



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

CAMPUS IRAPUATO - SALAMANCA

DIVISIÓN DE INGENIERÍAS

*“Caracterización de un Biosensor de Glucosa mediante fibra óptica plástica”*

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN INGENIERÍA ELÉCTRICA**

Instrumentación y Sistemas Digitales

PRESENTA:

***Ing. Díaz Fernández Flor Andrea.***

DIRECTORES:

**Dr. Edgar Alvarado Méndez.**

**Dra. Mónica Trejo Durán.**

# Agradecimientos

Primeramente, doy gracias a Dios por haberme permitido la oportunidad de realizar mi maestría en un país desconocido para mí, con nuevas costumbres y estilos diferentes de vida, otorgándome la salud y entendimiento necesario para superar todas las metas propuestas. En especial gracias por poner en mi camino personas trabajadoras, educadas, inteligentes y muy serviciales, que me ayudaron en gran medida a completar este desafío.

Por supuesto gracias a mi familia que, aunque siempre estuvo en la distancia, supieron como darme su apoyo incondicional, y con su confianza y amor en mí, permitirme tener siempre la vista hacia adelante, y aunque sea difícil estar lejos saber que valdría la pena superar todos los obstáculos.

También gracias a mis asesores por todas sus enseñanzas en este gran y hermoso mundo de la Óptica. Al laboratorio de química de la Universidad de Guanajuato, por todo su apoyo y ayuda en las pruebas realizadas. Al grupo de optoelectrónica y de fibras ópticas, por facilitarme sus instalaciones y por su colaboración y conocimientos impartidos que me ayudaron a mejorar el trabajo realizado. Y a todos mis amigos y colegas que me acompañaron durante el proceso, no solo en el ámbito profesional, si no también emocionalmente, en especial a mi amigo y esposo, Carlos Montilla.

Finalmente, agradecimientos para el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, por la beca otorgada CVU, 808487 y a la División de Ingenierías del Campus Irapuato-Salamanca de la Universidad de Guanajuato por brindarme los recursos necesarios para culminar este proyecto de tesis, parcialmente apoyado mediante el proyecto DAIP-CII 234/2018.

# Contenido

Resumen.....	1
<b>1. Introducción.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1. Objetivos.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Justificación.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3. Antecedentes.....</b>	<b>7</b>
<b>1.4. Desarrollo.....</b>	<b>8</b>
<b>2. Estado del Arte.....</b>	<b>10</b>
<b>3. Marco Teórico.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1. Técnica Sol-Gel.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.1. Definición.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.2. Etapas del Proceso.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1.3. Ventajas e inconvenientes.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.4. Parámetros que influyen en el proceso.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.5. Procedimiento de Recubrimiento utilizado: Dip-coating.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1.6. Encapsulación de la Enzima.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2. Procesamiento Digital de Imágenes.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.1. Adquisición de imágenes.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.2. Pre-procesado.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.3. Segmentación.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.4. Representación y descripción.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.5. Reconocimiento e interpretación.....</b>	<b>31</b>
<b>3.2.6. Base de conocimiento.....</b>	<b>31</b>

<b>4. Metodología</b> .....	32
<b>4.1. Fabricación de los bioptrodos</b> .....	33
<b>4.1.1. Preparación de la mezcla</b> .....	33
<b>4.1.2. Procedimiento Dip-coating</b> .....	38
<b>4.2. Arreglo experimental</b> .....	41
<b>4.2.1. Captura de las imágenes</b> .....	42
<b>4.3. Procesamiento Digital de las Imágenes</b> .....	44
<b>4.3.1. Tratamiento de los Datos</b> .....	45
<b>5. Resultados</b> .....	47
<b>5.1. Gráficas del primer método</b> .....	51
<b>5.2. Gráficas del segundo método</b> .....	55
<b>5.3. Análisis de la Aproximación Lineal de los Bioptrodos tratados</b> .....	59
<b>6. Conclusiones</b> .....	64
Bibliografía.....	67

# Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema de un biosensor.....	10
<b>Figura 2.</b> Esquema de un biosensor óptico.....	12
<b>Figura 3.</b> Dependencia de las tasas relativas de hidrólisis condensación sobre el pH.....	21
<b>Figura 4.</b> Desarrollo estructural de geles de sílice.....	23
<b>Figura 5.</b> Esquema de las rutas que se pueden seguir con el proceso Sol-gel.....	24
<b>Figura 6.</b> Etapas procesamiento digital de imágenes.....	29
<b>Figura 7.</b> Conversión de Imagen en color RGB a escala de grises.....	30
<b>Figura 8.</b> Fibra óptica plástica (bioptrodo).....	38
<b>Figura 9.</b> Dip-coater, dispositivo utilizado para realizar los recubrimientos.....	39
<b>Figura 10.</b> Arreglo Experimental .....	42
<b>Figura 11.</b> Ejemplo de una imagen capturada del experimento.....	43
<b>Figura 12.</b> Ejemplo de una imagen recortada.....	44
<b>Figura 13.</b> Ejemplo de la segmentación por umbralización de la imagen recortada.....	45
<b>Figura 14.</b> Vista frontal del bioptrodo observado en el microscopio.....	48
<b>Figura 15.</b> Vista lateral del bioptrodo observado en el microscopio.....	48
<b>Figura 16.</b> Arreglo experimental propuesto.....	50
<b>Figura 17.</b> Curvas Características con el Primer Método con las siete fórmulas en un bioptrodo sin dopaje.....	51
<b>Figura 18.</b> Curvas Características con el Segundo Método con las siete fórmulas en un bioptrodo sin dopaje.....	51

**Figura 19.** Curva Característica Primer Método, fórmula ‘MatlabRGB2Gray’ (OP3).....52

**Figura 20.** Curva Característica Primer Método, fórmula ‘Intensity’ (OP3).....53

**Figura 21.** Curva Característica Primer Método, fórmula ‘Gleam’ (OP3).....53

**Figura 22.** Curva Característica Primer Método, fórmula ‘Luma’ (OP3).....54

**Figura 23.** Curva Característica Primer Método, fórmula ‘Luminance’ (OP3).....54

**Figura 24.** Curva Característica Primer Método, fórmula ‘Value’ (OP3).....55

**Figura 25.** Curva Característica Primer Método, fórmula ‘Luster’ (OP3).....55

**Figura 26.** Curva Característica Segundo Método, fórmula ‘MatlabRGB2Gray’ (OP3)...56

**Figura 27.** Curva Característica Segundo Método, fórmula ‘Intensity’ (OP3).....57

**Figura 28.** Curva Característica Segundo Método, fórmula ‘Gleam’ (OP3).....57

**Figura 29.** Curva Característica Segundo Método, fórmula ‘Luma’ (OP3).....58

**Figura 30.** Curva Característica Segundo Método, fórmula ‘Luminance’ (OP3).....59

**Figura 31.** Curva Característica Segundo Método, fórmula ‘Value’ (OP3).....59

**Figura 32.** Curva Característica Segundo Método, fórmula ‘Luster’ (OP3).....60

# Lista de Tablas

**Tabla 1.** Cantidades usadas en la primera experimentación de la mezcla Sol-gel.....34

**Tabla 2.** Análisis de experimentos para evaluar la adherencia del Sol-Gel.....35

**Tabla 3.** Cantidades usadas en la mezcla Sol-gel para la encapsulación de la enzima.....36

**Tabla 4.** Ajustes lineales obtenidos de las curvas características graficadas de la conversión a escala de grises de las imágenes promedio de cada bioprodo con sus respectivas concentraciones.....61

**Tabla 5.** Ajustes lineales obtenidos de las curvas características graficadas con el promedio de la conversión a escala de grises de las treinta imágenes captadas por bioprodo para cada concentración.....62

**Tabla 6.** Ajustes lineales obtenidos de las curvas características graficadas con el promedio de las tres matrices provenientes de la imagen promedio calculada por bioprodo para cada concentración.....64

**Tabla 7.** Ajustes lineales obtenidos de las curvas características graficadas con el promedio de las tres matrices de las treinta imágenes captadas por bioprodo para cada concentración.....65

# Resumen

En el presente trabajo se desarrolla la fabricación de bioprodos a través de la técnica sol-gel, usando el método dip-coating, para la caracterización de un biosensor de glucosa a través de procesamiento digital de señales. En primer lugar, para los bioprodos se encapsuló la enzima glucosa oxidasa en una matriz sólida, uniforme y totalmente adherida a la punta de una fibra óptica plástica. En segundo lugar, el arreglo experimental para obtener la curva característica se realizó mediante la captura de la señal emitida por una fuente de luz de amplio espectro al pasar por una rejilla de difracción, la rejilla se encuentra a la salida de un bioprodo de glucosa, dicha captura se realizó a través de un smartphone. Por último, las imágenes fueron analizadas mediante programación Matlab, utilizando la conversión a escala de grises con siete fórmulas diferentes que permiten cada una determinar la intensidad promedio de la imagen captada variando la concentración de glucosa, para lograr construir las curvas características del promedio del nivel intensidad de los píxeles versus la concentración de glucosa. Finalmente, en la experimentación se observó que el aumento en la concentración de glucosa es proporcional a la intensidad de la luz transmitida, el rango de medida es de 100mg/dl a 200 mg/dl de glucosa, con un tiempo de respuesta menor a 1 segundo.



# Capítulo 1

## Introducción

De acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, más conocida por sus siglas en inglés IUPAC, un biosensor es un dispositivo que utiliza reacciones bioquímicas específicas mediante enzimas, anticuerpos, tejidos, organelos o células enteras (elemento de reconocimiento), para detectar compuestos químicos (analito), usualmente por señales eléctricas, térmicas u ópticas [1]. Por lo que tomaremos esto como recurso principal, para proponer la caracterización de un biosensor de glucosa mediante la enzima glucosa oxidasa, desarrollado en base a detectar diferentes concentraciones de glucosa con una señal óptica que pasara a través de una fibra óptica plástica.

La importancia de medir la glucosa recae en la necesidad de algunas industrias, laboratorios clínicos y personas particulares, de conocer la concentración de glucosa en una determinada sustancia. Para el primer caso, es necesario en algunos procesos industriales conocer la concentración de glucosa en sus preparaciones, ya sea por motivos de medición en la maduración de algunas sustancias orgánicas, y calidad o seguridad en la elaboración de sus productos, entre otras actividades. Para el caso de los laboratorios clínicos, es muy relevante entre los estudios médicos que se realizan en los mismos, medir la concentración de glucosa en la sangre que se hace a través de diferentes y variados procedimientos, ya sea por mediciones en el plasma de la sangre o en la orina de los pacientes. Y, por último, para particulares es necesario llevar un seguimiento de sus niveles de glucosa en la sangre para controlar casos de diabetes o prevención de dicha enfermedad.

Por consiguiente, se ofrece un biosensor que funcionará con un método que no se ha usado antes para la detección de la concentración de glucosa. La caracterización del biosensor se realizará con preparaciones de glucosa diluida en agua destilada con diferentes concentraciones, hasta lograr obtener una curva con un comportamiento definido. La curva será graficada a partir de las variaciones en la intensidad promedio de la imagen capturada a la salida de la rejilla de difracción, a través de la cual se transmite la luz proveniente del bioprodo cuya fuente de luz es un led flash, es decir una fuente de amplio espectro. De dicho proceso, se espera mejorar la sensibilidad del biosensor debido a que las variaciones se harán a nivel de la luz, y por lo tanto estas variaciones se presentan en rangos de variación de concentración más pequeñas, gracias a que la unidad de medida de la luz es en nm. Este proceso es factible de realizar en el laboratorio de óptica de la universidad de Guanajuato en la sede de Salamanca, puesto que se tienen todos los elementos necesarios, así como las sustancias químicas y orgánicas necesarias para la elaboración de los bioprodos a través de la técnica Sol-gel.

El dispositivo que se desarrolló es un biosensor de fibra óptica. Existen varios tipos de biosensores ópticos, basados en la medición de variables físicas como intensidad, fase, absorción, fluorescencia, entre otros. En esta tesis nuestro biosensor se basa en el fenómeno óptico de la absorción de la luz, analizando la relación entre la absorción de la luz y la concentración de glucosa en la muestra. Es decir, la glucosa será el analito, presente en una muestra, y la glucosa oxidasa será el elemento de reconocimiento, la cual a través de una técnica de inmovilización será adherida a la fibra óptica plástica (Sol-Gel). Es importante aclarar que la fibra óptica plástica es la guía de onda de nuestro biosensor, cuya salida es una señal óptica que será capturada por nuestro transductor: una cámara, la cámara captura la imagen en colores al transmitirse previamente la luz de la salida de la fibra en una rejilla de difracción, la cual descompone en colores el haz de luz. La imagen será analizada a través de Matlab, hallando el promedio de las imágenes convertidas a escala de grises con siete formulas diferentes, con el fin de realizar las curvas características que representen los niveles de glucosa utilizados versus el promedio de nivel de gris de las imágenes captadas, y seleccionar la que tenga mayor comportamiento lineal.

## 1.1. Objetivos

### Objetivo General

Caracterizar un biosensor de glucosa utilizando fibra óptica plástica a través de un Smartphone, fabricando bioproductos desarrollados para la detección de glucosa haciendo uso de la técnica Sol-Gel.

### Objetivos Específicos

- Preparar bioproductos para la detección de Glucosa haciendo uso de la técnica Sol-Gel.
- Captar en una imagen la señal obtenida del haz de luz transmitido por la fibra óptica plástica, utilizando la cámara de un Smartphone.
- Evaluar las imágenes captadas mediante software Matlab, para determinar de las siete fórmulas que serán usadas, cual presenta mayor linealidad, y que longitud de onda tiene mayor absorción.
- Realizar la curva característica que represente los niveles de glucosa utilizados versus la media de nivel de gris de la imagen captada.
- Determinar la viabilidad del biosensor a través del análisis de los resultados obtenidos.

## 1.2. Justificación

Para poder realizar la caracterización del biosensor es necesario fabricarlo y esto será basado en bioproodos. Lo esencial del bioprodo es la técnica de inmovilización del elemento de reconocimiento, para garantizar el funcionamiento correcto del biosensor. La técnica de inmovilización utilizada será la técnica sol-gel, la cual es una de las más aplicadas debido a su fácil uso. Solo basta con crear una estructura porosa para atrapar el indicador y formar una red rígida de sílice. Es importante remarcar que esta técnica ofrece muchas ventajas sobre otros métodos de deposición de películas puesto que la película formada es inerte y más resistente en ambientes agresivos [2].

Cabe destacar que los sensores de fibras ópticas están basados en propiedades ópticas tales como absorción, reflectancia, transmitancia, fluorescencia, onda evanescente, etc. En este caso, estará basado en el fenómeno de absorción, el cual consiste en que la luz al pasar por la fibra y al llegar a donde está la película sol-gel, la luz es absorbida por la enzima glucosa oxidasa, de acuerdo con la concentración que se tenga. La fuente de luz es un led flash, y se propaga dentro de la fibra donde es absorbida, a la salida esa luz es transmitida por una rejilla de difracción para así poder ser capturada por la cámara de un smartphone para su posterior procesamiento. Las principales ventajas que ofrece este tipo de sensores es la inmunidad a interferencia electromagnética, monitorear a control remoto y alta precisión debido a que su resolución es en el orden de una longitud de onda, nanómetros (nm).

Según el informe de vigilancia tecnológica de la comunidad de Madrid estas características convierten a los biosensores en opciones altamente atractivas para competir en el mercado agroalimentario junto con otras características como, por ejemplo: su especificidad, su corto tiempo de análisis, su capacidad de trabajar en tiempo real, su versatilidad que permite el diseño de dispositivos a la carta, y su bajo coste [3].

En el ámbito de la industria agroalimentaria es destacable la necesidad de mantener la seguridad, calidad y control de procesos, las cuales pueden ser solventadas por las ventajas de los biosensores antes mencionadas. En este sentido, los biosensores pueden cumplir métodos analíticos para el aseguramiento de la calidad fisicoquímica, microbiológica, bromatológica, sensorial y la estabilidad de materias primas, procesos y productos terminados.

En este sentido, los métodos analíticos tradicionales implican determinaciones gravimétricas, volumétricas y colorimétricas con niveles de sensibilidad limitados para la determinación de trazas, y con poca especificidad. Aunque los métodos cromatográficos constituyen herramientas robustas, reproducibles y con capacidad de alcanzar niveles de detección del orden de partes por trillón, son costosos e implican tratamientos muy exhaustivos de la muestra.

A pesar de los grandes avances en el tema de biosensores, es evidente su limitado en las industrias y su comercialización debido al comportamiento de la demanda, la legislación particular de los consumidores y el desconocimiento de la tecnología y sus bondades [4].

