto con el líquido, y la conservación del recubrimiento plástico en el borde del chip, lo que aporta mayor seguridad mecánica y flexibilidad estructural.

No obstante, resulta necesario incrementar el tamaño del pozo central, ya que el actual limita en exceso la cantidad de muestra disponible.

Asimismo, a partir de los resultados de simulación se plantea explorar nuevas geometrías de pozo más eficientes. En las simulaciones se observó que los rayos dentro del chip generan un patrón en forma de estrella de cuatro puntas, aprovechándose únicamente en torno al 45,3 % de la señal. Por ello, se propone el diseño de un pozo adaptado a esa forma, colocando las cuatro fibras ópticas en los vértices de un rombo, de modo que se maximice la captación de la fluorescencia emitida.

En este trabajo, el sistema se ha aplicado inicialmente a la detección de fluorescencia en cianobacterias. A partir de esta base, se plantea evaluar su comportamiento con distintos tipos de muestras o fluoróforos, lo que permitirá valorar la versatilidad y adaptabilidad del sistema a otros ámbitos, como el análisis químico, biomédico o medioambiental.

Otra línea de desarrollo interesante consiste en el diseño de un encapsulado completo del sistema, que permita integrar el chip, las fibras ópticas, la fuente de luz y la conexión al espectrómetro mediante conectores comerciales en una única estructura compacta y robusta. Este encapsulado no solo mejoraría la portabilidad y la protección mecánica del conjunto (especialmente de las fibras, reduciendo el riesgo de rotura), sino que también eliminaría la necesidad de realizar alineaciones y acoplamientos manuales, mitigando así uno de los principales problemas detectados durante las pruebas experimentales, como se comentó en el Capítulo 6.

En conjunto, estas líneas futuras permiten trazar un camino claro hacia el perfeccionamiento del sistema desarrollado, tanto desde el punto de vista de la optimización óptica como de su aplicación práctica, y abren la puerta a una segunda fase de desarrollo más avanzada y especializada.

Anexo I: Resultados experimentales detallados

Como complemento al análisis presentado en el Capítulo 5, en este anexo se desarrolla un estudio más exhaustivo de los resultados experimentales. En lugar de agruparlos únicamente por el número de fibras activas, se examinan todas las combinaciones posibles de fibras, analizando de forma individual cada caso y comparando sus comportamientos. Este enfoque permite identificar diferencias específicas entre fibras, evaluar la influencia de la posición y extraer observaciones más precisas acerca de la respuesta del sistema, aportando información adicional que enriquece y matiza las conclusiones generales expuestas en el documento principal.

Anexo I.1) Primer día de medidas: prueba individual y total

En una primera sesión experimental, se realizaron medidas individuales para cada una de las cuatro fibras ópticas insertadas en el chip. El objetivo de esta fase era comprobar si cada canal era capaz de guiar la señal óptica de manera independiente hasta el espectrómetro. Para ello, se introdujo una única fibra en el detector mediante un adaptador comercial y se registró la señal espectral resultante. Se repitió dicho proceso con las cuatro fibras.

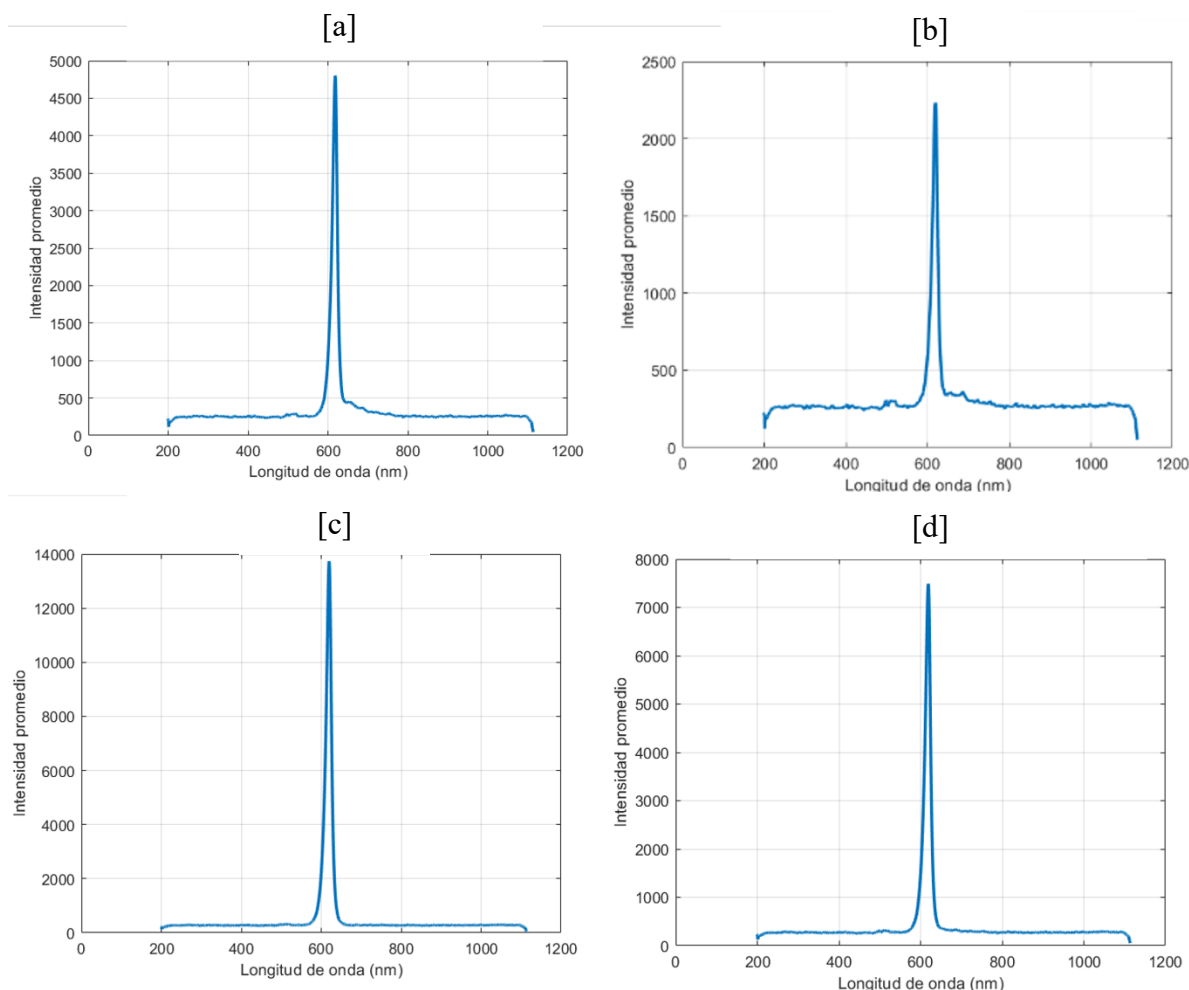


Figura 39: Promedios espectrales obtenidos individualmente para cada fibra. **a)** Promedio espectral de la fibra 1. **b)** Promedio espectral de la fibra 2. **c)** Promedio espectral de la fibra 3. **d)** Promedio espectral de la fibra 4.