## 1.3. Antecedentes

El Cuerpo Académico de Optoelectrónica de la Universidad de Guanajuato, tiene entre otras funciones, investigar sensores basados en fibras ópticas. En previas investigaciones desarrollaron un sensor de pH midiendo en tiempo real la variable pH usando LabView [5]. Cabe destacar, que medir en tiempo real es una de las necesidades más apremiantes en el proceso de adquisición de datos, que aún no es del todo satisfactorio, y es precisamente adquirir datos o medir glucosa en tiempo real de vital importancia para algunos procesos en la industria.

Gracias a esa previa experiencia, permitió proponer un sensor de pH usando fibra óptica plástica a través de un smartphone [6]. Debido a que en los biosensores el elemento de reconocimiento (película en la fibra óptica plástica) está ligado al analito (muestra a medir) que se quiere identificar, es posible modificar estos elementos y proponer ahora un biosensor como es el de glucosa. El biosensor, como ya se mencionó, estará basado en la enzima glucosa oxidasa y el analito: glucosa. De modo que se basará en el mismo proceso de absorción para identificar las diferentes concentraciones de glucosa.

Además, existen diversos estudios donde se recomienda los elementos que deben formar parte del proceso, para la creación del Sol-gel, que específicamente aporten los cambios en la medición de la concentración de glucosa [2,7-10]. En este proyecto se pretende optimizar esta mezcla, para mejorar su tiempo de vida y profundizar en la manera de hacer posible la reproducibilidad de los bioproductos, basándose en los diferentes métodos de aplicación del sol-gel.

## 1.4. Desarrollo

La primera etapa consiste en la revisión bibliográfica del estado de arte para biosensores de glucosa, investigar biosensores que usan Smartphone e investigar la técnica Sol-Gel para el desarrollo del sensor de glucosa. Se realiza una revisión exhaustiva y actualizada, en revistas reconocidas, y conferencias recientes, para encontrar la existencia de biosensores de glucosa, los procedimientos de medida son diferentes, por ejemplo, variación en la fluorescencia, y con electrodos a través de variaciones de potencia usando fotodetectores. Además, en la realización de biosensores a través de fibra óptica plástica existen diferentes técnicas, se buscará específicamente a través de la técnica Sol-Gel.

La segunda etapa consiste en la preparación de los bioproductos, haciendo uso de la técnica Sol-Gel, a esta etapa le llamamos “inmovilización de la enzima glucosa oxidasa”. Para la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa utilizaremos la técnica Sol-Gel. Se basa en la mezcla de reactivos líquidos a nivel molecular, lo cual permite crear un material que contiene el reactivo que reacciona con el componente que se desea sensar.

Esta etapa se inicia con una suspensión coloidal en un líquido (sol) y la hidrólisis y condensación de este sol para formar un material sólido lleno de solvente (gel), el solvente se extrae con un tiempo de reposo a temperatura ambiente o un tiempo con tratamiento térmico, al final se obtiene un material en forma de película delgada. Para este trabajo se utiliza tetraetil-ortosilicato (TEOS), alcohol y la enzima glucosa oxidasa. Se mezclan las sustancias en un vaso de precipitado para posteriormente cubrir nuestro sustrato (fibra óptica plástica), el proceso de recubrimiento es llamado dip-coating, y posteriormente se dejan secar a temperatura de 8°C, dentro de un refrigerador y evitar la desnaturalización de la enzima a utilizar.

La tercera etapa consiste en primer lugar en captar en una imagen el haz de luz transmitido por la fibra óptica plástica; para tal fin, se adecua la fibra óptica plástica de tal forma que el extremo de salida transmita la luz a través de la rejilla y sea capturado el espectro de luz visible por la cámara del celular, para ser analizado con el software Matlab. En segundo lugar, debido a que la absorción de la glucosa depende de la longitud de onda, analizaremos las imágenes obtenidas después de ser reflejadas por una rejilla de difracción. Estas imágenes serán analizadas mediante siete fórmulas de color para determinar cuál curva tiene el comportamiento más favorable.

Finalmente, en el análisis de resultados, a las imágenes captadas se les obtiene la media de nivel de gris; y como ya fue mencionado las imágenes serán convertidas en el programa Matlab con siete fórmulas diferentes. A cada nivel de glucosa analizado corresponde un conjunto de imágenes de las cuales se calculará un valor a través del promedio de la media de la intensidad en escala de grises de cada imagen. Para obtener una gráfica de concentración de glucosa versus la media de gris de la imagen capturada, donde podremos analizar una curva característica de los resultados obtenidos, y seleccionar la fórmula que nos produce mayor comportamiento lineal.

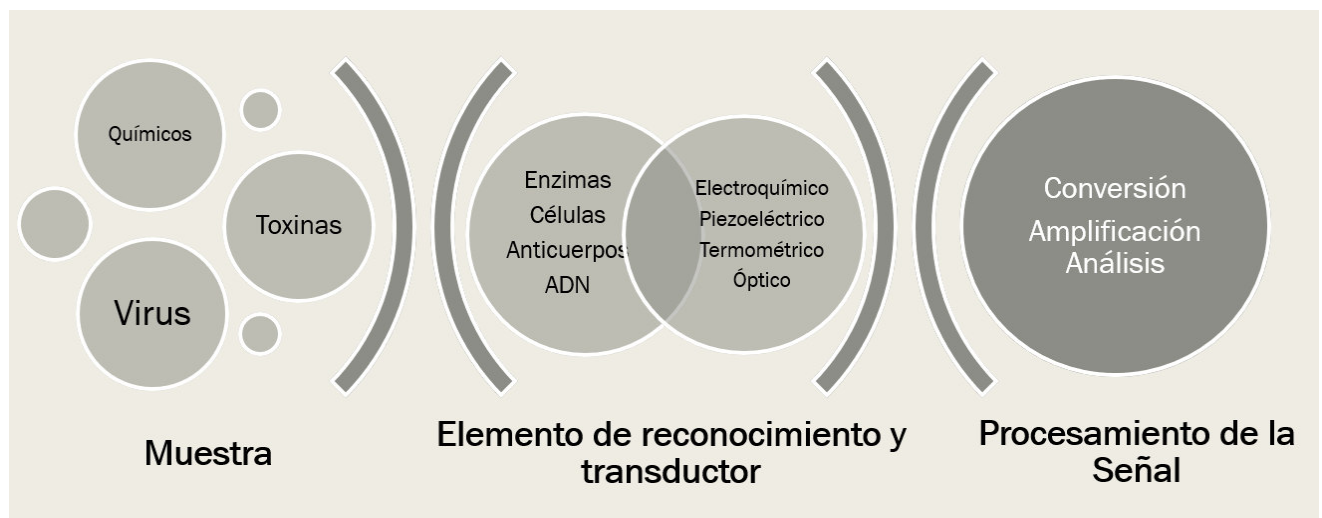
En el presente trabajo se estructura el desarrollo de la tesis de la siguiente manera, principalmente una breve introducción descrita en este capítulo. A continuación, en el Capítulo 2 una descripción de la bibliografía utilizado permitiendo obtener el estado del arte de la tesis, seguido del Capítulo 3 con el marco teórico, donde se describe la técnica utilizada para la fabricación de los bioproductos y los conceptos relacionados al procesamiento digital de imágenes utilizado, continuando con el Capítulo 4 donde se describe la metodología aplicada, dividida en tres fases que permiten cumplir con los objetivos de la tesis. De esta forma para poder comprender los resultados mostrados en el Capítulo 5 y finalmente exponer en el Capítulo 6 las conclusiones a las cuales se llegó con el desarrollo de este proyecto.



# Capítulo 2

## Estado del Arte

Conocido el concepto de biosensores descrito de manera introductoria en el Capítulo 1 es importante aclarar que existen varios tipos de biosensores, clasificados según el elemento de reconocimiento y según el transductor. El elemento de reconocimiento es mediante el cual sucede la reacción bioquímica y está fuertemente ligado al analito, y dividen a los biosensores en biocatalíticos o de bioafinidad. Por otra parte, los biosensores también pueden ser clasificados según el transductor, y es el dispositivo que recibe la señal de una naturaleza y la convierte en otra que puede ser identificada en la salida del sistema para determinar las diferentes variaciones en la señal, para ser posteriormente pasado de ser necesario por un proceso de amplificación, y finalmente ser convertida y analizada la señal transmitida [11].



**Figura 1.** Esquema de un biosensor.

En la Figura 1 podemos observar el esquema de un biosensor, al comienzo se encuentra la muestra, la cual tiene el analito, que es el elemento que se desea identificar, y puede ser algún químico, toxina o virus, y dependiendo del analito se seleccionará el elemento de reconocimiento, en este caso el elemento a identificar es la glucosa, específicamente su concentración. Como ya se mencionó los elementos de reconocimiento pueden ser biocatalíticos o de bioafinidad. Los biosensores biocatalíticos también se conocen como sensores de metabolismo y son dispositivos cinéticos basados en el logro de una concentración estable de una especie detectable transducida. El progreso de la reacción biocatalizada está relacionado con la concentración del analito, que puede medirse controlando la velocidad de formación de un producto, la desaparición de un reactivo o la inhibición de la reacción. El biocatalizador puede ser una enzima aislada, un microorganismo, un orgánulo subcelular o una rebanada de tejido. En cambio, en los biosensores de bioafinidad la molécula receptora se une al analito "irreversiblemente", es decir, este proceso no puede devolverse, quedan unidos permanentemente los elementos y no catalíticamente. El evento de unión entre la molécula objetivo y el biorreceptor, por ejemplo, un anticuerpo, un ácido nucleico o un receptor de hormona, es el origen de un cambio fisicoquímico que será medido por el transductor. Este biosensor de glucosa es biocatalítico y el elemento de reconocimiento es la enzima glucosa oxidasa [12].

Por otro lado, la clasificación de los biosensores, según su transductor pueden ser electroquímicos, piezoeléctricos, termométricos u ópticos. Dependen directamente de la señal recibida y la transmitida. Los transductores electroquímicos transforman la señal que se produce por la interacción entre el sistema de reconocimiento y el analito a detectar en una señal eléctrica y proporcionan información analítica cuantitativa o semicuantitativa específica. Los sistemas de transducción piezoeléctricos, másicos, gravimétricos o acústicos miden cambios directos de masa inducidos por la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Los transductores termométricos se basan en la detección del calor generado en las reacciones enzimáticas exotérmicas, que se puede relacionar con la concentración de analito, estos cambios de temperatura normalmente se determinan por medio de termistores a la entrada y a la salida del dispositivo en el que se encuentran inmovilizadas las enzimas [3].

Y finalmente, Los transductores ópticos se basan en la medición de las variaciones que se producen en las propiedades de la luz, por ejemplo, intensidad, índice de refracción, fase, entre otros. Las variaciones ocurren como consecuencia de la interacción física o química entre el analito a detectar y el elemento biológico de reconocimiento del biosensor. Cada uno de los transductores mencionados anteriormente tienen otras subdivisiones, pero nos enfocaremos en este último tipo de transductor.

En este proyecto el biosensor utilizado es óptico, la señal recibida en el transductor es la luz y la enviada es la imagen que será captada por la cámara después de pasar por una rejilla de difracción, donde el haz de luz será dividido en colores. Los colores serán captados por la cámara y mediante programación se determinará la variación de intensidades en los diferentes colores del espectro visible divididos en pixeles en la imagen captada. A su vez, como ya fue mencionado los biosensores ópticos también pueden ser clasificados como se observa en la Figura 2. En la primera columna se observan los diferentes analitos que se pueden encontrar en la muestra, la segunda columna es el elemento de reconocimiento, el cual es totalmente dependiente al analito, las dos siguientes columnas nos muestran algunos transductores ópticos que existen y las variables ópticas que pudieran detectar, y finalmente la señal convertida o amplificada de ser necesario para posteriormente ser procesada y analizada.

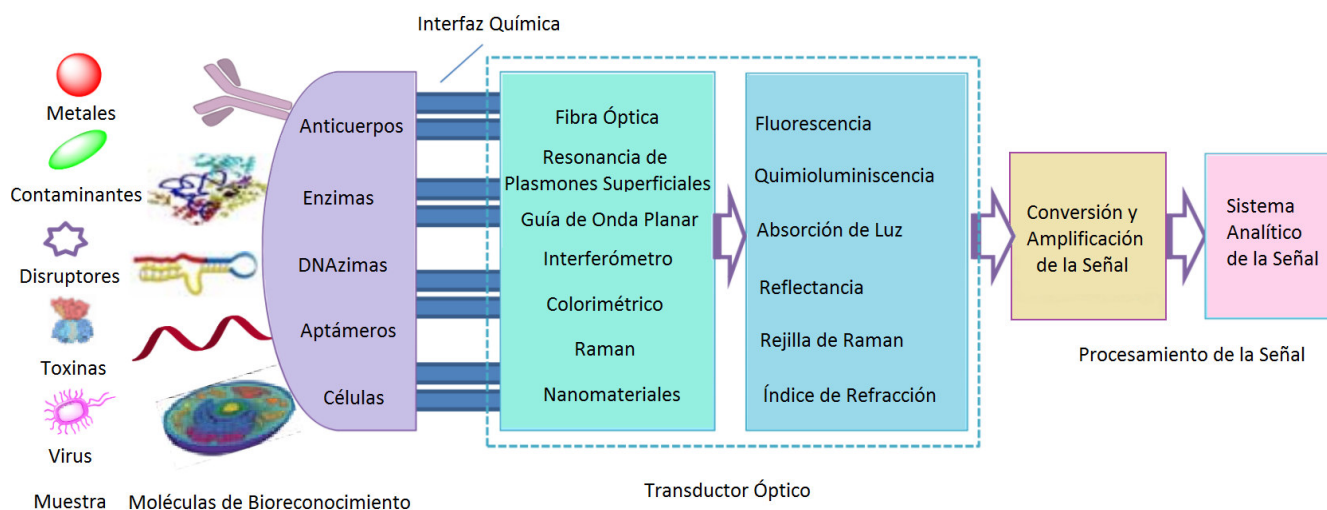


Figura 2. Esquema de un biosensor óptico [13].

Los biosensores ópticos tienen diferentes medios y fenómenos en los que son basados. Según el medio pueden ser de tipo: fibra óptica, resonancia de plasmón superficial, guía de onda plana, interferométricos, colorimétricos, Raman, o de nanomateriales y el fenómeno óptico puede ser fluorescencia, quimioluminiscencia, reflectancia, rejillas raman, o por índice de refracción. En todos los casos lo más importante es la actividad óptica del analito, por la cual habrá variaciones en alguno de los fenómenos ópticos. Estas variaciones pueden observarse en la intensidad de luz, el tiempo de decaimiento, el índice de refracción, la polarización o la fase de la radiación emitida [13].

Por consiguiente, el principio de reflexión interna total de la fibra óptica será utilizado en nuestro biosensor de glucosa mediante una fibra óptica plástica. La fibra óptica plástica tiene las virtudes esenciales de la fibra óptica de vidrio a cortas distancias, y puesto que la distancia entre la fuente de luz y el detector es de máximo 20 cm, podemos perfectamente usar esta misma como nuestro sustrato para la técnica Sol-Gel y a su vez como guía de onda en nuestro biosensor. Además, gracias a que su diámetro es mayor y por el material del que está hecha, la adherencia del elemento de reconocimiento será más sencilla y firme. Finalmente, el fenómeno óptico en el que se basa es la absorción, debido a la onda que pasa a través del recubrimiento y por la reacción bioquímica que existe entre la glucosa y la glucosa oxidasa en la salida de la fibra óptica se pueden observar cambios en la intensidad de la luz.

Es importante destacar el amplio uso de los biosensores ópticos tanto en la industria médica, como la agroalimentaria y la farmacéutica, así como para problemas ambientales y aplicaciones militares. Su amplio uso se debe a las ventajas que ofrecen, por ejemplo, se pueden usar en entornos hostiles y tienen inmunidad electromagnética, muchos analitos presentan actividad óptica y permiten una gran gama de dispositivos, se pueden usar a largas distancias y el biorreceptor no necesita estar en contacto íntimo con la fibra óptica. Además, se pueden miniaturizar fácilmente a bajo costo, y tienen aplicación para mediciones in vivo. Por supuesto una guía de luz puede llevar más información que un cable eléctrico y la dependencia de la temperatura de la fibra es menor que la de los electrodos.

En consecuencia, existen varios biosensores de glucosa, que sirven como fundamento para esta tesis, demostrando que es posible determinar concentración de glucosa a través del uso de la técnica sol-gel para la adherencia del elemento de reconocimiento (la enzima glucosa oxidasa), esta técnica será ampliamente explicada en el siguiente Capítulo, como es el caso de los biosensores de glucosa basados en sol-gel que emplean transductores ópticos de oxígeno, y un método para compensar el fondo de oxígeno variable estudiados por Wolfbeis [8]. En donde nos explica que se han desarrollado varios tipos de biosensores de glucosa de película delgada basados en el uso de la enzima glucosa oxidasa. En este caso no se tomará en cuenta la variable oxígeno solo se estudiará la variación de concentración de glucosa y sus efectos en la intensidad de la luz.

En este sentido, existen otros biosensores ópticos donde el elemento de reconocimiento utilizado no es la glucosa oxidasa, pero si utilizan la técnica sol-gel, como es el caso del artículo publicado por Tierney et al [9]. En donde propone la determinación de los niveles de glucosa utilizando un biosensor de fibra óptica de hidrogel funcionalizado: para la monitorización continua de la glucosa en sangre in vivo. En este caso, la determinación de glucosa en solución se basa en la contracción inducida por glucosa del hidrogel. El gel se fabricó en el extremo de una fibra óptica, y la longitud óptica se midió mediante una técnica interferométrica. Se abordaron los efectos de temperatura, variación de tamaño, interferencia molecular y reversibilidad. Por ser una técnica de interferometría, el biosensor es dependiente de la temperatura, pero en este estudio el fenómeno en que se basa es la absorción. L

as variaciones no se tomarán en cuenta en la longitud óptica si no en la intensidad de la luz observada en la variación por color de los pixeles de la imagen captada.

Posteriormente, Hussain aplicó la técnica sol-gel para la inmovilización del elemento de reconocimiento [10]. La fuente de luz usada es en el rango del ultravioleta del espectro electromagnético. Otro punto que analizan es que la fluorescencia necesita de ciertos dispositivos para ser identificada, como por ejemplo espectroscopia de fluorescencia, a diferencia de la intensidad de luz que puede ser determinada por otros métodos más simples como lo son la captura de la imagen a la salida de la rejilla de difracción.

Cabe mencionar que en la Universidad de Guanajuato se han estudiado varios biosensores, específicamente se hará mención del estudio de un biosensor de pH, desarrollado para su tesis de maestría por Saavedra del cual se tomó la idea del uso de fibra óptica plástica como transductor [6]. Además, el arreglo experimental utilizado consiste en que la fuente de luz sea un led flash y la cámara sea la encargada de capturar la imagen. La imagen capturaré la luz difractada por una rejilla de difracción que recibe la luz transmitida por la fibra óptica plástica. En la fibra óptica plástica se encuentra el elemento de reconocimiento inmovilizado a través de la técnica sol-gel. La gran diferencia es que en este caso el elemento de reconocimiento será la enzima glucosa oxidasa por lo cual permitirá que el fenómeno de absorción sea afectado por la variación de la concentración de glucosa en la muestra.

Por último, para la validación de los datos que serán adquiridos se utilizarán muestras con concentraciones de glucosa conocida, así como, para el estudio del biosensor de pH, fueron utilizados buffer de pH, los cuales tienen valores de pH conocidos. De esta manera la curva de caracterización encontrada debe corresponder sus valores en la variación de la media de nivel de gris obtenido en la imagen. La media de nivel de gris será obtenida a través de un procesamiento realizado en MATLAB a las imágenes captadas por la cámara, el procesamiento será explicado en el Capítulo 4.

Cabe resaltar, que para el próximo capítulo se utilizó como base, bibliografía donde se desarrolla la técnica Sol-gel, sus procesos y aplicaciones, y varios artículos relacionados directamente con la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa a través de la técnica Sol-Gel. Aunque utilizaron la técnica en electrodos y un film, independientemente, traía amplios detalles sobre el desarrollo de la misma. Por lo tanto, estos artículos se utilizaron para conocer los elementos necesarios y parámetros utilizados, que antes en el laboratorio no eran de importancia para otros biosensores, en dicha inmovilización, la cual es fundamental para la fabricación de nuestro biosensor de glucosa a través de fibra óptica plástica.

# Capítulo 3

## Marco Teórico

En el presente capítulo se desarrollarán los conceptos, metodología y aplicaciones de la técnica usada en esta tesis para la fabricación de los bioproductos llamada Sol-Gel, así como, la descripción de los elementos usados para el reconocimiento y para el análisis de nuestro biosensor: Glucosa oxidasa y glucosa. Y finalmente, la descripción del método utilizado para el procesamiento de la información y realización de la curva característica.

### 3.1. Técnica Sol-Gel

Para poder aplicar la técnica Sol-Gel correctamente es necesario conocer los conceptos básicos, las etapas por las cuales pasa a través del proceso hasta llegar a conseguir el objetivo deseado y por supuesto conocer los parámetros que afectan dicho proceso. Puesto que al ser una técnica tan versátil los caminos que puede tomar son varios, en estos caminos influyen varios factores que van desde las cantidades usadas en su preparación hasta la temperatura con la que se realiza el secado y el pH del medio donde se hace la mezcla. Por todas estas razones es la necesidad de definir el concepto sol-gel, y describir las etapas del proceso. A continuación, se mencionarán algunas ventajas e inconvenientes de este, los factores controlantes, las variantes que puede tener según el proceso, y finalmente la aplicación que le daremos en esta tesis: el encapsulamiento de la enzima glucosa oxidasa en un recubrimiento sobre fibra óptica plástica descubierta, usada como guía de onda en nuestra experimentación.

### 3.1.1 Definición

El proceso sol-gel es un método de síntesis en el cual, partiendo de precursores moleculares como alcóxidos metálicos o sales inorgánicas, se obtiene un esqueleto del óxido mediante reacciones de hidrólisis y polimerización a baja temperatura, lo cual permite la síntesis de fases metaestables del óxido e incluso de sólidos mixtos órgano-inorgánicos. Las especiales características de los soles y geles permiten la síntesis de fibras, láminas, cadenas, geles y polímeros tridimensionales. Una característica particular del proceso sol-gel es la posibilidad que ofrece de controlar el proceso de síntesis desde el precursor molecular al producto, lo cual supone la posibilidad de sintetizar nuevos materiales órgano-inorgánicos [14].

Por lo tanto, los materiales sol-gel son sólidos metaestables que se forman en reacciones cinéticamente controladas a partir de precursores moleculares, que constituyen los bloques de construcción para los materiales posteriores. Una consecuencia inmediata es que todos los parámetros de reacción, incluidas las propiedades del precursor, tienen una influencia decisiva en la estructura y, por consiguiente, en las propiedades de los materiales sol-gel [15].

Un sol es una suspensión estable de partículas coloidales (nanopartículas) en un líquido. Las partículas pueden ser amorfas o cristalinas, y pueden tener subestructuras densas, porosas o poliméricas.

Un gel consiste en una red sólida porosa, tridimensional continua que rodea y soporta una fase líquida continua ("gel húmedo"). En la mayoría de los sistemas de sol-gel para la síntesis de materiales de óxido, la gelificación (es decir, la formación de los geles) se debe a la formación de enlaces covalentes entre las partículas de sol. La estructura de una red de gel depende en gran medida del tamaño y la forma de las partículas de sol.



### 3.1.2 Etapas del proceso

Durante el proceso ocurren dos reacciones: la hidrólisis y la condensación, que ocurren dependiendo de si el precursor es una disolución acuosa de una sal inorgánica o un alcóxido disuelto en un disolvente orgánico. En el caso la hidroxilación de la sal inorgánica se lleva a cabo modificando el pH de la disolución acuosa y la hidroxilación de los alcóxidos se produce vía hidrólisis por adición de agua, este último es el caso de esta tesis. A la hidroxilación le sigue un proceso de condensación, que conduce a la eliminación de moléculas de agua o de alcohol, mediante procesos de olación (formación de puentes OH) u oxolación (formación de puentes oxígeno).

En consecuencia, podemos deducir que los precursores más comunes son soluciones acuosas de silicatos ("vidrio soluble") y alcóxidos de silicio, Si (OR)<sub>4</sub>, principalmente tetrametoxisilano (TMOS) o tetraetoxisilano (TEOS). El precursor utilizado en nuestro experimento es el TEOS. Las diferencias más importantes entre los dos tipos de precursores son las siguientes [16]:

- La gelificación se inicia en sistemas acuosos de silicato mediante cambios de pH y en sistemas precursores de alcóxido por adición de agua.
- Una mezcla de un alcóxido en agua y alcohol reaccionaría muy lentamente. Por lo tanto, la catálisis ácida o básica es necesaria para comenzar las reacciones de hidrólisis y condensación de los alcoxisilanos.
- El disolvente en las reacciones basadas en vidrio acuoso es siempre agua, mientras que los alcóxidos se emplean limpios o disueltos en un disolvente orgánico. Como muchos alcoxisilanos son inmiscibles con agua, a menudo se usan alcoholes para homogeneizar la mezcla de reacción.
- Los sistemas basados en alcóxido son más complejos porque más parámetros influyen en las reacciones de sol-gel. Esto brinda más posibilidades para controlar la textura y las propiedades de los materiales obtenidos.

### 3.1.3 Ventajas e inconvenientes

Entre las principales ventajas del proceso sol-gel se encuentran las siguientes [14]:

- Alta homogeneidad de las disoluciones multicomponentes, geles y materiales obtenidos.
- Posibilidad de obtener materiales de formas muy variadas: fibras, partículas, esferas, composites, etc.
- Baja temperatura de procesado, lo que conlleva: ahorro de energía, mínima pérdida por evaporación, mínima contaminación del aire.
- Obtención de nuevos sólidos cristalinos y no-cristalinos, debido a la posibilidad de controlar y modificar cada etapa del proceso.
- Excelentes características de los óxidos obtenidos (área superficial modificable, gran homogeneidad y pureza, control microestructural de las partículas metálicas, y distribuciones estrechas de tamaños de partículas y de poros).

Respecto a los inconvenientes, los más señalados son [14]:

- Problemas de encogimiento durante el secado.
- Presencia de poros y componentes residuales.
- Riesgos de las disoluciones orgánicas.

Para solucionar estos inconvenientes en el trabajo de tesis, fue necesario hacer un estudio del proceso de gelificación para observar cuanto se reducía el material y en cuanto a los poros y componentes residuales, se deben estudiar con procesos específicos para determinar si afectan la medición de nuestro analito, por lo tanto, no fue evaluado. Por último, los riesgos de disolución se descartaron debido a que sin la presencia de la enzima no se observarían cambios en la curva característica.

### 3.1.4 Parámetros que influyen en el proceso Sol-Gel

Por lo que se ha dicho, es obvio que los sistemas son muy complejos y son posibles muchas rutas diferentes desde el precursor molecular hasta el gel de sílice final. Los parámetros químicos discutidos a continuación determinan qué ruta se toma. Debido a esta complejidad, es necesario una comprensión detallada (y conocimiento) de los parámetros que influyen en las velocidades de reacción y, por lo tanto, la evolución de la estructura para adaptar la textura y las propiedades de los materiales sol-gel. Los parámetros más importantes que influyen en la hidrólisis y la condensación son:

- El tipo de precursor o precursores.
- El pH del medio u otros catalizadores.
- La relación de grupo alcóxilo a agua para precursores de alcóxido.
- El tipo de solvente.
- La temperatura.
- La concentración relativa y absoluta de los componentes en el precursor.

#### **Precursor**

A diferencia del vidrio soluble como precursor, los grupos Si-OR de alcóxidos de silicio deben hidrolizarse primero antes de que puedan tener lugar las reacciones de condensación.

#### **Catalizador (pH)**

Como se discutió anteriormente, los mecanismos de reacción para la catálisis ácida o básica son muy diferentes. Además, las velocidades de reacción para la hidrólisis y la condensación de alcóxidos de silicio tienen una dependencia del pH diferente como podemos observar en la Figura 3.

El pH es un parámetro especialmente importante para controlar la textura de los geles a partir de soluciones de vidrio soluble. A un pH intermedio, la velocidad de reacción de la condensación es proporcional a la concentración de los iones OH. A pH inferior a aproximadamente 2, las especies de ácido silícico están cargadas positivamente, y de acuerdo con el mecanismo la velocidad de reacción de la condensación es proporcional a la concentración de H<sup>+</sup>. En nuestro caso, nos interesa un pH intermedio, por dos razones, primero porque es el pH requerido para que la enzima funcione de manera óptima y segundo porque al controlar las concentraciones podemos obtener un recubrimiento sólido del sustrato.

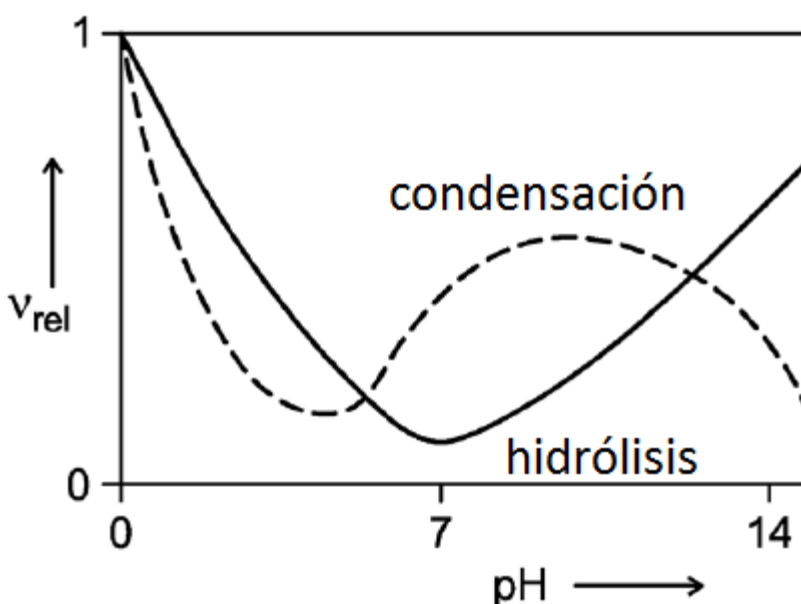


Figura 3. Dependencia de las tasas relativas de hidrólisis condensación sobre el pH [16].

### Relación Grupo Alcoxi / Agua ( $R_w$ )

La reacción global para el procesamiento de sol-gel de tetraalcoxisilanos implica que se necesitan dos equivalentes de agua ( $R_w = 2$ ) para convertir  $Si(OR)_4$  en  $SiO_2$ . Se necesitan cuatro equivalentes de agua ( $R_w = 1$ ) para la hidrólisis completa de  $Si(OR)_4$  si no se produce condensación. El  $R_w$ , junto con el tipo de catalizador, influye fuertemente en las propiedades de los geles de sílice. Para este punto se experimentó con varias relaciones hasta conseguir una adherencia total del recubrimiento.

### **Solvente**

Puede ser necesario un solvente para homogeneizar la mezcla de reacción de sistemas basados en alcóxido, especialmente al comienzo de la reacción. La polaridad, el momento dipolar, y la viscosidad del solvente influyen en las velocidades de reacción y, por lo tanto, en la estructura del material sol-gel final. Los solventes polares (agua, alcohol o formamida) estabilizan especies polares mediante puentes de hidrógeno. Los solventes no polares (tetrahidrofurano y dioxano) se usan a veces para sistemas de alcóxidos hidrolizados de forma incompleta. En este proyecto se utiliza el alcohol, solvente polar, debido a que el precursor usado (TEOS) no es soluble con el agua, necesaria para activar el proceso, pero tanto el precursor como el agua son solubles en agua, de esta forma obtenemos una mezcla homogénea.

Finalmente, la temperatura y las concentraciones del proceso se explicarán en el capítulo de Metodología, puesto que fue en fase experimental que se decidieron estos parámetros. Además, de manera ilustrativa podemos observar la Figura 4, donde en la etapa inicial de las reacciones de sol-gel, se forman pequeñas partículas oligoméricas tridimensionales. La Figura 4 muestra esquemáticamente el desarrollo estructural de geles de sílice a partir de precursores moleculares. Si las partículas primarias (nano) formadas inicialmente se agregan una vez que han alcanzado un cierto tamaño o continúan creciendo depende de las condiciones experimentales. La agregación de las partículas primarias puede conducir a partículas secundarias. Si las partículas (con una subestructura polimérica o densa) pueden permanecer suspendidas en solución (es decir, formar un sol estable) o agregarse para formar una red tridimensional (es decir, un gel húmedo) nuevamente depende del sistema y las condiciones experimentales. Los procesos químicos básicos (hidrólisis y condensación), sin embargo, son los mismos. También podemos observar cómo influye el pH, en el tamaño o formación de la red.