Se puede observar que todas las fibras ópticas son capaces de guiar luz, ya que en cada uno de los espectros aparece claramente el pico correspondiente a la emisión del LED rojo utilizado como fuente de excitación. En particular, en las gráficas correspondientes a las fibras 1 y 2 se aprecia una ligera elevación del espectro hacia la derecha del pico principal, lo cual indica la presencia de fluorescencia emitida por las cianobacterias. Esta señal, aunque tenue, representa la emisión secundaria generada por la muestra tras la excitación. Las diferencias en la intensidad registrada entre unas fibras y otras se deben al ajuste manual realizado sobre la fuente de iluminación durante la sesión experimental, con el objetivo de optimizar visualmente el espectro captado en cada caso.

Posteriormente, se conectaron simultáneamente las cuatro fibras al espectrómetro utilizando una aguja que permitía su acoplamiento conjunto al espectrómetro mediante un

tapón. Esta configuración buscaba comprobar el rendimiento global del sistema en condiciones de máxima recogida de señal.

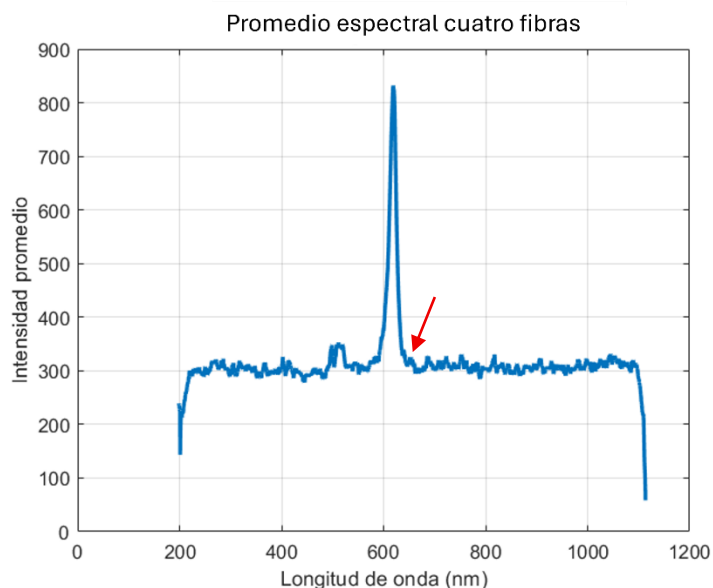


Figura 40: Promedio espectral obtenido al utilizar simultáneamente las cuatro fibras ópticas conectadas al espectrómetro. Se observa claramente el pico correspondiente a la fuente de excitación (LED rojo), así como una leve elevación del espectro en la zona próxima a 650 nm, indicativa de la fluorescencia emitida por las cianobacterias presentes en la muestra.

Aunque la combinación de las cuatro fibras ópticas en esta configuración tenía como objetivo maximizar la recolección de señal, los resultados obtenidos no mostraron una mejora tan significativa como se esperaba. Si bien el pico correspondiente a la fuente de excitación se identifica con claridad, la señal de fluorescencia emitida por las cianobacterias apenas presenta una elevación sutil en la zona esperada del espectro (alrededor de 650 nm). Esta leve mejora sugiere que parte de la fluorescencia está siendo recogida, pero no con la intensidad esperada. Este comportamiento puede deberse a diversas limitaciones experimentales, como el alineamiento de las fibras, la calidad del acoplamiento óptico o el secado de la muestra durante la medición, que reducen la eficiencia de captura de la señal fluorescente. Estos inconvenientes, junto con sus posibles causas y soluciones, serán analizados en detalle en el capítulo siguiente.

Por ello, se planificó una segunda jornada de medidas con un enfoque más exhaustivo. En esta nueva sesión experimental se explorarán diferentes combinaciones de fibras y configuraciones de acoplamiento con el objetivo de maximizar la fluorescencia registrada.

Anexo I. 2) Segundo día de medidas: Medidas exhaustivas

En esta segunda jornada de medidas, fue necesario preparar nuevamente las fibras ópticas. Para ello, se peló un nuevo tramo de cada una, asegurando una limpieza cuidadosa y un corte perfectamente perpendicular (a 90 °), ya que la calidad del extremo de la fibra es un factor clave para garantizar una transmisión eficiente de la luz.

Anexo I. 2.1) Primera configuración: Fibras acopladas en una única guía óptica

La primera configuración empleada consistió en utilizar un cable de fibra óptica comercial conectado directamente al espectrómetro. En el extremo opuesto del cable, se insertó una aguja dentro de un tapón de silicona, el cual actuó como guía para alinear e insertar todas las fibras simultáneamente.

Con el objetivo de realizar un estudio más exhaustivo del sistema, se organizaron las mediciones en bloques. En cada bloque se midió con tres fibras introducidas en la aguja, y posteriormente se fueron retirando una a una para realizar las combinaciones restantes (dos fibras y una fibra). Esta estrategia permitió evaluar de forma comparativa el rendimiento del sistema en función del número de fibras y comprobar la efectividad del acoplamiento óptico en cada caso.

Es importante destacar que, en todos los espectros obtenidos, la ausencia de señal por debajo de 200 nm corresponde al rango de medida del espectrómetro, y la línea vertical observada en esa región es un artefacto instrumental, no un pico real de fluorescencia.

A continuación, se analizará cada bloque.

Bloque I:

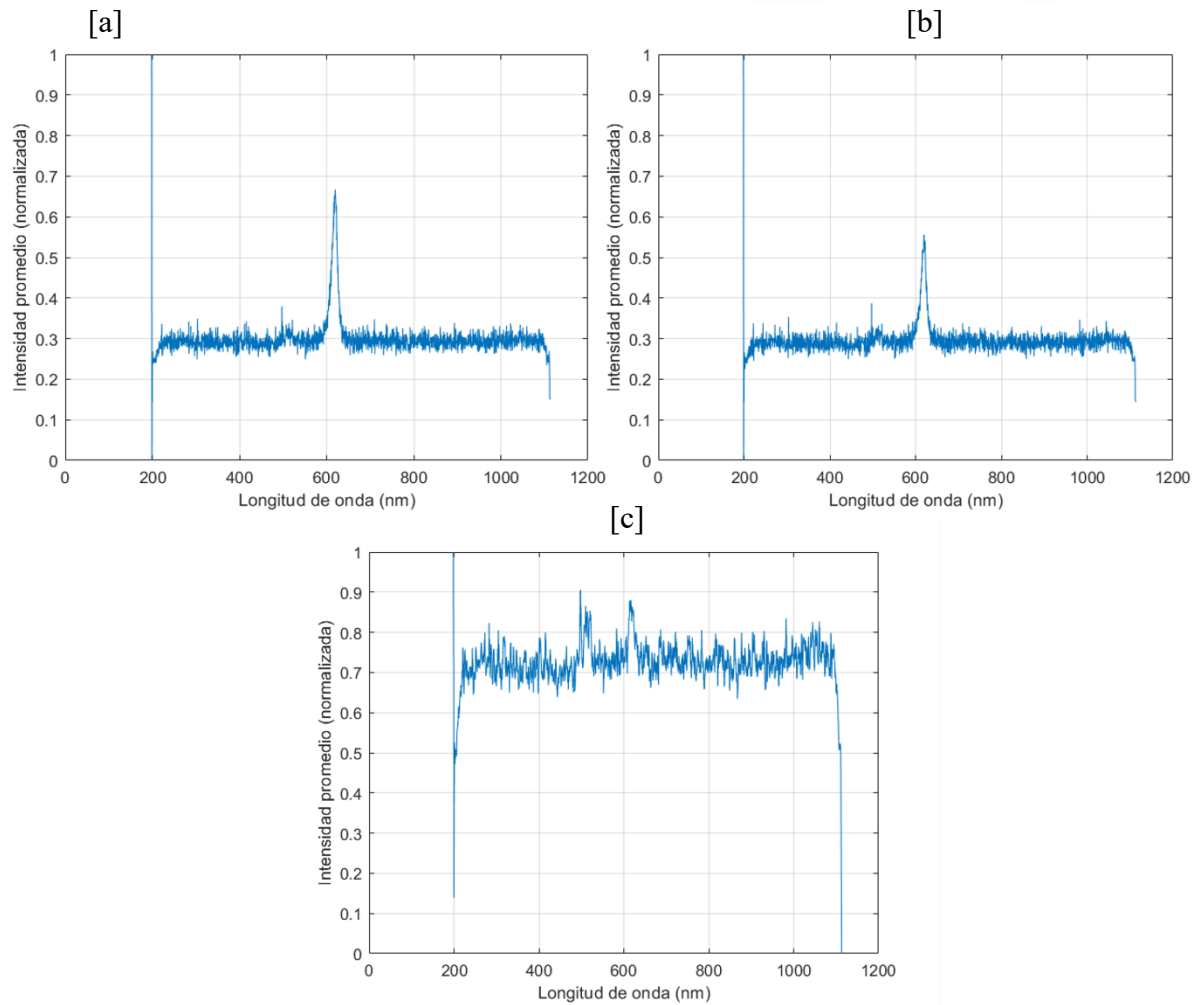


Figura 41: Espectros obtenidos para distintas combinaciones de fibras. **[a]** Espectro obtenidos con las fibras 1,2,4 **[b]** Espectro obtenidos con las fibras 2,4 **[c]** Espectro obtenido con la fibra 4

En la primera gráfica, correspondiente a la combinación de las fibras 1, 2 y 4, se observa claramente el pico asociado a la fuente de excitación (alrededor de 617 nm), así como una ligera elevación en la región derecha del espectro (en torno a 650 nm), vinculada a la fluorescencia emitida por las cianobacterias.

En la segunda gráfica, donde únicamente se emplearon las fibras 2 y 4, se aprecia también el pico de excitación, aunque con menor intensidad global, lo cual concuerda con la disminución del número de fibras activas.

Finalmente, en la tercera gráfica (solo fibra 4), se mantiene la presencia del pico de excitación, aunque de forma mucho más tenue y acompañada de un mayor nivel de ruido. Esto indica que la fibra sigue guiando la luz correctamente, pero con una eficiencia notablemente inferior. Este comportamiento puede estar asociado tanto a limitaciones en el alineamiento o en el acoplamiento óptico.

Bloque II:

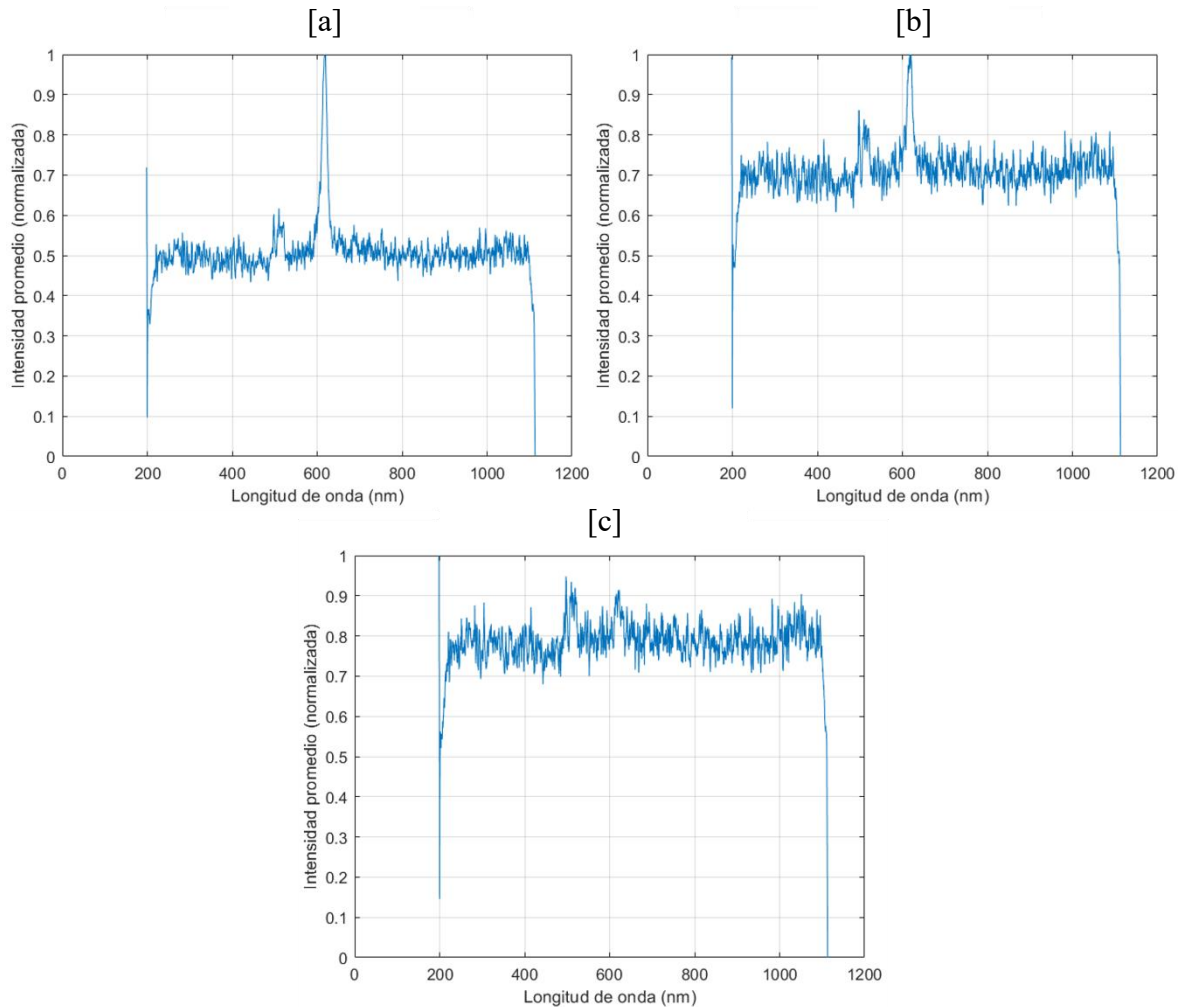


Figura 42: Espectros obtenidos para distintas combinaciones de fibras. **[a]** Espectro obtenidos con las fibras 1,2,3 **[b]** Espectro obtenidos con las fibras 2,3 **[c]** Espectro obtenido con la fibra 2