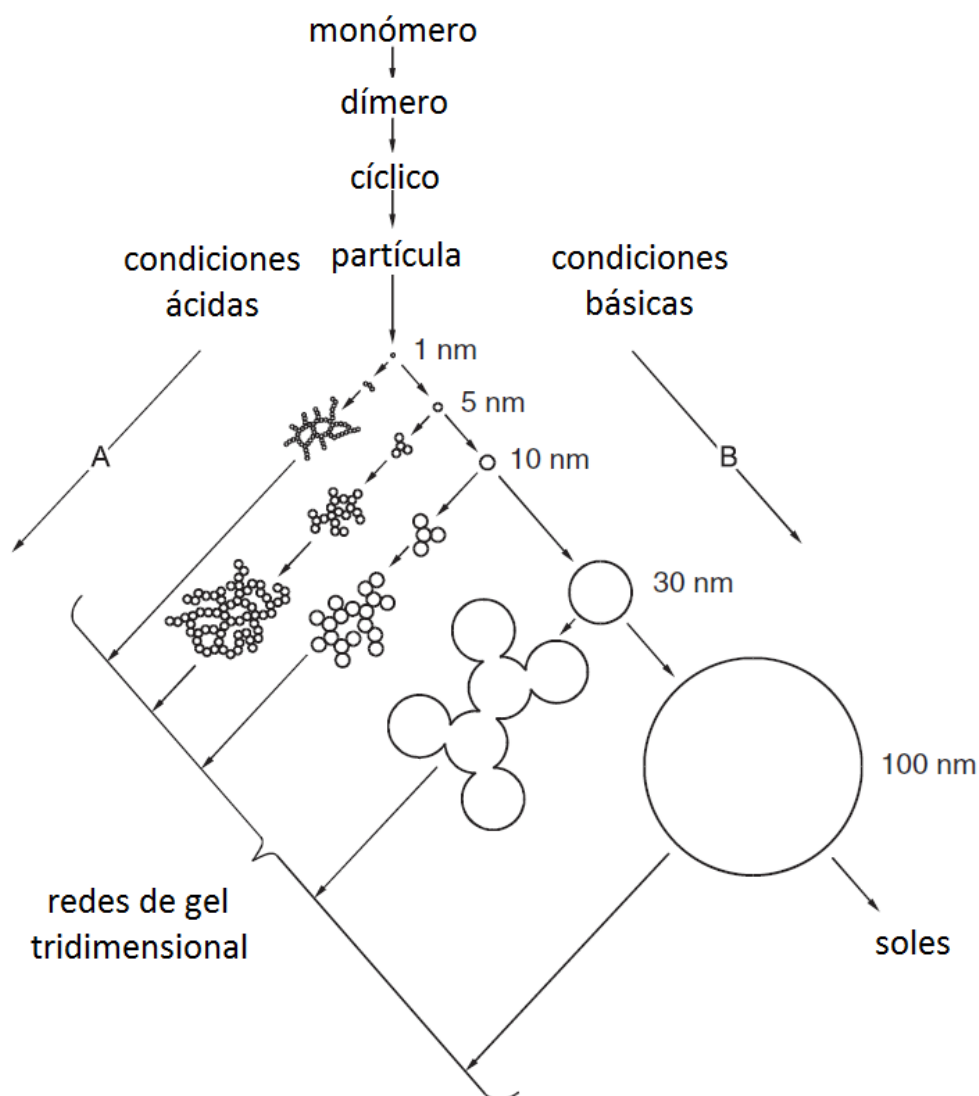
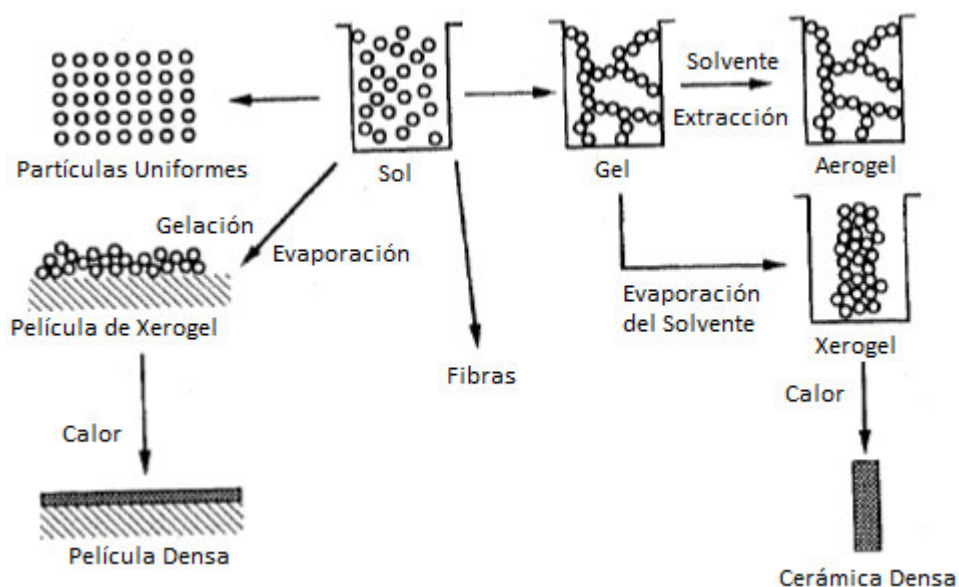


Figura 4. Desarrollo estructural de geles de sílice [17].

Por otra parte, en la Figura 5, podemos observar las diferentes rutas que puede tomar el proceso Sol-gel, ya sea para crear recubrimientos delgados, partículas uniformes, xerogeles o aerogeles, variando los parámetros anteriormente mencionados, como lo son, el precursor y su concentración, el catalizador usado que proporciona el pH del medio, el solvente para lograr una solución homogénea y la relación agua/alcóxido para activar el proceso y decidir el tamaño de la partícula, podemos seguir alguna de estas rutas. Lo principal es que se parte de una solución coloidal que posteriormente es gelificada, ya sea para crear un gel, un sólido, o polvos, también el proceso de deposición presenta un punto clave.



**Figura 5.** Esquema de las rutas que se pueden seguir con el proceso Sol-gel [17].

### 3.1.5. Proceso de Recubrimiento utilizado: Dip-coating

El proceso de recubrimiento utilizado en esta tesis es por inmersión (Dip-coating), es un proceso de revestimiento industrial que se utiliza, por ejemplo, para fabricar productos a granel tales como telas y condones revestidos y revestimientos especializados, por ejemplo, en el campo biomédico. El recubrimiento por inmersión también se utiliza comúnmente en la investigación académica [18], donde muchos proyectos de investigación de ingeniería química y de nanomateriales utilizan la técnica de recubrimiento por inmersión para crear revestimientos de película delgada. Para este proceso se fabricó un dip-coater, en colaboración con el grupo de optoelectrónica, que pudiera realizar todo el proceso. El proceso se puede separar en las siguientes etapas [19]:

**Inmersión:** el sustrato se sumerge en la solución del material de recubrimiento a una velocidad constante (preferiblemente sin fluctuaciones).

**Puesta en marcha:** el sustrato ha permanecido dentro de la solución durante un tiempo y comienza a elevarse.

**Deposición:** la capa delgada se deposita sobre el sustrato mientras se levanta. El retiro se lleva a cabo a una velocidad constante para evitar cualquier nerviosismo. La velocidad determina el espesor del recubrimiento (la retirada más rápida proporciona un material de recubrimiento más grueso) [20].

**Drenaje:** el exceso de líquido se drenará de la superficie.

**Evaporación:** el solvente se evapora del líquido, formando la capa delgada. Para solventes volátiles, como alcoholes, la evaporación comienza ya durante los pasos de deposición y drenaje.

En el ámbito de la óptica, la técnica sol-gel tiene muchas aplicaciones entre las cuales podemos mencionar: Revestimientos derivados de sol-gel que transmiten longitudes de onda de luz visible de una manera preferencial y, por lo tanto, generar color, a causa de la absorción y de la interferencia. Películas ferroeléctricas y electroópticas a base de plomo y otros materiales pueden depositarse mediante el procesamiento de sol gel basado en la hidrólisis y condensación de alcóxidos o mediante la descomposición orgánica del metal [21].

Además, el proceso sol-gel permite la preparación de vidrios y compuestos con homogeneidades suficientes para aplicaciones ópticas. Por otra parte, el procesamiento láser se ha utilizado para modelar películas de sol-gel para una variedad de aplicaciones en óptica: películas electrocrómicas, guías de onda de canal y los filtros de color dicróicos multicapa se han formado por escritura directa de láseres en películas de óxido, eliminando en estos casos la necesidad de un procesamiento fotolitográfico de múltiples pasos. También es posible dopar películas para sensado a través de la técnica sol-gel y como en el caso de esta tesis para encapsulación de enzimas en recubrimientos para su uso en biosensado [21].



### **3.1.6. Encapsulación de la enzima**

La conveniencia técnica y la necesidad de reducir los costos están impulsando el interés industrial, y por lo tanto la investigación aplicada, hacia un esfuerzo cada vez mayor para preparar con éxito enzimas inmovilizadas. La inmovilización permite la reutilización de enzimas, las protege de condiciones externas adversas, contaminación microbiana y prolonga su vida útil. Probablemente haya tantos métodos de inmovilización como enzimas, esta proliferación de técnicas refleja la complejidad del material biológico y la variedad de sus usos. Todavía se demandan técnicas generales simples y de bajo costo, que den como resultados catalizadores enzimáticos estables y activos [22].

Por otra parte, el procedimiento de inmovilización o encapsulación deseado debe ser simple, leve (no desnaturalizante) y generalmente aplicable. Por lo cual, se debe usar un catalizador enzimático ideal, que debería estar unido a un vehículo hidrófilo altamente poroso mecánicamente y químicamente estable. Se requiere que el enlace que une la enzima al soporte sea estable bajo las condiciones de aplicación del catalizador para evitar la lixiviación. Las fuertes fuerzas de unión también tienen efectos estabilizadores de la actividad enzimática [23].

El procedimiento de inmovilización más generalmente aplicable es un simple atrapamiento de la enzima en un gel formador de polímeros naturales o sintéticos. El principal inconveniente de esta técnica es la pérdida de la enzima por filtración a través de una red no uniforme de moléculas de polímero. Las interacciones más bien débiles entre la enzima y la matriz dan como resultado un movimiento difusional relativamente no restringido de las cadenas polipeptídicas. Esto puede ser beneficioso cuando se requieren transiciones conformacionales para una catálisis exitosa. De lo contrario, esta libertad de movimiento difusional puede afectar negativamente la estabilidad enzimática inmovilizada [24].

Por lo tanto, la técnica que será usada en esta tesis demuestra que la enzima glucosa oxidasa puede quedar atrapada dentro de la matriz de un sol-gel formador, y que las fuertes fuerzas de unión retienen la enzima en la matriz, produciendo así un considerable efecto estabilizador. Además, queda probado que la preparación de catalizador de enzima de vidrio sol-gel es un procedimiento simple, generalmente aplicable, que da como resultado un catalizador de enzima cuyas propiedades son similares a enzimas inmovilizadas covalentemente.

La aplicación del proceso sol-gel [17] para atrapar moléculas orgánicas en vidrios inorgánicos ahora está bien documentada y ampliamente demostrada. Varias propiedades de los vidrios de sol-gel los hacen especialmente atractivos como posibles catalizadores de enzimas: (a) la capacidad de atrapar grandes cantidades de aditivos, (b) la estabilidad térmica y química de la matriz, (c) la simplicidad de la preparación sin necesidad de modificación covalente, (d) fácil manipulación y producción tecnológica en cualquier geometría deseada, incluidas las películas delgadas.

### **Glucosa oxidasa y glucosa**

La glucosa oxidasa es la enzima más ampliamente utilizada como reactivo analítico. Este es el resultado de su utilidad en la determinación de glucosa, un analito de gran interés analítico, y su costo relativamente bajo y buena estabilidad que hacen que el sistema glucosa / glucosa oxidasa sea un modelo muy conveniente para el desarrollo de métodos, particularmente en el área de biosensores [25].

Existen muchos métodos para utilizar la enzima glucosa oxidasa como reactivo analítico para la detección de glucosa debido a su alta selectividad [26], por ejemplo, disolviéndola en soluciones homogéneas, inmovilizándola en matrices sólidas o agregándola a reactores que incluyan un detector, que a su vez pueden ser con detectores eléctricos, colorimétricos, ópticos, térmicos, entre otros. Pero en este caso específico nos enfocaremos en la inmovilización, también conocido como encapsulamiento.

La inmovilización, se refiere al confinamiento de una especie química dada de tal manera que permanece físicamente separada de la solución de sustrato y los productos de las reacciones catalizadas por enzima. El biocatalizador está en forma insoluble en el medio, y la biocatálisis heterogénea ocurre en un espacio restringido en el cual las consideraciones difusionales juegan un papel más crítico que en la catálisis homogénea.

Los cuatro métodos más comunes de inmovilización enzimática implican [27]: (1) contención por una membrana, (2) atrapamiento en una matriz de gel polimérico, (3) inmovilización superficial por adsorción física, y (4) inmovilización superficial por unión covalente. La contención por una membrana y el atrapamiento de gel encuentran uso en la construcción de los llamados electrodos y biosensores enzimáticos, y las aplicaciones de enlace covalente superan a las que usan adsorción física. En nuestro caso la inmovilización se realiza a través del atrapamiento en una matriz de gel polimérico mediante la técnica sol-gel explicada ampliamente en este capítulo.

## 3.2. Procesamiento digital de imágenes

Los métodos de tratamiento digital de imágenes derivan de dos áreas principales de aplicación, la mejora de la información de la imagen y el procesamiento de los datos de la captura para la percepción autónoma por una máquina. Desde la década de los ochenta se incrementó su desarrollo con la construcción de equipos de mayor capacidad de cómputo y con la implementación de modelos matemáticos que permiten extraer las características de la imagen [28].

Una imagen digital se define como una función bidimensional  $f(x, y)$ , donde  $x$  y  $y$  son coordenadas espaciales, y la amplitud de  $f$  en cualquier par de coordenadas es llamada la intensidad de la imagen en ese punto. La intensidad de valores de  $f$  son todas cantidades discretas y finitas. Por lo anterior, la imagen digital se compone de un número finito de elementos (cada uno tiene una localización y valor particular) denominados píxeles [29].

Como lo muestra la Figura 6, el procesamiento digital de imágenes comprende las siguientes etapas: Adquisición de imágenes, pre-procesado, segmentación, representación y descripción, reconocimiento e interpretación y base de conocimiento [30].

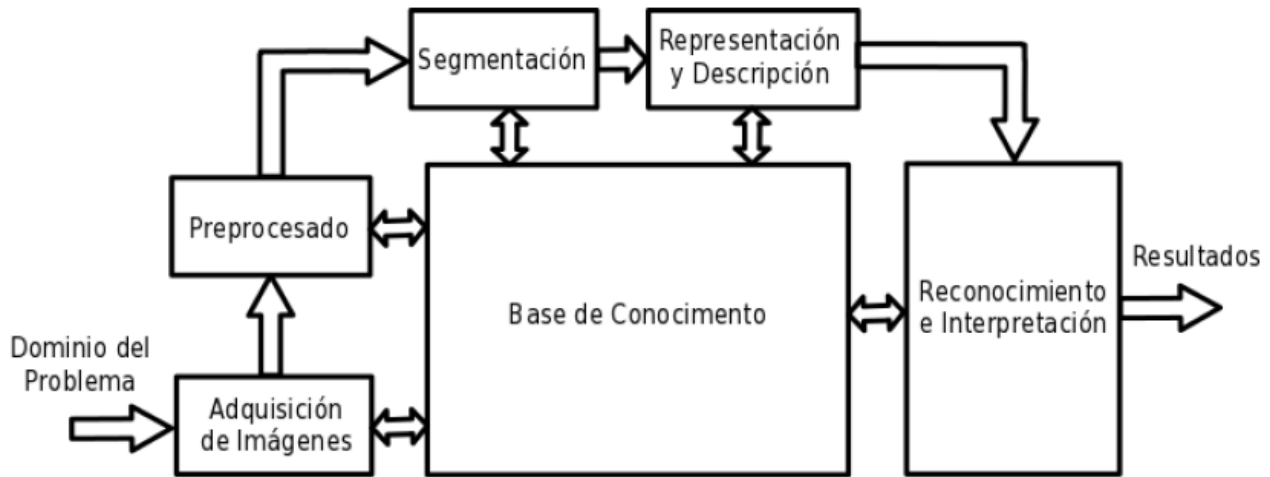


Figura 6. Etapas procesamiento digital de imágenes [30].

- 3.2.1. Adquisición de imágenes:** en esta etapa se obtiene la imagen, en nuestro caso a través de la cámara del smartphone.
- 3.2.2. Pre-procesado:** su función básica es mejorar la imagen de forma que se aumenten las posibilidades de éxito en los procesos posteriores. En este caso, realizamos un recorte de la imagen, reduciendo la zona que será analizada, y así ahorrar tiempo y recursos computacionales.
- 3.2.3. Segmentación:** consiste en dividir la imagen de entrada en partes constituyentes u objetos. En general el objetivo fundamental de la segmentación es el de extraer características representativas que permitan separar el objeto del fondo. A la salida del proceso de segmentación, generalmente se obtienen los datos de los píxeles en forma binaria (**1** o **0**), que constituyen el contorno de una región o todos los puntos de una región determinada. Esta etapa se explica en la sección de metodología.

**3.2.4. Representación y descripción:** son las partes de la solución para transformar los datos de píxel a una forma adecuada para ser posteriormente tratados. También se debe especificar un método para describir los datos de tal manera que se resalten los rasgos de interés. La descripción, también denominada selección de rasgos, consiste en extraer alguna información cuantitativa de interés o que sean fundamentales para diferenciar una clase de objetos de otra. Por ejemplo, en nuestro caso, las imágenes se encuentran a color (formato RGB) y son convertidas con siete formulas diferentes a escala de grises (Figura 7), y a partir de estas imágenes en escala de grises, que se recortaron y segmentaron anteriormente, hallamos el promedio de nuestra zona de interés (promedio de la intensidad de la imagen en escala de grises). De esta forma obtenemos un valor que representa nuestro punto en la curva característica del biosensor.