En este segundo bloque se evalúan las configuraciones que incluyen la fibra 2 en combinación con otras. En la primera gráfica (fibras 1, 2 y 3), se observa de nuevo el pico de excitación en torno a los 617 nm y una leve elevación del espectro alrededor de los 650 nm nuevamente a causa de la fluorescencia emitida por las cianobacterias. Esta configuración demuestra una captación de luz más efectiva que la utilizada en el anterior bloque.

En la segunda gráfica (fibras 2 y 3), la señal continúa mostrando el pico característico de la fuente de excitación y la fluorescencia, aunque con una intensidad algo más baja respecto a la configuración anterior. No obstante, la forma del espectro se mantiene bien definida, indicando una buena conducción óptica en ambas fibras. Por último, la medida individual de la fibra 2 presenta baja intensidad y alto nivel de ruido, aunque sigue cumpliendo su función de guiar la luz, ya no se aprecie la fluorescencia.

Bloque III:

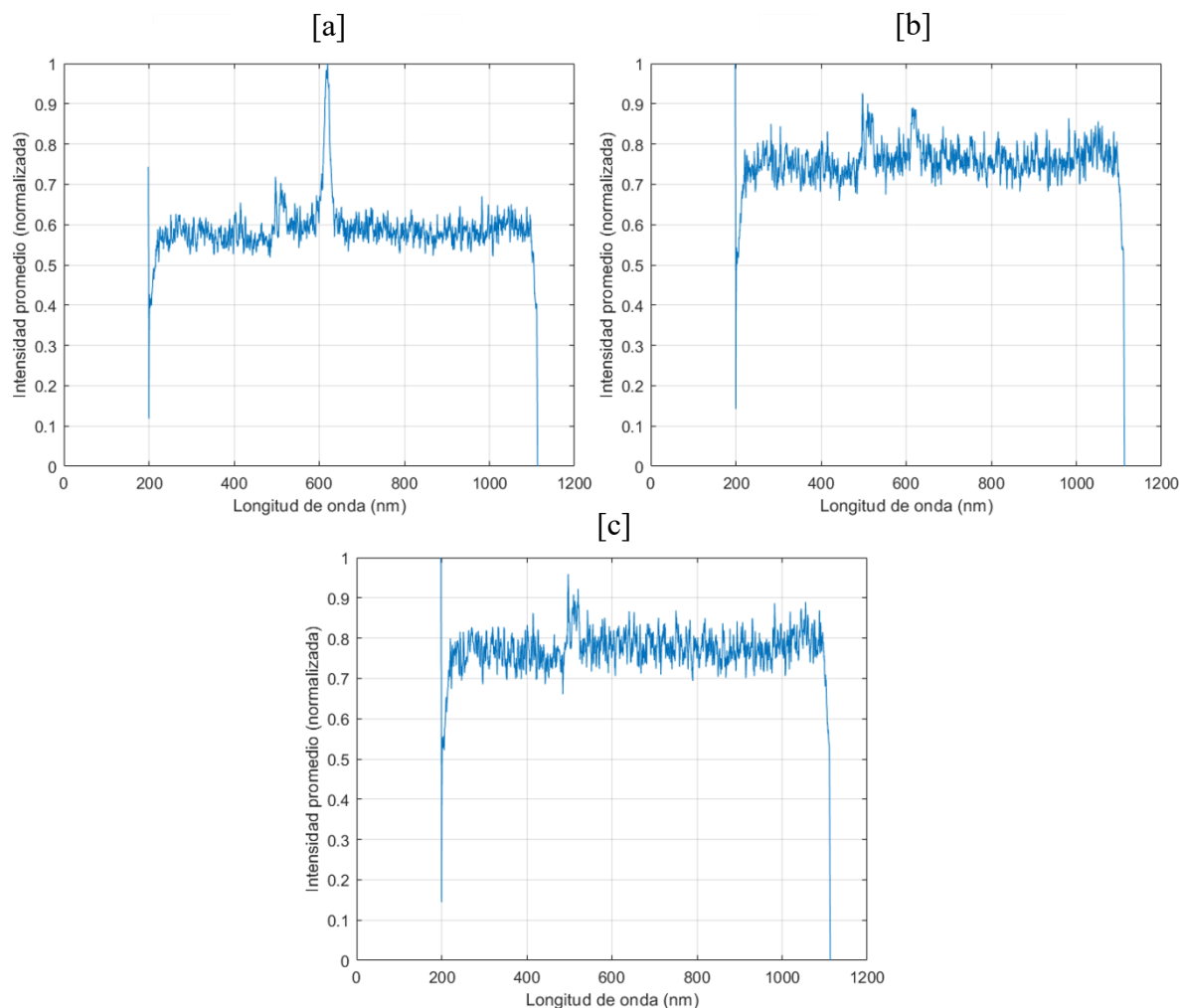


Figura 43: Espectros obtenidos para distintas combinaciones de fibras. **[a]** Espectro obtenidos con las fibras 2,3,4 **[b]** Espectro obtenidos con las fibras 3,4 **[c]** Espectro obtenido con la fibra 3.

En el bloque 3 se observa una caída abrupta de intensidad al pasar de la configuración con tres fibras (2, 3 y 4) a dos fibras (3 y 4), lo que indica una pérdida considerable en la captación de luz. Este descenso se hace aún más evidente en la medición con la fibra 3 en solitario, donde prácticamente no se detecta el pico de excitación y el espectro está dominado por el ruido. Este comportamiento sugiere que la fibra 3 podría estar dañada, impidiendo una correcta conducción de la señal.

Bloque IV:

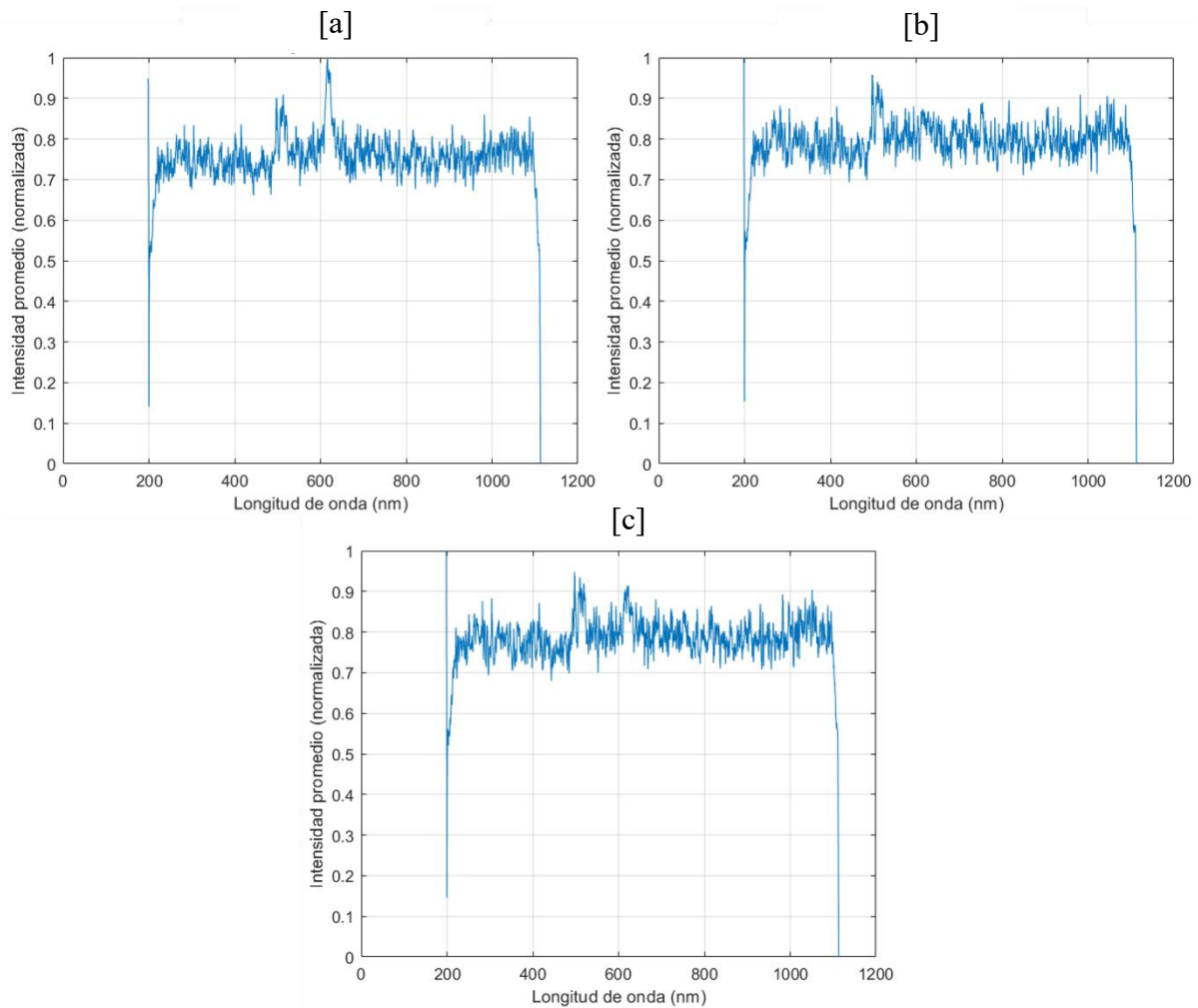


Figura 44: Espectros obtenidos para distintas combinaciones de fibras. **[a]** Espectro obtenidos con las fibras 1,3,4 **[b]** Espectro obtenidos con las fibras 1,3 **[c]** Espectro obtenido con la fibra 1.

Como ya se sospechaba a partir de los bloques anteriores, la fibra 3 parece presentar algún tipo de deterioro o rotura que afecta gravemente a su capacidad de guiar la luz. Esto se confirma al observar que la configuración con las fibras 1 y 3 ofrece un rendimiento inferior al de la fibra 1 sola, algo que no debería ocurrir si ambas fibras estuvieran en buen estado. Esta evidencia refuerza la hipótesis de que la fibra 3 no está transmitiendo correctamente la señal óptica.

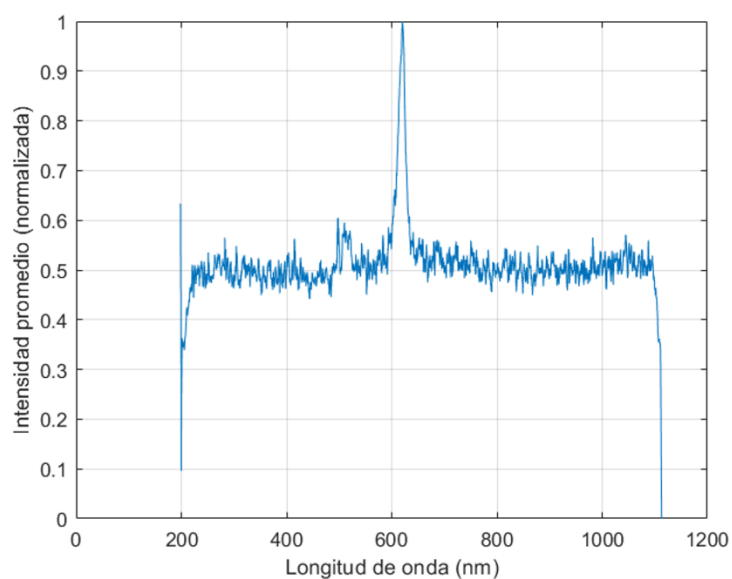
Bloque V:

Figura 45: Espectro obtenidos con las fibras 1 y 2.

En esta configuración, donde se emplean únicamente las fibras 1 y 2 (ambas consideradas funcionales), se observa de nuevo el pico correspondiente a la fuente de excitación. Además, a la derecha de dicho pico, se aprecia una ligera elevación del espectro en la región cercana a los 650 nm, lo que indica la presencia de fluorescencia emitida por las cianobacterias. Aunque esta señal es tenue, resulta más visible que en otras combinaciones anteriores, lo cual sugiere que esta pareja de fibras ofrece una mejor eficiencia en la recolección de la señal fluorescente. Esta observación es relevante de cara a futuras configuraciones del sistema, donde la sensibilidad a la fluorescencia será crítica.