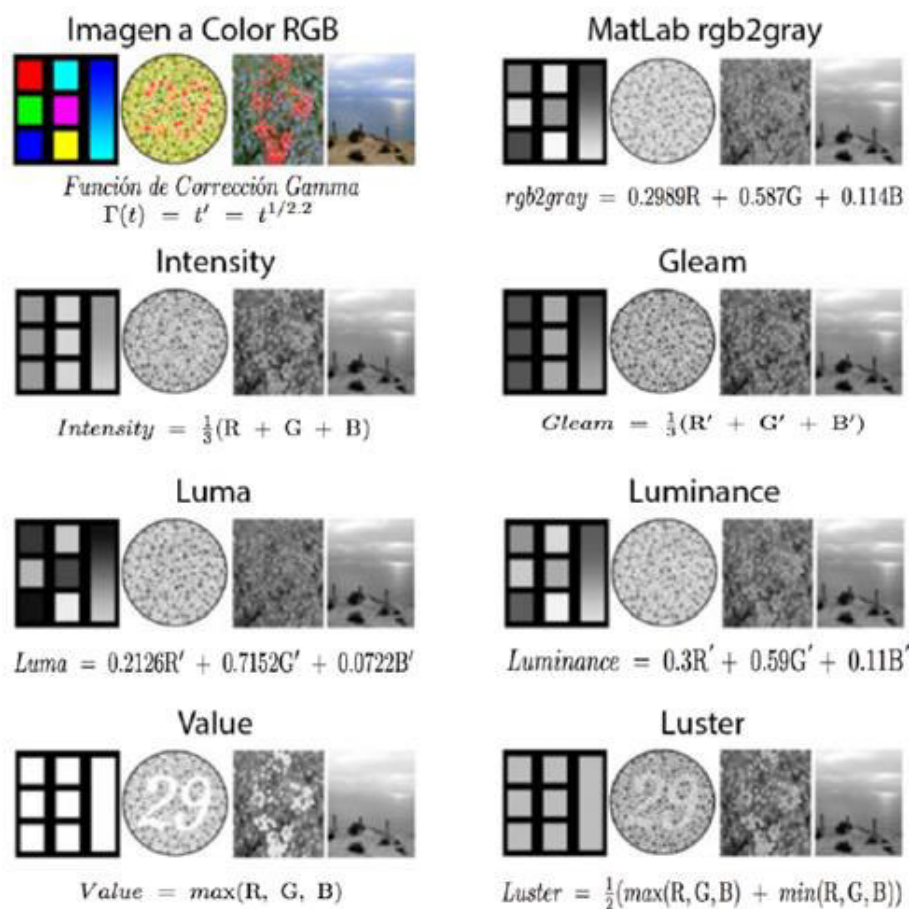


Figura 7. Conversión de Imagen en color RGB a escala de grises [31].

- 3.2.5. Reconocimiento e interpretación:** El reconocimiento es el proceso de asignar una etiqueta a un objeto basándose en la información proporcionada por los descriptores. La interpretación implica asignar significado a un conjunto de entidades etiquetadas. Por lo tanto, para cada valor promedio de intensidad hallados, corresponde un valor de concentración de glucosa, que nos permite graficar nuestras curvas características, que representen el comportamiento del biosensor de glucosa. Las cuáles serán analizadas, para seleccionar la que otorgue un comportamiento más favorable, por ejemplo, la que represente mayor linealidad, asegurando que cada valor de promedio de intensidad corresponde a un valor de concentración de glucosa.
- 3.2.6. Base de conocimiento:** representa la interacción entre el dominio del problema y la interacción con los módulos del procesamiento digital de imágenes. Este conocimiento puede ser tan simple como detallar las regiones de una imagen donde se sabe que se ubica información de interés, limitando así la búsqueda que ha de realizarse para hallar tal información; o tan compleja, como una lista interrelacionada de todos los posibles defectos en un problema de inspección.

Después de tener las bases teóricas que permiten el desarrollo de este proyecto de tesis descritas en el presente capítulo se continua con la metodología utilizada para aplicar las técnicas descritas y poder cumplir los objetivos propuestos en el trabajo. Por lo tanto, en el siguiente capítulo se describen las fases en las que se dividió el proyecto, dando detalles de las técnicas propuestas.

# Capítulo 4

## Metodología

En capítulos anteriores el problema ya fue planteado, se describen los objetivos del proyecto, algunos antecedentes o estudios previos contra los que se debaten los resultados y un breve panorama de la técnica que se utilizó, así como, aspectos teóricos que se deben tomar en cuenta durante la práctica y el desarrollo del arreglo experimental de este proyecto. Pero será de gran ayuda retomar una breve descripción de la propuesta realizada para alcanzar los objetivos deseados.

El objetivo principal es construir la curva característica de un biosensor de glucosa a través de fibra óptica plástica, para lo cual se requiere construir los bioprodo, hechos precisamente con fibra óptica plástica y donde se encontrará encapsulada, con la ayuda de la técnica sol-gel, la enzima glucosa oxidasa. Esta enzima tiene un comportamiento fielmente ligado a nuestro analito, la glucosa, que es el componente que deseamos medir; o en otras palabras uno de los dos ejes de nuestra curva característica. Para ser más específicos este eje es la concentración de glucosa. El otro eje está representado por la media de nivel de gris de la imagen captada, este valor será calculado por Matlab, a partir de la imagen capturada a la salida de la rejilla de difracción por la cámara del smartphone. Esta rejilla se encuentra a la salida del bioprodo, difractando la luz blanca que pasa a través de este e interacciona con la muestra, presentando cambios en los niveles de absorción proporcionalmente a los cambios de concentración de glucosa en la muestra, permitiendo graficar la curva característica que representa el comportamiento del biosensor de glucosa a través de fibra óptica plástica.

Por consiguiente, el capítulo de metodología está dividido en tres subsecciones, las cuales son: primero una subsección dedicada a todo lo referente con la fabricación de los bioprodos, segundo el arreglo experimental planteado y sus especificaciones, que nos permite la captura de las imágenes que serán caracterizadas, y por último el procesamiento de las imágenes obtenidas para fabricar finalmente la curva característica del biosensor de glucosa.

## **4.1. Fabricación de los bioprodos**

Los bioprodos fueron fabricados haciendo uso de la técnica sol-gel, que consiste en la preparación de una solución coloidal, que al ser expuesta a ciertas características ambientales se gelifica, obteniendo así una capa sólida en la punta expuesta sin recubrimiento de la fibra óptica plástica. Para el recubrimiento de las fibras se utilizó el procedimiento dip-coating, el cual ha presentado los mejores resultados entre los métodos de fabricación utilizados en proyectos de biosensores desarrollados en la Universidad de Guanajuato. A continuación, se dará una descripción detallada de las mezclas que fueron probadas para el encapsulamiento de la enzima y la que finalmente fue la utilizada, para luego continuar con la descripción del procedimiento usado en la fabricación de los bioprodos.

### **4.1.1. Preparación de la mezcla**

Existe mucha literatura con respecto a la técnica sol-gel, es ampliamente usada, y con usos muy diversos. Específicamente, en su uso para recubrimiento de materiales existen múltiples investigaciones, pero el reto aumenta al agregar la necesidad del encapsulamiento de la enzima. Para la fabricación de un biosensor óptico, una de las opciones es a través de los bioprodos y es necesario realizar la encapsulación de la enzima para conseguir la selectividad del sensor.



Por lo tanto, en este caso fue necesario estudiar cómo realizar la encapsulación, primero las pruebas que se realizaron fueron utilizando las cantidades registradas en los antecedentes de trabajos previos donde se está desarrollando este proyecto. Pero estas cantidades y precisamente la forma de la preparación tenían varias limitantes en nuestro caso, debido a que la enzima se desnaturaliza al estar en un medio con temperatura mayor a 9°C. Una de las primeras pruebas que se hicieron fue con esos parámetros, haciendo la mezcla a temperatura de 55°C por el desconocimiento de las limitaciones de la enzima glucosa oxidasa, se descartó esta opción al tener más información de la enzima glucosa oxidasa. Al final de esta sección se darán las especificaciones de los materiales utilizados.

Por consiguiente, después de varias pruebas y observar que no había homogeneidad en la mezcla, o su gelificación se tornaba opaca, y siguiendo datos de la literatura estudiada se decidió realizar la siguiente mezcla:

**Tabla 1.** Cantidades usadas en la primera experimentación de la mezcla Sol-gel.

Mezcla Base	Tiempo y temperatura
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 ml TEOS</li> <li>• 1 ml Etanol</li> </ul>	25 min a 55 °C
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0.3 ml Agua destilada</li> <li>• 10 ul Ácido Nítrico diluido (1/40)</li> </ul>	10 min a 55°C

La mezcla base se lleva al refrigerador aproximadamente a 8°C por 4 horas, para después tomar 1 ml de ésta y ser mezclada a partes iguales con la glucosa oxidasa preparada en un buffer de acetato de sodio según las indicaciones de su hoja de datos [31]. El problema con esta prueba fue que la gelificación se producía muy rápido, y por tanto no era suficiente el tiempo para realizar el recubrimiento de los bioproductos. Además, los bioproductos que se lograban recubrir no había adherencia, y al gelificarse el recubrimiento se desprendía de la fibra. Por consiguiente, se hicieron otras pruebas cambiando la relación entre la mezcla base y la enzima, agregando mayor y menor cantidad de enzima, pero no hubo un cambio significativo en el tiempo de gelificación y esta opción fue descartada.

Finalmente, se decidió comenzar las pruebas desde otro punto de vista, teniendo el precedente de la necesidad de adherencia del recubrimiento a la fibra. Por lo tanto, realizamos un análisis de experimentos para probar la adherencia del sol-gel sin el encapsulamiento de la enzima. El cual fue desarrollado por fases, seleccionando una variable de la mezcla sol-gel que sería la que cambiaría, en este caso la cantidad de agua. También se utilizó ácido clorhídrico en lugar del ácido nítrico, debido a los aspectos positivos de los que se hace mención en la literatura con respecto al tiempo de gelificación y la uniformidad del recubrimiento final, esto se debe a su ligada relación con el pH que le otorga al medio donde se realiza la mezcla. En la siguiente tabla podemos observar las mezclas que fueron usadas en la prueba de adherencia.

**Tabla 2.** Análisis de experimentos para evaluar la adherencia del Sol-Gel.

<b>Muestra</b>	<b>TEOS</b>	<b>Etanol</b>	<b>Agua destilada</b>	<b>Ácido clorhídrico (0.1M)</b>
R1	5 ml	5 ml	0 ml	0.8 ml
R2	5 ml	5 ml	0.4 ml	0.8 ml
R3	5 ml	5 ml	0.8 ml	0.8 ml
R4	5 ml	5 ml	1.6 ml	0.8 ml

Cabe resaltar, que el parámetro que se varía es el agua únicamente, por varias razones, primero para tener un control de la relación que se está variando, y segundo porque este parámetro nos permite variar la concentración del ácido clorhídrico, que representa la solución catalizadora y, por consiguiente, varía el pH de la mezcla. Como se vio en el capítulo anterior el pH es un factor determinante en el sol-gel, para controlar el tiempo de gelificación además del uso que va a tener el sol-gel.

En el desarrollo de la prueba de adherencia, para los cuatro casos se mezcló primero el TEOS y el etanol durante veinte minutos a temperatura ambiente, y luego se agregó gota a gota el agua mezclada previamente con el ácido, de manera que el ácido era cada vez más diluido. Además, para seleccionar la concentración inicial del ácido clorhídrico se hizo una prueba de pH a la mezcla hasta lograr un pH mayor a 5 y menor a 7, es decir, que permita un medio ácido adecuado para la enzima.

Por otra parte, para seleccionar la mezcla con mayor adherencia se utilizaron portaobjetos que eran sumergidos a diferentes instantes de tiempo durante el mezclado, estas inmersiones se realizaron con el dip-coating, comenzando con variaciones de veinte minutos hasta las dos horas mezclándose, luego cada dos horas, hasta completar ocho horas mezclándose y finalmente ocho horas más. Cada día, se probó con una muestra diferente hasta conseguir que la mejor opción era la muestra R1, al realizarle una prueba de raspado al portaobjetos, haciéndole una cuadrícula de 1x1mm y colocando sobre esta cinta adhesiva, de manera que cuando la cinta fuera removida el recubrimiento no se desprendiera de la superficie del portaobjetos. Se observó que el recubrimiento obtenido era una capa delgada, uniforme y traslúcida, por lo cual, se seleccionó la muestra R1 mezclada durante dieciséis horas como la mezcla base para el encapsulamiento.

En consecuencia, se procedió con las pruebas para el encapsulamiento, agregando a la mezcla base la glucosa oxidasa preparada, a los treinta minutos del tiempo de mezclado, pero no permitía realizar el ciclo completo de mezclado sin antes gelificarse, puesto que se agregaba en estado líquido, agregando presencia de moléculas de agua en la mezcla. Se probó preparar la glucosa oxidasa con una concentración diferente a la propuesta en la hoja de datos, agregando más enzima en menos acetato de sodio, pero la solución se saturaba, y por tanto no era homogénea. Por último, se tomó la decisión de agregar la enzima directamente en su estado de presentación (en polvo), debido a que el medio donde sería disuelta, la mezcla base, tenía pH 5 siendo óptimo para el comportamiento correcto de la enzima. De esta manera la mezcla para el encapsulamiento de la enzima quedó como se observa en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Cantidades usadas en la mezcla Sol-gel para la encapsulación de la enzima.

<b>Mezcla</b>	<b>Tiempo</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 ml TEOS</li> <li>• 1 ml Etanol</li> </ul>	20 min
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0.16 ml Ácido Clorhídrico 0.1M</li> </ul>	10 min
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 mg de glucosa oxidasa en polvo</li> </ul>	16 horas

Por otra parte, se prepararon los buffers con los que sería probado el bioprodo, realizando diferentes concentraciones de glucosa. La glucosa está disponible en presentación en polvo en el laboratorio, para facilitar la preparación de diferentes concentraciones, diluyéndola en agua destilada. Para seleccionar el rango se realizó la búsqueda de la zona de interés de medida para la diabetes, encontrando que es desde los 100 mg/dl hasta los 200 mg/dl. Por consiguiente, se prepararon once diferentes concentraciones aumentando la concentración de diez en diez, desde los 100 mg/dl hasta completar los 200 mg/dl. Para no preparar una gran cantidad de solución por cada concentración, y debido a la poca cantidad de muestra necesaria, se preparó 10 ml de cada uno haciendo las equivalencias pertinentes para igualar las concentraciones.

Además, en la mezcla para encapsular la enzima se probaron varias concentraciones, para determinar si al agregar mayor cantidad de enzima mejoraba el desempeño del bioprodo. La discusión sobre este tema se realizará en la discusión de resultados.

Específicamente los materiales utilizados son los siguientes:

- Glucosa oxidasa: Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*. Type X-S, lyophilized powder, 100,000-250,000 units/g solid (without added oxygen). CAS Number 9001-37-0 (Sigma-Aldrich).
- TEOS: Tetraethyl orthosilicate reagent grade, 98%. CAS Number 78-10-4 (Sigma-Aldrich).
- Etanol: Alcohol etílico 98%.
- Ácido Clorhídrico 37%.
- Vaso de precipitado de capacidad 5 ml.
- Plancha (sin temperatura, solo para mezclar)
- Peso de precisión.
- Guantes.
- Tapa bocas.
- Jeringas de capacidad 1 ml y 3 ml.