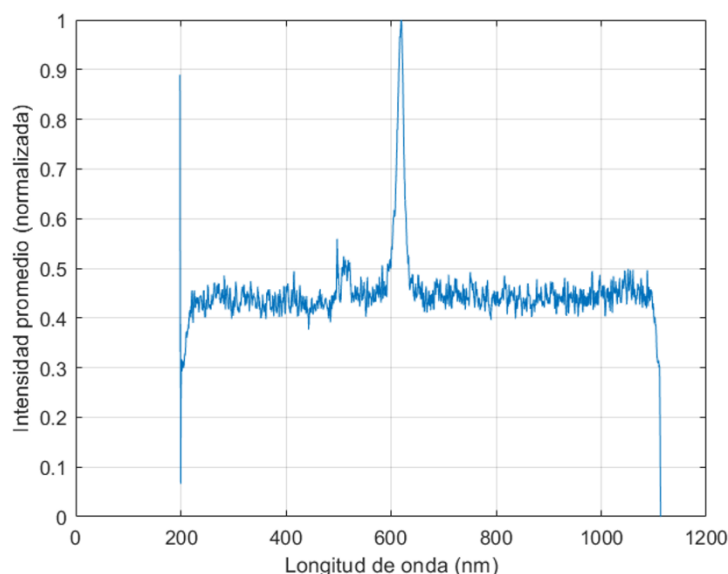
Bloque IV:

Figura 46: Espectro obtenidos con las cuatro fibras (1,2,3,4).

En esta configuración final con las cuatro fibras operativas (medición realizada antes de que se produjera la rotura de la fibra 3), se observa una mejor captación de la fluorescencia, especialmente en la zona del espectro cercana a los 650 nm, donde la curva muestra una elevación más evidente. Esta mejora sugiere una mayor eficiencia global del sistema al combinar múltiples fibras, siempre que estas estén correctamente alineadas y no presenten daños. La señal resultante es más estable y clara que en las configuraciones de dos o tres fibras, lo que confirma la ventaja de utilizar todas las fibras en buen estado de forma simultánea. No obstante, aunque el rendimiento mejora respecto a configuraciones anteriores, los resultados siguen sin alcanzar el nivel esperado; en capítulos posteriores se analizarán las posibles causas de esta limitación y las estrategias para solventarla.

Anexo I.2.2) Segunda configuración: Alineación individual de fibras al espectrómetro

Con el objetivo de mejorar la captación de señal y explorar nuevas estrategias de acoplamiento, se evaluó una segunda configuración experimental. En este caso, se utilizó un tapón adaptado directamente al espectrómetro, el cual contenía cuatro orificios alineados en fila. En cada uno de ellos se insertó una aguja, actuando como guía individual para cada una de las fibras ópticas.

Este enfoque permitió disponer las fibras de forma paralela y ordenada, con una salida más uniforme hacia el detector. La alineación de esta línea de agujas con el plano de detección del espectrómetro se realizó manualmente, lo que exigió una gran precisión para asegurar un acoplamiento eficiente. Sin embargo, este procedimiento manual introduce cierta variabilidad en la posición de las fibras, lo que puede afectar ligeramente la reproducibilidad y la precisión del acoplamiento óptico. Esta nueva disposición se evaluará con el objetivo de determinar si ofrece una mejora en la captación de la señal de fluorescencia frente a la configuración anterior, en la que todas las fibras se agrupaban en una única aguja.

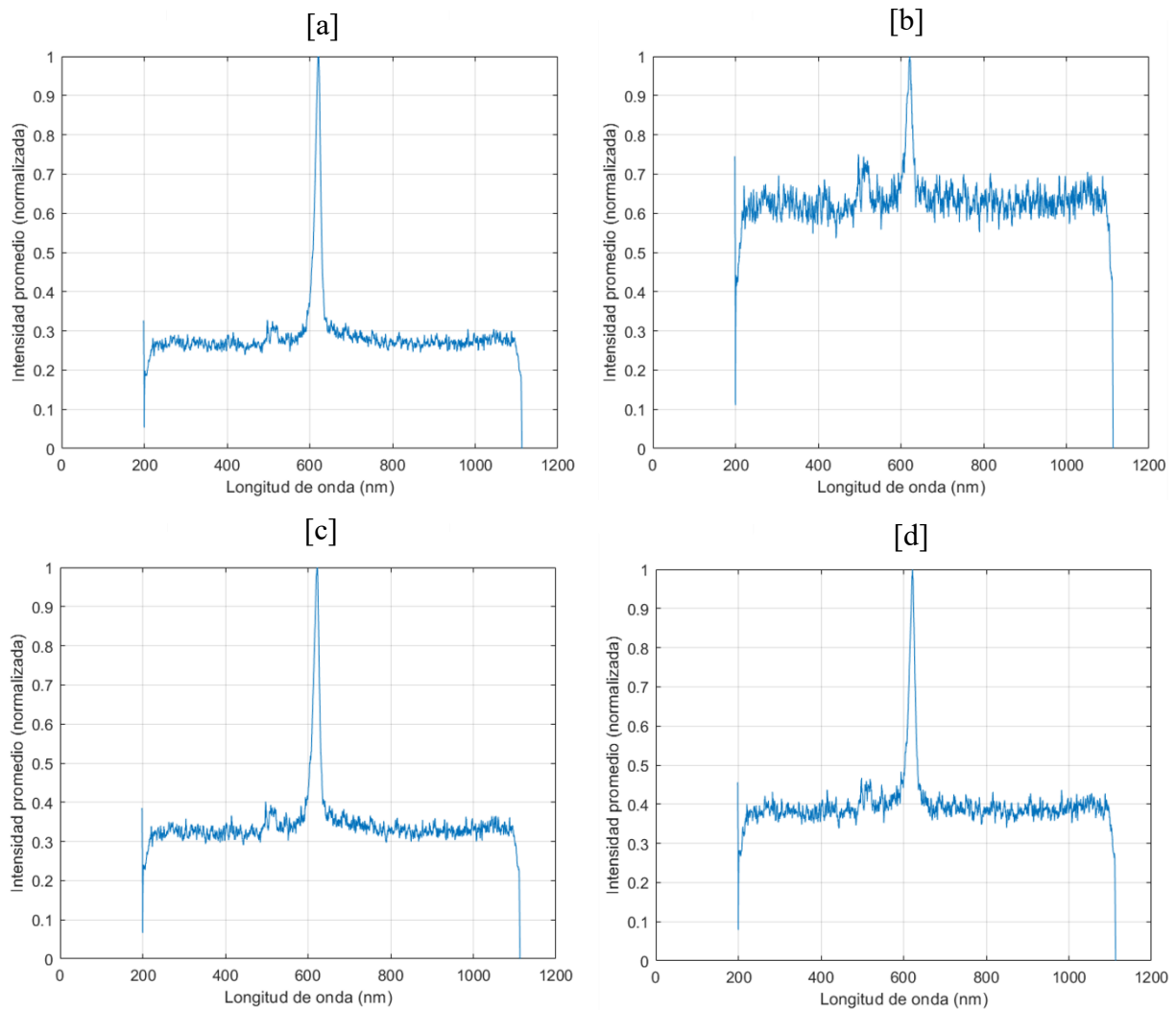


Figura 47: Espectros obtenidos con la disposición en línea de las fibras. **[a]** Fibras 1,2,3,4. **[b]** Fibras 1,3,4. **[c]** Fibras 1,4. **[d]** Fibra 1.