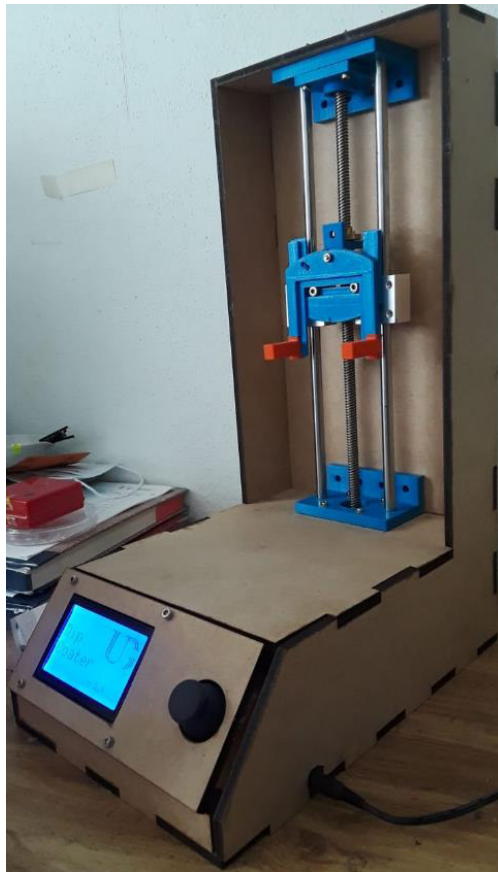
### 4.1.2. Procedimiento Dip-coating

Como ya fue descrito en el capítulo anterior, el procedimiento dip-coating no es más que la realización de un recubrimiento por inmersión. Este proceso es uno de los métodos utilizados para crear capas delgadas a través de la técnica sol-gel, se requiere un sustrato donde será depositada la mezcla que posteriormente con un proceso de secado se gelificará formando una capa delgada sobre la superficie de dicho sustrato, la cual debe ser sólida y uniforme. En este caso nuestro sustrato es la fibra óptica plástica Edmund Optics de 2000  $\mu\text{m}$  de grosor, la cual es cortada previamente en secciones de 2 cm, y en la punta se le retira 0.5 cm aproximadamente de la cubierta protectora, para luego tratar este tramo de fibra descubierto lijándolo suavemente hasta lograr retirar el revestimiento de la fibra como las podemos observar en la Figura 8. El revestimiento es retirado para permitir que al realizar la inmersión el recubrimiento quede sobre el núcleo de la fibra, consiguiendo modificar el índice de refracción y por esta razón influir en los efectos de cambio de absorción de la luz, al tener contacto directo con esta capa.



**Figura 8.** Fibra óptica plástica (bioprodo).

En este sentido, junto con el grupo de optoelectrónica de la DISCIS se fabricó un instrumento (como lo podemos observar en la Figura 9) que realiza el movimiento necesario para lograr dicho procedimiento. Este proceso es un ascenso y descenso, donde se pueda controlar el tiempo de permanencia del sustrato dentro de la mezcla al descender, y sumergir con una velocidad constante y distancias preestablecidas. Como ya lo mencionamos, el sustrato es la punta de la fibra óptica plástica, el recubrimiento debe ser uniforme y delgado, permitiendo encapsular la enzima glucosa oxidasa en la matriz de sol-gel y obtener nuestro bioprodo.



**Figura 9.** Dip-coater, dispositivo utilizado para realizar los recubrimientos (Fabricación propia del grupo de optoelectrónica).

En el caso de este proyecto de tesis, se realizaron varias pruebas para decidir cuántas serían las inmersiones del sustrato en la mezcla. Se probó con una, dos y tres inmersiones, con un tiempo de inmersión de 10 segundos y al ascender fuera de la mezcla 10 segundos de secado antes de volver a sumergirla. Después de realizar el proceso de inmersiones los bioprodos eran llevados a la fase de secado, para asegurar la existencia de la enzima en el recubrimiento el secado se realizó dentro del refrigerador, aproximadamente a 8 °C y durante 2 días. Después del secado fueron observados los bioprodos, los bioprodos con una sola inmersión se veían uniformes y correctamente adheridos, a diferencia de los de dos y tres inmersiones que algunos se veían uniformes y en otros la capa de la cara transversal de la fibra se desprendía fácilmente. Por lo tanto, el proceso de dip-coating seleccionado para este proyecto fue con los siguientes parámetros: una inmersión, 10 segundos inmerso y la mezcla y una velocidad constante, por cuestiones de tiempo no se pudo hacer variaciones sobre la velocidad de inmersión.

A continuación, mencionamos algunos de los bioprodos que fueron fabricados y los que se seleccionaron para ser probados con el procesamiento de imágenes:

Concentración de 1 mg glucosa oxidasa:

1 inmersión (10 seg. up, 10 seg. Down): OP2, OP3, OP4.

2 inmersiones (10 seg. up, 10 seg. Down): OP7, OP8, OP10.

3 inmersiones (10 seg. up, 10 seg. Down): OP11, OP12, OP13.

Concentración de 2 mg glucosa oxidasa:

1 inmersión (10 seg. up, 10 seg. Down): OP14, OP15, OP16.

2 inmersiones (10 seg. up, 10 seg. Down): OP17, OP18, OP19.

3 inmersiones (10 seg. up, 10 seg. Down): OP20, OP21, OP22.

Todos fueron almacenados en el refrigerador para realizarle pruebas con un analizador de espectro óptico después de un periodo de secado de dos días. Se hizo la evaluación de los bioprodos primero con el analizador de espectro óptico para poder observar en tiempo real los cambios, y concluir cuantas inmersiones serian finalmente seleccionadas para el proceso de fabricación. Y se concluyó que era desfavorable sumergir los bioprodos más de una vez, porque la capa sobre la parte transversal de la fibra se desprendía fácilmente. Por la tanto, se seleccionó OP2, OP3, OP14, OP15, OP16 para realizar pruebas de caracterización de los bioprodos con el procesamiento de imágenes, sus datos se muestran en la sección de tratamiento de datos. Se tomó la decisión de hacer un lote más grande de bioprodos, para decidir cuál concentración de glucosa oxidasa era más favorable. Por lo tanto, se fabricaron 15 con una sola inmersión en una mezcla con 1 mg de enzima y 15 con una sola inmersión en una mezcla con 2 mg de enzima, (las mezclas utilizadas para el recubrimiento fueron las mismas, ya que se encontraban aun en estado líquido almacenadas en el refrigerador). Éstos se muestran a continuación:

Concentración de 1 mg glucosa oxidasa:

1 inmersión (3 seg. up, 10 seg. Down): BO1-15.

Concentración de 2 mg glucosa oxidasa:

1 inmersión (10 seg. up, 10 seg. Down): BO16-30.

Después del periodo de secado de dos días dentro del refrigerador, se observó que los bioprodos realizados con la mezcla de 1 mg mostraron un recubrimiento homogéneo y completamente adherido, a diferencia de los realizados con la mezcla de 2 mg que en su mayoría mostraban desprendimiento del recubrimiento. Por lo tanto, se decidió seleccionar la mezcla de 1 mg de concentración que es la descrita al comienzo de la bitácora (R2A-1). Y se le realizaron las pruebas de la caracterización a través del procesamiento de imágenes a los 15 optrodos realizados con esta mezcla (BO1-15).

## **4.2. Arreglo Experimental**

Después de tener listos los bioprodos, se procedió a hacerles las pruebas pertinentes para validar los resultados, tomando en cuenta dos puntos. En primer lugar, preparar con precaución los buffers con diferentes concentraciones de glucosa, que fueron previamente preparados teniendo especial cuidado al pesar la cantidad de glucosa en polvo, que era diluida en el agua destilada. En segundo lugar, hacer las pruebas de la variación de intensidad, en el espectro transmitido a través del bioprodo, con un instrumento comercial, en este caso un analizador de espectros ópticos. De manera que exista un método comprobable de las variaciones que se observan con la captura y procesamiento de imágenes para el mismo objetivo: obtener una curva característica que nos permita obtener las concentraciones de glucosa al evaluar las variaciones de intensidad en un determinado espectro. Por lo tanto, se usaron dos arreglos experimentales.

El arreglo experimental para las medidas con el analizador de espectros ópticos consta de: fuente de luz, en este caso el led flash de un smartphone; el bioprodo, fijado en frente de la fuente de luz, que gracias al diámetro de grosor de la fibra óptica plástica (2000 um) no fue necesario un acoplador entre la fuente y la fibra; y por último el analizador conectado a la computadora con el software instalado para poder hacer la captura de los datos. Una ventaja de comenzar con este arreglo fue poder observar los cambios en tiempo real, para de esta manera decidir cuáles eran los factores más positivos para la realización de los bioprodos, sin tener que realizar el tratamiento de las imágenes.



Por otra parte, en el arreglo experimental usado y propuesto para la caracterización que será realizada en esta tesis, el transductor es la cámara de un smartphone. Como se observa en la Figura 10 el arreglo consta de la misma fuente que el anterior, y por su puesto el bioprodo fijado frente a la fuente, pero ahora la salida de luz es dirigida hacia una rejilla de difracción, de forma que la fuente de luz de amplio espectro sea difractada y por tanto descompuesta en colores para ser capturada con la cámara y posteriormente procesada a través de Matlab. Es muy importante mantener las mismas posiciones de todos los elementos del arreglo para asegurar igualdad cuando se realice el análisis de resultados, y a continuación se realiza la descripción de la captura de imágenes, que factores se deben tomar en cuenta y como fue el procedimiento aplicado.

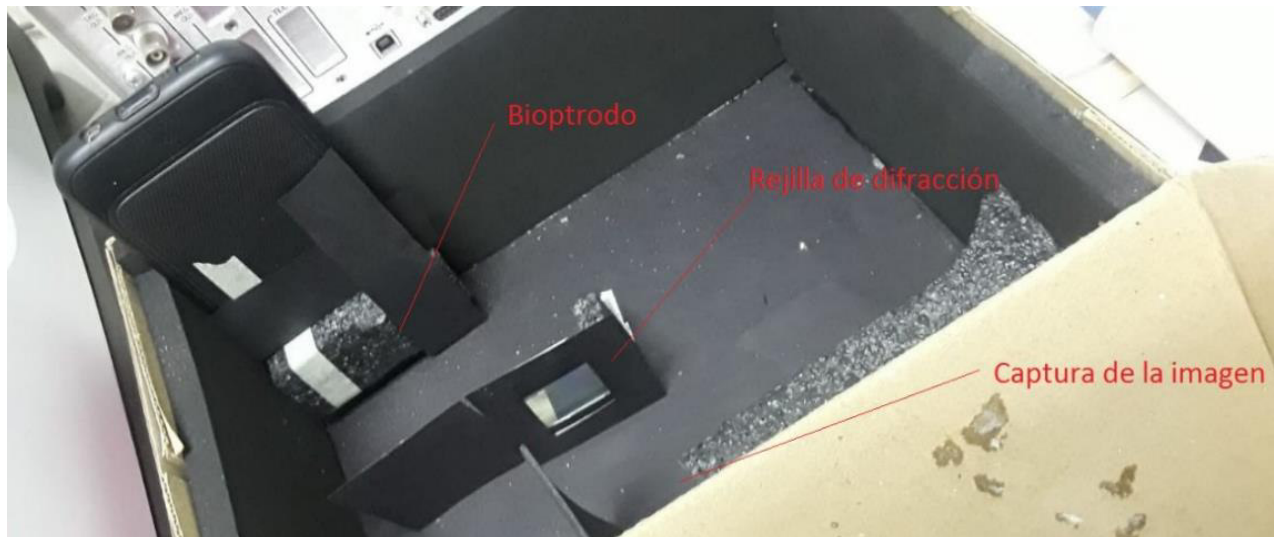
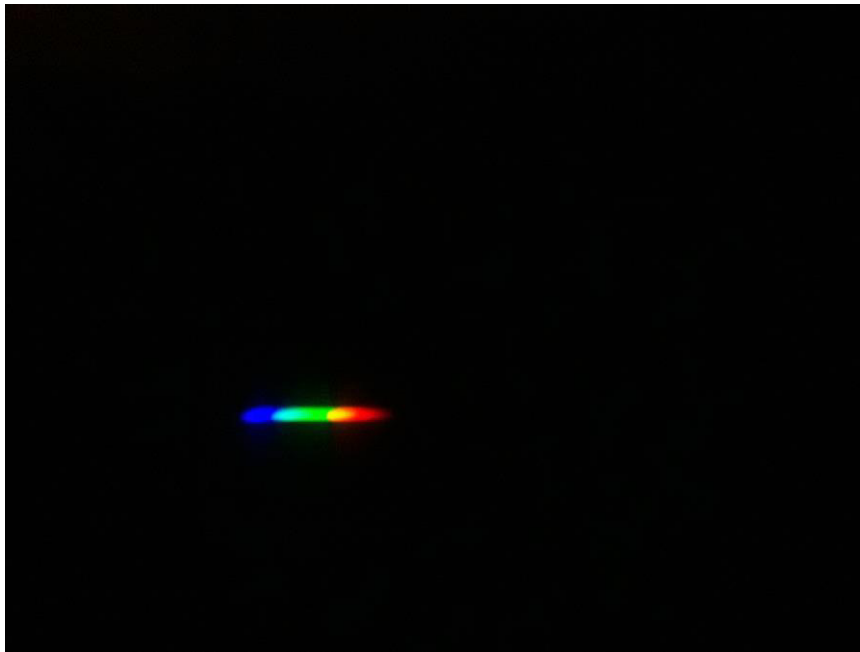


Figura 10. Arreglo Experimental.

### 4.2.1. Captura de Imágenes

Para la captura de las imágenes se prueba cada bioprodo por separado, en este punto la posición de la fuente de luz y del bioprodo tiene que ser la misma cada vez que se realiza el experimento, para ello la posición se asegura al cerrar la caja donde se realizó el arreglo experimental que se muestra en la figura anterior. Debido a que la tapa de la caja tiene un agujero cuadrado que asegura la posición de la fuente y además nos permite ir agregando la muestra, que contiene el analito, sobre la punta del bioprodo. La distancia entre el bioprodo y la rejilla es de 5 cm y entre la rejilla y la captura de la imagen son 7 cm, esto por facilidad de posicionar todos los elementos del arreglo experimental.

La cantidad de muestra que se coloca en el bioprodo es una gota (0,5 uL) medida con una pipeta mecánica, para cada bioprodo se prueban los seis buffers anteriormente preparados. Para cada concentración de glucosa (buffer) se procede a capturar las imágenes con la opción disparo rápido (30 imágenes continuas, se muestra una imagen como ejemplo en la Figura 11) del smartphone modelo Samsung J7 prime que son almacenadas y posteriormente organizadas por carpetas, según la concentración y según el bioprodo. De esta manera, se obtienen 30 imágenes por concentración, son seis concentraciones distintas, y estas seis carpetas se guardan en otra carpeta con el nombre identificador de cada bioprodo.



**Figura 11.** Ejemplo de una imagen capturada del experimento.

Después de obtener las imágenes, podemos observar que con simple visualización no es posible notar las diferencias ni obtener una característica que nos permita tomar un patrón de referencia para graficar la curva característica del biosensor. Además, se puede observar que existe demasiada información (toda la zona negra) que no es necesaria, y por esta razón el tiempo de computo al analizar esta imagen sería más grande que si recortamos la imagen a nuestra zona de interés. Por lo tanto, es necesario que las imágenes se procesen digitalmente, para determinar la variación en la intensidad de luz y concluir su dependencia a cada concentración de glucosa, permitiendo graficar la curva característica del biosensor de glucosa.

### 4.3. Procesamiento Digital de las imágenes

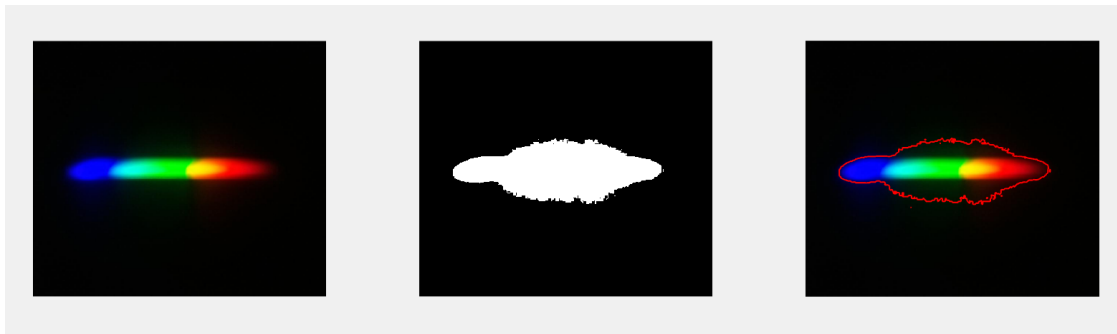
Para el procesamiento de las imágenes, como ya lo mencionamos anteriormente, al utilizar la cámara del smartphone en la opción de disparo continuo, se hizo la toma de 30 imágenes seguidas, lo cual toma un tiempo de 3 segundos. Las capturas de las imágenes se realizaron con cada bioprodo que sería probado, y variando la concentración, con cada concentración. Estas imágenes son guardadas y ordenadas en carpetas con su debida identificación según el bioprodo utilizado y la cantidad de muestra utilizada, obteniendo un conjunto de muestras a ser tratadas. Después de tener las imágenes capturadas y organizadas se crea un programa en Matlab, que nos permita recortar la zona de interés de las imágenes, como se muestra en la Figura 12, para minimizar el tiempo de cómputo. Puesto que se encuentran todas en la misma región de la imagen, se define la posición y son todas cortadas del mismo tamaño y guardadas con la misma organización, separadas por carpetas según la identificación del bioprodo, y según cada bioprodo separadas por su concentración. Además, se reconstruye a partir de cada lote de treinta imágenes una sola imagen promedio.



**Figura 12.** Ejemplo de una imagen recortada.

Posteriormente, las imágenes recortadas y organizadas son procesadas. Se realizaron dos procesamientos, primero la conversión a escala de grises, con las siete fórmulas, de la imagen promedio anteriormente reconstruida a partir de las 30 imágenes a color, obteniendo 7 imágenes promedio en escala de grises, y a partir de estas hallar el promedio de cada una en la sección de interés para cada concentración y graficar 7 curvas características, y segundo se convierten las treinta imágenes a escala de grises con las mismas siete fórmulas y se haya el promedio de la zona de color de cada imagen para cada fórmula y luego obtener el promedio de los 30 promedios hallados, obteniendo un valor dependiente de cada concentración y graficar 7 curvas características.

Para ambos métodos, el promedio de la intensidad o media en nivel de escala de grises de la imagen se calcula solo en el segmento donde se encuentran los colores difractados por la rejilla a través de un procesamiento con el fin de eliminar ruido; el procesamiento consiste en segmentar la imagen por umbralización cuya intensidad de píxel es mayor a 10 (teniendo en cuenta que la intensidad de los píxeles en una imagen digital cuando tienden a cero representan el color negro y cuando tienden a 255 representan el color blanco), para obtener una imagen binaria que representa la región a analizar. Finalmente, se verifica que el contorno de la imagen binaria corresponda a la región de interés en la imagen captada como se muestra en la Figura 13.



**Figura 13.** Ejemplo de la segmentación por umbralización de la imagen recortada.

A partir de esta segmentación, se crea en Matlab un arreglo en una tabla de datos para cada concentración de cada bioprodo y para cada método. Primero una tabla de siete columnas con una fila para la imagen promedio y segundo una tabla con treinta filas para el segundo método. En ambos métodos se realiza un tratamiento de los datos para hallar las curvas características.

### 4.3.1. Tratamiento de los Datos

Cuando ya tenemos las imágenes capturadas y procesadas, se obtienen los datos del bioprodo que podrán ser tratados para lograr graficar la curva característica del biosensor de glucosa. Cada bioprodo tendrá un arreglo de datos de treinta y un filas y siete columnas para cada concentración, es decir cada bioprodo tendrá seis arreglos de datos, estos seis arreglos son pasados a Excel, donde serán tratados para su posterior análisis. A continuación, se explican los pasos realizados para el tratamiento de los datos.

En el primer método se grafica el primer punto de la curva de cada fórmula y se continúa hasta completar todas las concentraciones para la caracterización de cada bioprodo y con cada fórmula, como ya fue mencionado se obtienen siete curvas características independiente por bioprodo.

En el segundo método el promedio de los treinta datos de cada columna obteniendo el primer punto de cada fórmula y determinada concentración y sucesivamente con las demás concentraciones hasta completar el rango propuesto, obteniendo de esta manera al igual que el método anterior siete curvas características que representan las siete fórmulas utilizadas igualmente por bioprodo.

Por último, se analiza la linealidad de cada curva y se halla su ecuación característica, y de esta forma se puede tomar la decisión de cual método y cual fórmula otorga los resultados más idóneos para ser usados en un biosensor, siendo deseable un porcentaje de tendencia a la linealidad mayor del 80%.

Cabe destacar, que ambos métodos también fueron aplicados repitiendo toda la metodología y con las siete fórmulas, con la excepción de la fase de preparación de bioprodos puesto que se hicieron las pruebas en un bioprodo sin dopaje. Con el fin de demostrar que al no encontrarse encapsulada la enzima en la punta de la fibra no se observan cambios en el promedio del nivel de la intensidad. Estos resultados son mostrados en la siguiente sección junto con los resultados hallados de uno de los bioprodos dopados y además un breve análisis de las aproximaciones lineales de los demás bioprodos probados.

# Capítulo 5

## Resultados

En consecuencia, con el cumplimiento de los objetivos, y como ya se expuso anteriormente, el trabajo de tesis consta de tres etapas. En primer lugar, la fabricación de bioprodos a través de la técnica sol-gel, para esta etapa se mostrarán y especificará las características de los bioprodos fabricados, y la justificación de la selección final del bioprodo usado en el biosensor. En segundo lugar, el arreglo experimental utilizado para la implementación del biosensor, seleccionado y desarrollado en el capítulo de Metodología e Implementación. Y en último lugar, el procesamiento de las imágenes a través de Matlab, obtenidas durante la caracterización del biosensor. Para finalmente obtener la curva característica y poder determinar a través de los resultados obtenidos la viabilidad del biosensor de glucosa desarrollado con fibra óptica plástica.

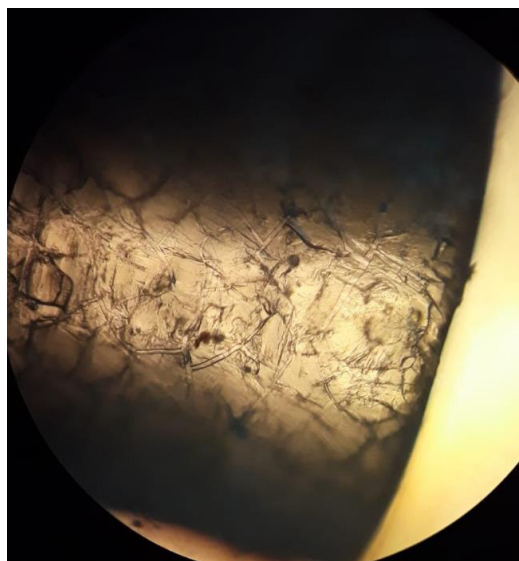
Cabe destacar que, durante la fabricación de los bioprodos, la metodología utilizada fue ir probando distintas combinaciones de componentes químicos, se inicia a partir de un valor y progresivamente se van ajustando los parámetros, manteniendo las sustancias precursoras en la técnica sol-gel, y variando algunas concentraciones, el resultado deseado eran bioprodos lo más consistentes y prolijos posibles, pero no solo esto, también debían lograr encapsular correctamente la enzima glucosa oxidasa.

Finalmente, para verificar el funcionamiento de los bioprodos fueron probados uno por uno en el arreglo experimental que se seleccionó para el biosensor. Y, las imágenes obtenidas con la cámara del smartphone en el arreglo experimental son procesadas, el procesamiento se realizó en el programa Matlab, con la conversión de las imágenes en color a escala de grises con distintas fórmulas, hasta que el promedio de la secuencia en tomas progresivas con un mismo bioprodo y aumentando la concentración de glucosa, genera una gráfica con un comportamiento polinómico.

A continuación, podemos observar en las Figuras 14 y 15 el recubrimiento obtenido en uno de los bioprotochos se observa que la capa es traslúcida y tiene unas grietas, las cuales representan los granos de la matriz sol-gel, y se encuentra completamente adherida a la superficie de la fibra óptica plástica. Las fracturas son debido a la contracción del Sol-gel y a la formación propia de la estructura de sílice, como se mencionó en el Capítulo 3 y se observa en la Figura 4 de esta investigación, a medida que se va gelificando, para su aplicación en el biosensor el proceso de gelificación ya había terminado, se solidificó por completo la capa sobre la fibra.



**Figura 14.** Vista frontal del bioprotocho observado en el microscopio.



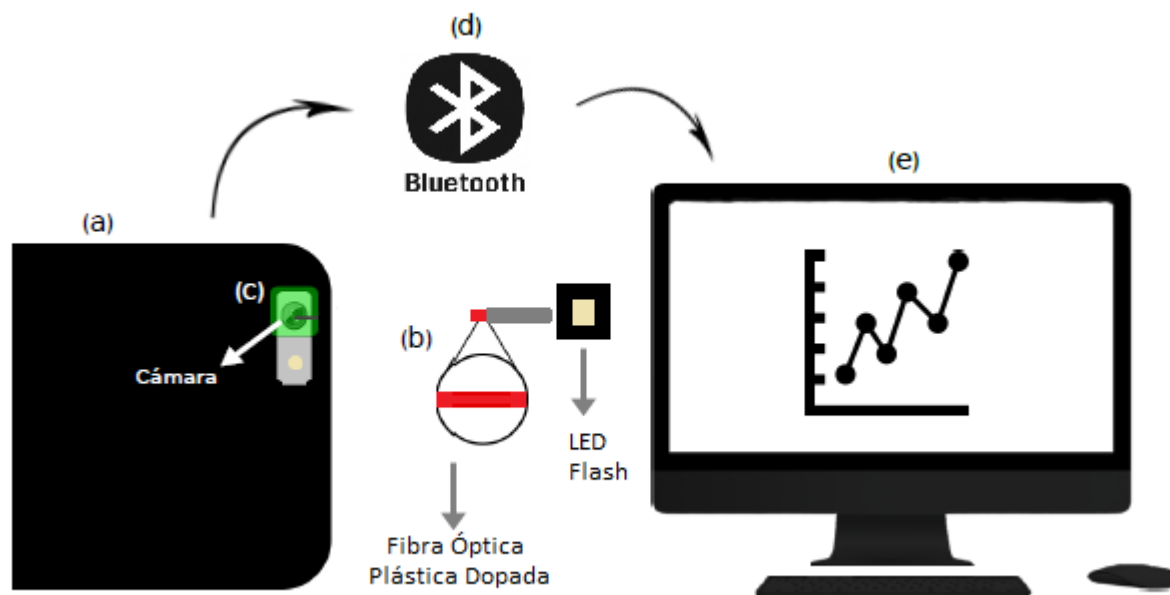
**Figura 15.** Vista lateral del bioprotocho observado en el microscopio.

A partir de la experimentación proponemos el siguiente método para futuras investigaciones, con respecto al proceso sol-gel en la encapsulación de enzimas:

1. La enzima debe permanecer mayormente en temperatura menor a 0°C, por lo cual fue necesario tenerla la mayor cantidad de tiempo posible almacenada en el refrigerador.
2. El medio donde se aplique la enzima debe ser de un pH en el rango de 4-7, su actividad óptima es en pH 5.5, por lo cual fue necesario realizar experimentos para conseguir la dilución correcta del ácido clorhídrico que asegurara un medio con pH cercano a 5.5.
3. Se hizo una serie de experimentos variando la cantidad de agua en la mezcla Sol-gel, probando la adherencia de la mezcla, para conseguir un recubrimiento delgado y homogéneo. Seleccionando finalmente las cantidades mostradas en el capítulo de metodología.
4. Se probó el tiempo de mezclado para lograr completar las reacciones necesarias para la activación de la mezcla y, por consiguiente, su correcta adherencia. Después de la experimentación se seleccionaron los tiempos mostrados en la sección de metodología.
5. La mezcla para ser utilizada en el recubrimiento de la fibra óptica plástica debe ser almacenada en un frasco sellado dentro del refrigerador, la duración de la mezcla sin perder adherencia es de aproximadamente de un mes, prácticamente hasta su gelificación.
6. Finalmente, la concentración, que proporcionó los mejores resultados en el bioprodo, el cual se realizó con 1 mg de glucosa oxidasa, permitiendo una solución homogénea al ser mezclada con los demás componentes.

Siguiendo con la continuidad de los objetivos, en la Figura 16 observamos el arreglo utilizado para la implementación del bioprodo en su aplicación de biosensor de glucosa. El cual nos permitió realizar la caracterización en este proyecto, para varios de los bioprodos fabricados.





**Figura 16.** Arreglo experimental propuesto: (a) Smartphone. (b) Biptrodo. (c) Rejilla de difracción. (d) Transmisión de datos por Wi-Fi. (e) Análisis de imágenes en MatLab.

Después de obtener las imágenes para la caracterización del biosensor, son procesadas en Matlab, donde se recortan, se reconstruye una imagen promedio a partir de las 30 imágenes obtenidas por cada concentración de cada bioprodo y nuevamente se organizan en carpetas identificadas por bioprodo y dentro en carpetas separadas por dicha concentración. Luego son convertidas a escala de grises con siete fórmulas diferentes, para aplicar dos métodos:

**Primer Método:** se halla la media de nivel de gris de la imagen captada a partir de la imagen promedio reconstruida.

**Segundo Método:** la media de nivel de gris de las imágenes captadas, a partir de las 30 imágenes convertidas a escala de grises, de las cuales se halla un solo valor con el promedio de los 30 datos.

Por lo tanto, se muestran las gráficas de las curvas características, separadas por fórmula y por método. A continuación, se muestran de manera ilustrativa las gráficas del bioprodo OP3 y después, dos tablas con el valor de aproximación lineal de los demás bioprodos fabricados y con los datos procesados a través de los métodos mencionados.

Pero primero se muestran las gráficas de las pruebas hechas al bioproto sin dopaje, igualmente aplicando las mismas concentraciones, el mismo arreglo experimental para la captura de las imágenes, y el tratamiento de datos con ambos métodos y las siete fórmulas para cada uno.

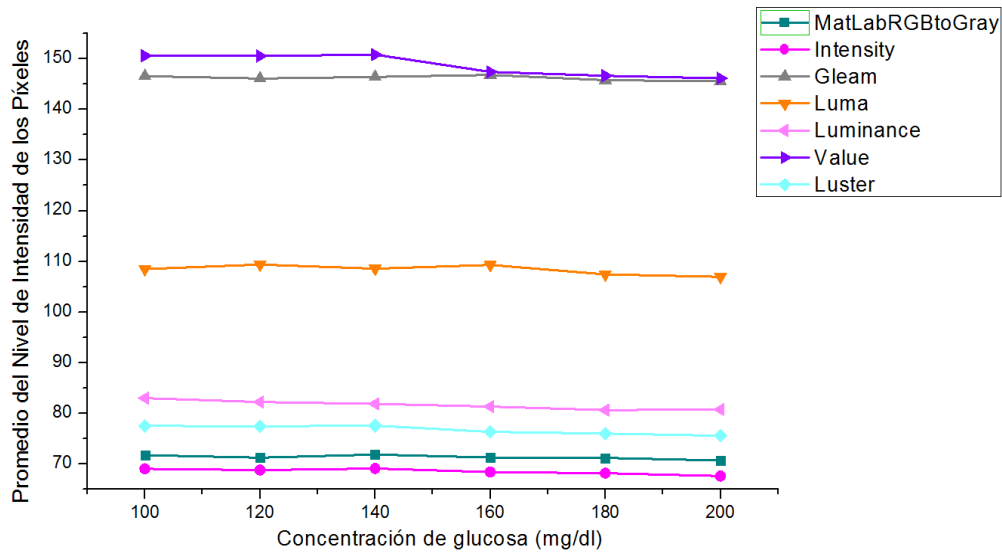


Figura 17. Curvas Características con el Primer Método con las siete fórmulas en un bioproto sin dopaje.

En las Figuras 17 y 18 podemos observar las curvas halladas en un bioproto sin encapsulación de la enzima, solo en la fórmula 'Gleam' del segundo método se observan cambios considerables, pero en los demás casos los cambios no superan ni la unidad, esto debido a la falta de la reacción selectiva de la enzima glucosa oxidasa y la glucosa.

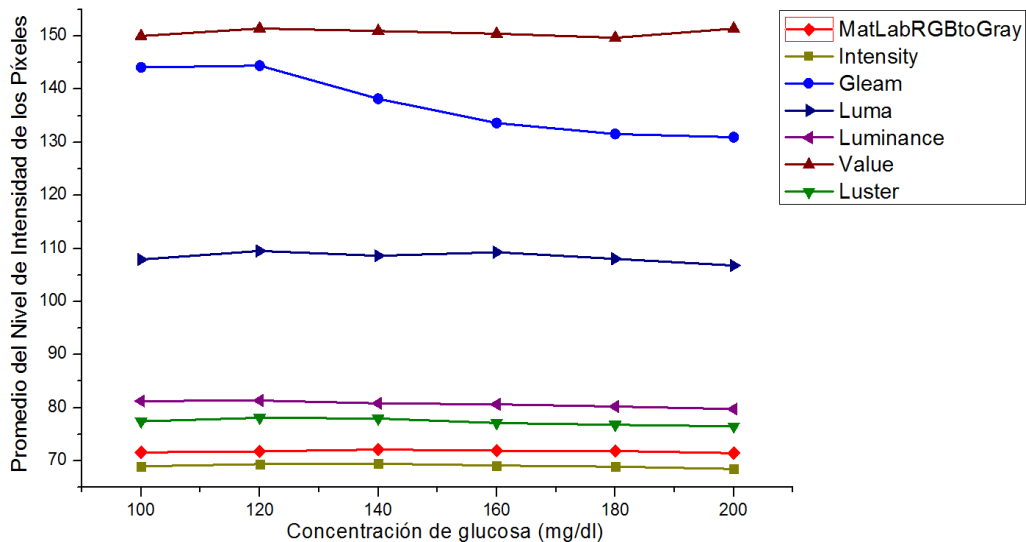
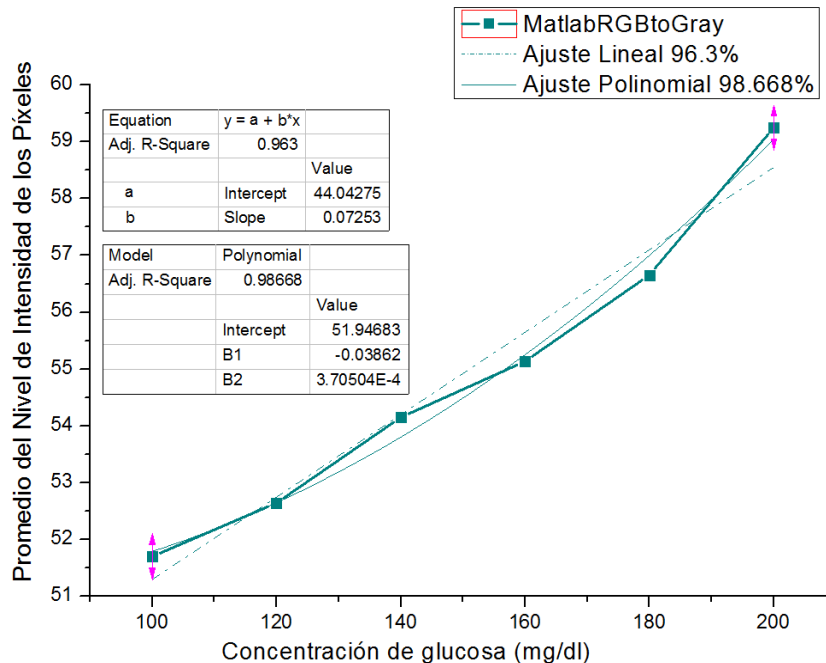


Figura 18. Curvas Características con el Segundo Método con las siete fórmulas en un bioproto sin dopaje.