Lo más destacable es que incluso con un número reducido de fibras, como en las configuraciones con dos (fibras 1 y 4) o una sola fibra (fibra 1), se logra una señal de fluorescencia reconocible, con una elevación evidente del espectro en la zona asociada a la emisión de las cianobacterias. Esto indica no solo una buena alineación de las fibras más eficientes (como la fibra 1), sino también que la disposición individualizada mejora la calidad de la señal capturada, posiblemente por reducir interferencias ópticas internas entre fibras.

En conjunto, los resultados obtenidos con esta segunda configuración muestran una mejora notable en la captación de la fluorescencia, especialmente si se comparan con los obtenidos en la primera. A pesar de que la alineación manual de las fibras con el espectrómetro podía introducir cierto margen de error, la disposición en línea parece haber favorecido un mejor acoplamiento óptico.

Referencias

- [1] B. M. D. K. E. & R. I. H. Popkin, «Water, hydration, and health,» *Nutrition Reviews*, vol. 68, nº 8, p. 439–458, 2010.
- [2] KidsHealth, «KidsHealth,» [En línea]. Available: <https://kidshealth.org/es/teens/blood.html>. [Último acceso: Agosto 2025].
- [3] cientecinstrumentos, «cientec,» [En línea]. Available: <https://cientecinstrumentos.cl/que-es-cromatografia/>. [Último acceso: Agosto 2025].
- [4] A. C. Cierta, «¿Qué es la Cromatografía?,» YouTube, [En línea]. Available: <https://www.blinklearning.com/coursePlayer/clases2.php?idclase=40053939&idcurso=734099>. [Último acceso: Agosto 2025].
- [5] «Khan Academy,» YouTube, [En línea]. Available: <https://www.youtube.com/watch?v=I9q9KzYfQFM>. [Último acceso: Agosto 2025].
- [6] I. A. T. N. M.-B. X. & L. A. Rodríguez-Ruiz, «Photonic Lab-on-a-Chip: Integration of Optical Spectroscopy in Microfluidic Systems,» *Analytical Chemistry*, p. 6630–6637, 2016.
- [7] Z. Ashikbayeva, A. Bekmurzayeva, T. Ayupova, M. Shaimerdenova y D. Tosi, «Optical fiber biosensors and lab-on-a-device/chip,» de *Handbook of Nanomaterials*, vol. 2, Elsevier, 2024, p. 58.
- [8] A. T. T. Pham, A. Wallace, X. Zhang, D. Tohl, H. Fu, C. Chuah, K. J. Reynolds, C. Ramsey y Y. Tang, «Optical-Based Biosensors and Their Portable Healthcare Devices for Detecting and Monitoring Biomarkers in Body Fluids,» *Diagnostics*, vol. 11, nº 7, 2021.
- [9] J. W. W.-S. B. M. y S. Kim, «On-chip fluorescence detection using photonic bandgap guiding optofluidic hollow-core light cage,» *APL Photonics*, vol. 7, nº 10, p. 106103, 2022.
- [10] H. & Y. S. Park, «Process Analytical Technology Tools for Monitoring Pharmaceutical Production,» *Processes*, vol. 9, nº 8, p. 1349, 2021.
- [11] Chromatography Online, «Ultraviolet Detectors: Perspectives, Principles, and Practices,» [En línea]. Available: <https://www.chromatographyonline.com/view/ultraviolet-detectors-perspectives-principles-and-practices>. [Último acceso: Junio 2025].
- [12] M. K. K. H. D. M. B. C. & S. R. Kumar, «In-situ optical water quality monitoring sensors—applications, challenges, and future opportunities,» *Frontiers in Water*, vol. 6, 2024.

- [13] E. & F. L. L. J. Gerónimo, «Capítulo 2: Fluorescencia,» [En línea]. Available: https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/153906/Documento_completo.pdf?sequence=1. [Último acceso: Junio 2025].
- [14] Bruker, «VERTEX 80/80v FT-IR Research Spectrometer,» [En línea]. Available: <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/infrared-and-raman/ft-ir-research-spectrometers/vertex-research-ft-ir-spectrometer/vertex-80-80v-ft-ir-spectrometer.html>. [Último acceso: Junio 2025].
- [15] Nikon Instruments, «ECLIPSE Ti2 Series Inverted Research Microscope,» [En línea]. Available: https://www.microscope.healthcare.nikon.com/es_AMS/products/inverted-microscopes/eclipse-ti2-series. [Último acceso: Junio 2025].
- [16] Mol Labs, «Error humano en el laboratorio: un cuento de terror en tres partes,» 2015. [En línea]. Available: <https://www.mollabs.com/Documentos/BlogDocs/25%20-%20Error%20Humano.pdf>. [Último acceso: Junio 2025].
- [17] gene-quantification, «lab-on-chip-gene-quantification,» [En línea]. Available: <https://www.gene-quantification.de/lab-on-chip.html>. [Último acceso: Agosto 2025].
- [18] Z. Ashikbayeva, A. Bekmurzayeva, T. Ayupova, M. Shaimerdenova y D. Tosi, «Optical fiber biosensors and lab-on-a-device/chip,» de *Handbook of Nanomaterials*, vol. 2, Elsevier, 2024, p. 47–67.
- [19] D. Psaltis, S. R. Quake y C. Yang, «Developing optofluidic technology through the fusion of microfluidics and optics,» *Nature*, vol. 442, n° 7101, p. 381–386, 2006.
- [20] M. C. Wu, O. Solgaard y J. E. Ford, «Optical MEMS for light manipulation,» *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, vol. 11, n° 1, p. 147–162, 2006.
- [21] Electricity & Magnetism, «Reflexión Total Interna en Fibras Ópticas,» [En línea]. Available: <https://www.electricity-magnetism.org/es/reflexion-total-interna-en-fibras-opticas/>. [Último acceso: Junio 2025].
- [22] TechTarget, «Fiber-optic cable (FO cable),» [En línea]. Available: <https://www.techtarget.com/whatis/definition/fiber-optic-cable-FO-cable>. [Último acceso: Junio 2025].
- [23] R. Bashir, «Microsystems for biomedical applications,» de *Microsystem Technology*, Springer, 2004, p. 79–112.
- [24] Universidad Miguel Hernández, «Espectroscopía molecular – Fluorescencia,» [En línea]. Available: https://repositorio.innovacionumh.es/Proyectos/P_22CursoMateriales/Miguel_Angel_Sogorb/Wimba/Espectroscopia_06.htm. [Último acceso: Junio 2025].

- [25] Evident Scientific, «Fluorescencia: excitación e iluminación,» [En línea]. Available: <https://evidentscientific.com/es/microscope-resource/knowledge-hub/lightandcolor/fluoroexcitation>. [Último acceso: Junio 2025].
- [26] Universidad de Granada, «Seminario 3 – Fundamentos de la fluorescencia,» [En línea]. Available: <https://www.ugr.es/~decacien/Planes/Quimica/Plan%201997/temarios/671111d-archivos/fundamentos/SEMINARIO%203.PDF>. [Último acceso: Junio 2025].
- [27] L. Fernández González, «ResearchGate,» Figura 2. Diagrama de Jablonski simplificado, [En línea]. Available: https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-Diagrama-de-Jablonski-simplificado_fig2_366895688. [Último acceso: Junio 2025].
- [28] B. K. Gale, A. R. Jafek, C. J. Lambert, B. L. Goenner, H. Moghimifam, U. C. Nze y S. K. Kamarapu, «Principles of microfluidic fluorescence detection,» de *PhLoC: Optofluidic Microfluidics Systems*, 2018, p. 233–235.
- [29] C. Six y X. Johnson, «Photosynthetic pigments and pigment–protein complexes in cyanobacteria,» de *Photosynthesis in Algae: Biochemical and Physiological Mechanisms*, Springer, 2016, p. 141–163.
- [30] Thermo Fisher Scientific, «Fluoróforos - Información general sobre sondas fluorescentes,» [En línea]. Available: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cell-analysis/fluorophores.html>. [Último acceso: Junio 2025].
- [31] Universidad de Los Andes (Venezuela), «Capítulo 6.5 – Microscopía de fluorescencia,» [En línea]. Available: https://www.medic.ula.ve/histologia/anexos/microscopweb/MONOWEB/capitulo6_5.htm. [Último acceso: Junio 2025].
- [32] G. C. Wishart y S. W. Loh, «Sentinel lymph node biopsy and fluorescence imaging in breast cancer surgery using indocyanine green,» *Gland Surgery*, vol. 6, nº 6, p. 618–622, 2017.
- [33] Y. Rodríguez, «Fibra óptica,» 2009, pp. 5-6.
- [34] e-medida.es, «e-medida.es,» [En línea]. Available: <https://www.e-medida.es/numero-15/la-fibra-optica-sirve-para-medir-temperatura-y-otras-magnitudes/>. [Último acceso: Julio 2025].
- [35] Wikipedia, «Ley de Snell-Wikipedia,» [En línea]. Available: https://es.wikipedia.org/wiki/Ley_de_Snell#. [Último acceso: Julio 2025].
- [36] slideserve, «slideserve.com,» [En línea]. Available: https://www.slideserve.com/nami/apertura-num-rica-de-la-fibra-y-cono-de-aceptancia#google_vignette. [Último acceso: Julio 2025].

- [37] «FS-single-mode-vs-multimode-fiber-whats-the-difference,» [En línea]. Available: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/56545919/Fibra_optica_----_Pg_1--7-libre.pdf. [Último acceso: Junio 2025].
- [38] ATGrating, «Fiber Bragg Grating (FBG),» [En línea]. Available: <https://es.atgrating.com/products/fiber-bragg-grating-fbg/>. [Último acceso: Junio 2025].
- [39] C. Gómez-Galdós, B. García-García, M. G. Fernández-Manteca, A. Pérez-Asensio, J. F. Algorri, J. M. López-Higuera, A. Cobo y L. Rodríguez-Cobo, «Fluorescence-based optical fiber sensor for liquid sample analysis in silica glass well,» Universidad de Cantabria – Photonics Engineering Group, 2023.
- [40] G. M. Whitesides, «The origins and the future of microfluidics,» *Nature*, vol. 442, nº 7101, p. 368–373, 2006.
- [41] P. Yager, G. J. Domingo y J. Gerdes, «Point-of-care diagnostics for global health,» *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 10, p. 107–144, 2008.
- [42] Y. Zhang, J. Li, Y. Zhou, X. Zhang y X. Liu, «Artificial Intelligence Based Microfluidic Platform for Detecting Contaminants in Water: A Review,» *Sensors*, vol. 24, nº 13, 2024.
- [43] xometry.pro, «xometry.pro,» [En línea]. Available: <https://xometry.pro/es/articulos/impresion-3d-polyjet-tecnologia/>. [Último acceso: Agosto 2025].
- [44] formlabs, «formlabs,» [En línea]. Available: https://formlabs.com/es/blog/guia-definitiva-estereolitografia-sla-impresion-3d/?srsltid=AfmBOoqwEtQdZzMicf9bta8hvpwtmdSZM_aplJV_c8ogzbLV_Ba-E_oa. [Último acceso: Agosto 2025].
- [45] Formlabs, «Guide to microfluidics and millifluidics, and Lab on a Chip manufacturing,» [En línea]. Available: <https://formlabs.com/blog/microfluidics-millifluidics-lab-on-a-chip-manufacturing/>. [Último acceso: Junio 2025].
- [46] X. Y. Zhang, A. B. Lee y C. D. Smith, «Surface roughness and optical properties in stereolithography (SLA) 3D printing: implications for optical applications,» *Applied Optics*, vol. 58, nº 14, p. 3789–3795, 2019.
- [47] P. Roldán Varona, «Ultrafast laser processing of transparent materials for photonic sensing and imaging applications,» Universidad de Cantabria, Santander, 2023.
- [48] S. AG, «Fluorescence of optical glass (TIE-36 Technical Information),» SCHOTT AG, 2022.
- [50] N. H. R. A. S. M. Y. Z. J. & F. Y. Davis, «A Lab-in-a-Fiber optofluidic device using droplet microfluidics and laser-induced fluorescence for detection,» *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 365, p. 131876, 2022.

- [51] M. C. Wu, O. Solgaard y J. E. Ford, «Optical MEMS for light manipulation,» *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, vol. 11, nº 1, p. 147–162, 2006.
- [52] A. Llobera, S. Demming y C. Koos, «Fluorescence Detection in Lab-on-a-Chip Devices,» de *Biosensors in Lab-on-Chip Systems*, Elsevier, 2024, p. 38–39.
- [53] Thermo Fisher Scientific , «Alexa Fluor™ 488 C5 Maleimide – product details,» [En línea]. Available: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A10254>. [Último acceso: Junio 2025].
- [54] Evident Scientific, «Fluorochrome Data Table,» [En línea]. Available: <https://www.olympus-lifescience.com/en/support/faq/fluorochromes/>. [Último acceso: Junio 2025].
- [55] LabSmith, «Reaction Chamber Chip (P/N 10000113),» 2025. [En línea]. Available: <https://labsmith.com/product/reaction-chamber-chip-p-n-10000113/>. [Último acceso: Junio 2025].
- [56] S. Bhattacharjee, «Design and fabrication of a microfluidic system with nozzle diffuser micropump and viscosity measurement,» 2021.
- [57] Universidad de Barcelona, «OBLQ - Observatorio de la Lectura, la Química y el Lenguaje,» [En línea]. Available: https://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/cromatografia_altres.html. [Último acceso: Junio 2025].