Por otro lado, las gráficas presentadas a continuación, pertenecen a las curvas características halladas para uno de los bioprodos fabricados, específicamente el OP3. Se muestran 7 curvas, una para cada fórmula de conversión a escala de grises, en cada gráfica se muestran dos tablas, una con la información del ajuste lineal y otra para el ajuste polinomial. Todas las gráficas en el eje 'X' representan la concentración de glucosa en mg/dl y su rango es de 90-200 mg/dl, pero en el eje 'Y' que representa el promedio del nivel de intensidad de los pixeles su rango varía dependiendo de la fórmula aplicada.

### 5.1. Gráficas del Primer Método:

En la Figura 19 observamos la curva característica hallada a través del primer método con la fórmula `rgb2gray` que por convención es la fórmula usada para la conversión a escala de grises para Matlab, cuyo porcentaje de linealidad es 96.3% y 98.668% de ajuste polinomial, representando un resultado muy bueno para representar el comportamiento de un sensor, en este caso el del biosensor de glucosa.



**Figura 19.** Curva Característica con el Primer Método con la fórmula 'MatlabRGB2Gray' del bioprodo OP3.

En la Figura 20 observamos la curva característica hallada a través del primer método con la fórmula 'Intensity', cuyo porcentaje de linealidad es 96.998% y 98.965% de ajuste polinomial, lo cual también es muy bueno.

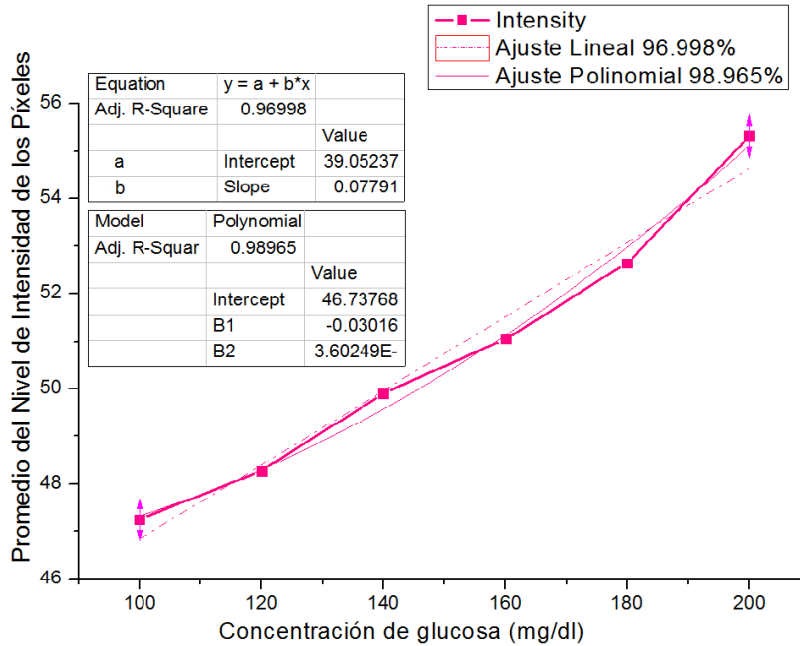


Figura 20. Curva Característica con el Primer Método con la fórmula 'Intensity' del bioprodo OP3.

En la Figura 21 observamos la curva característica hallada a través del primer método con la fórmula 'Gleam', cuyo porcentaje de linealidad es -5.737% y 60.454% de ajuste polinomial, ninguno es favorable y podemos ver como al tener una forma curva, hay valores de intensidad que coinciden con valores diferentes de concentración. Pero podemos observar que el comportamiento desde 100 mg/dl a 160 mg/dl es siempre ascendente y puede tener una linealidad mayor a 80% en mencionado rango, pero reduciría el rango de uso del biosensor.

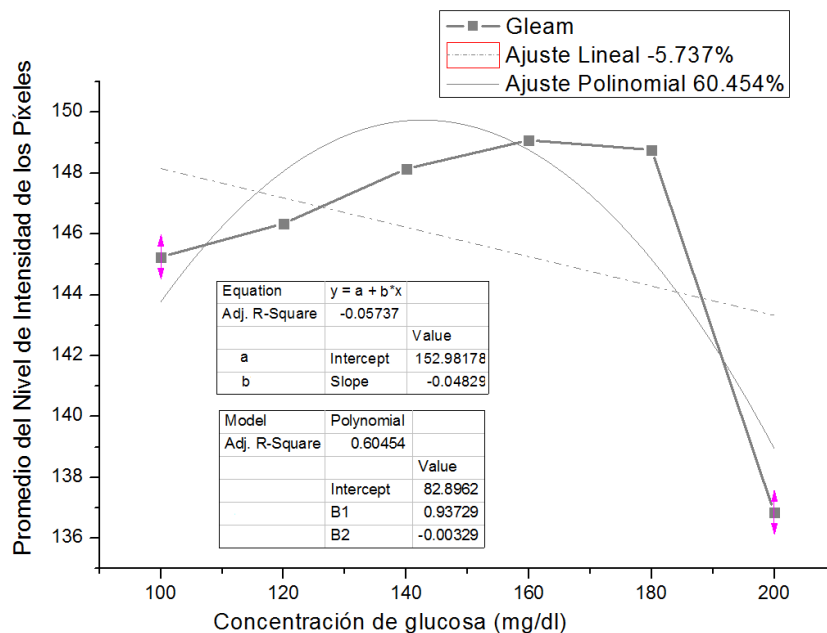


Figura 21. Curva Característica con el Primer Método con la fórmula 'Gleam' del bioprodo OP3.

En la Figura 22 observamos la curva característica hallada a través del primer método con la fórmula ‘Luma’, cuyo porcentaje de linealidad es -9.084% y 54.694% de ajuste polinomial, y por su comportamiento con altos y bajos no podría ser la curva característica de un biosensor.

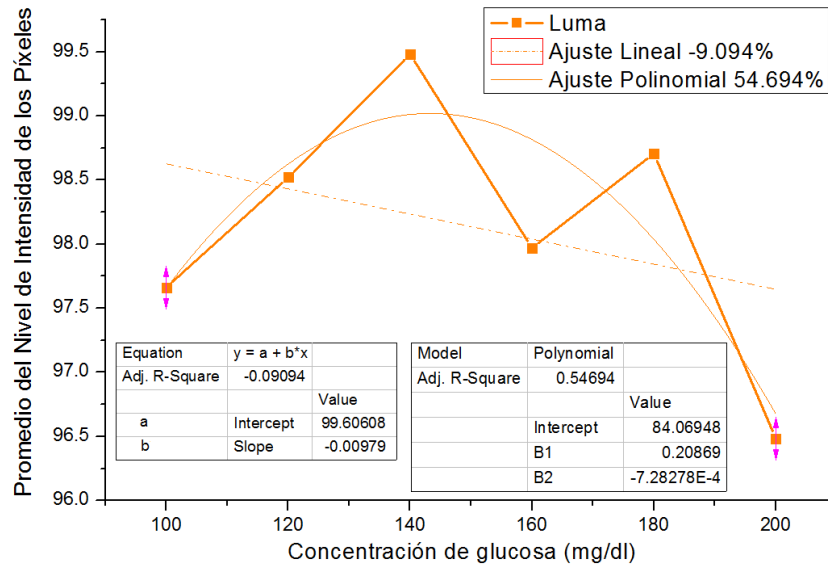


Figura 22. Curva Característica con el Primer Método con la fórmula ‘Luma’ del bioprodo OP3.

En la Figura 23 observamos la curva característica hallada a través del primer método con la fórmula ‘Luminance’, cuyo porcentaje de linealidad es 97.178% y 97.958% de ajuste polinomial, representando un comportamiento bastante deseable para el biosensor.

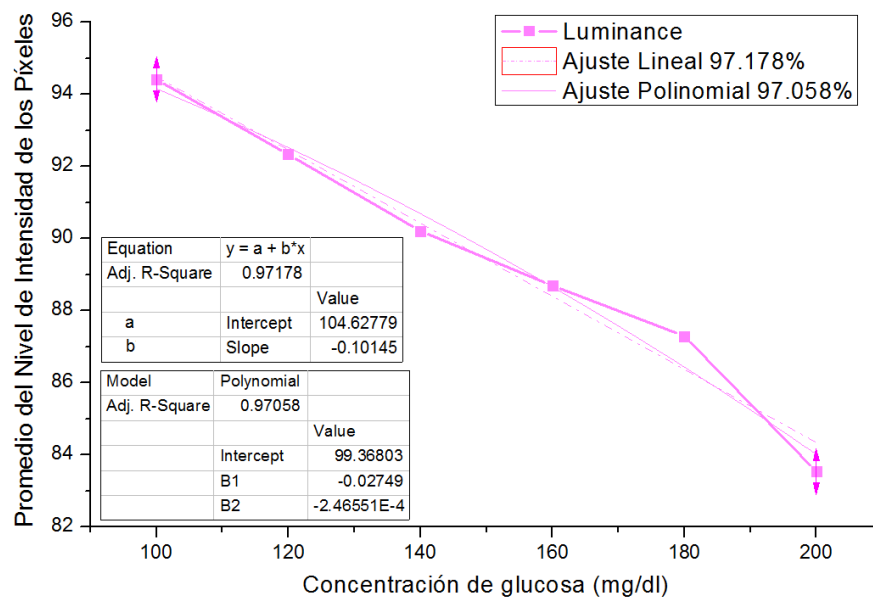
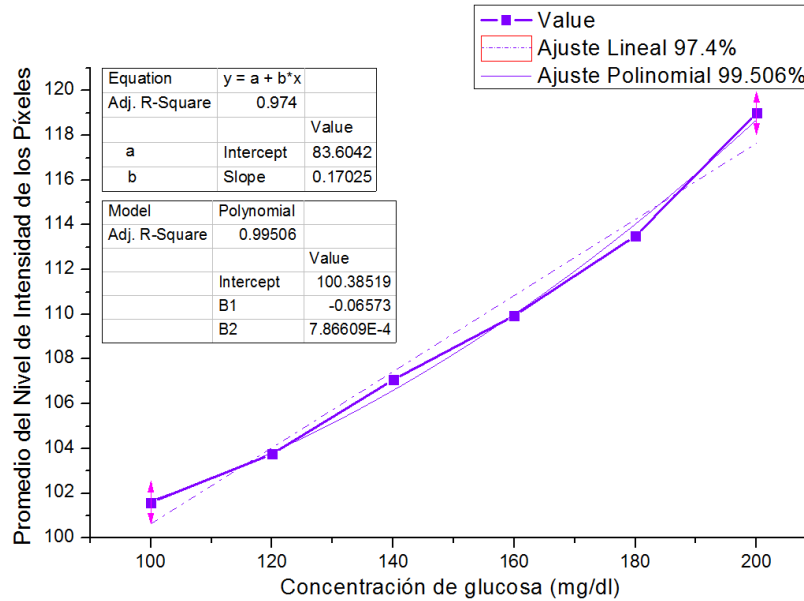


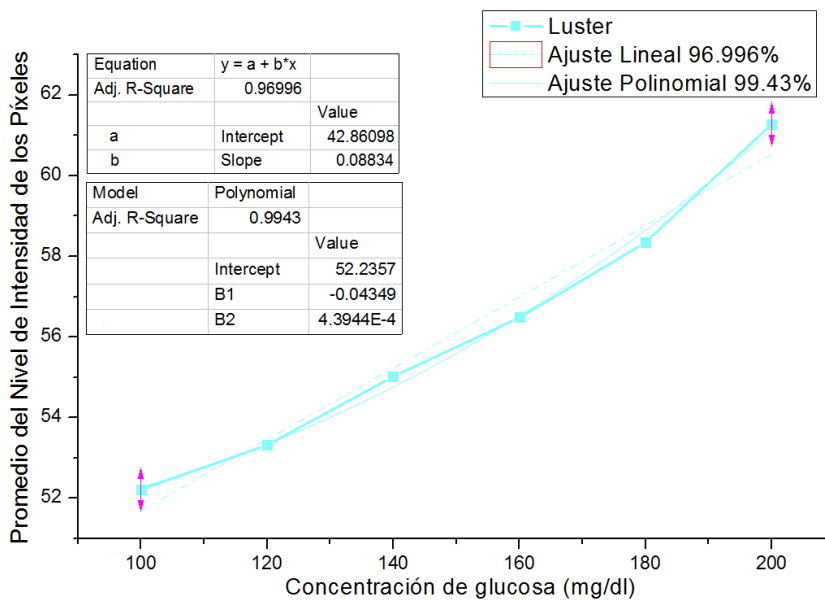
Figura 23. Curva Característica con el Primer Método con la fórmula ‘Luminance’ del bioprodo OP3.

En la Figura 24 observamos la curva característica hallada a través del primer método con la fórmula 'Value', cuyo porcentaje de linealidad es 97.4% y 99.506% de ajuste polinomial, y es la gráfica que proporcionó los mejores resultados para este método y para el bioprodo OP3.



**Figura 24.** Curva Característica con el Primer Método con la fórmula 'Value' del bioprodo OP3.

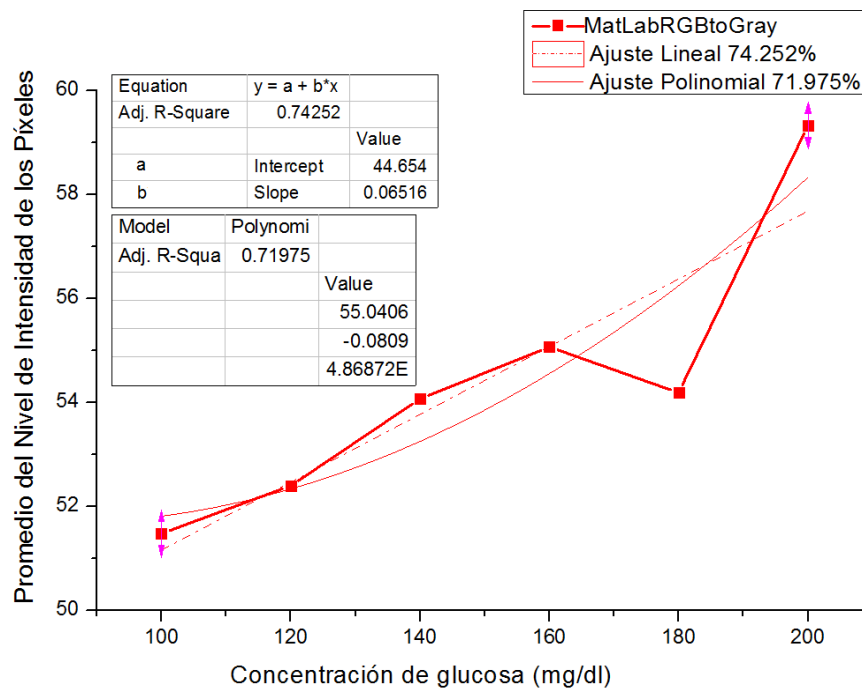
En la figura 25 observamos la curva característica hallada a través del primer método con la fórmula 'Luster', cuyo porcentaje de linealidad es 96.996% y 99.43% de ajuste polinomial, y ambos pueden representar correctamente el comportamiento del biosensor.



**Figura 25.** Curva Característica con el Primer Método con la fórmula 'Luster' del bioprodo OP3.

**5.2. Gráficas del Segundo Método:**

En la Figura 26 observamos la curva característica hallada a través del segundo método con la fórmula rgb2gray que como ya se mencionó, es la fórmula usada para la conversión a escala de grises para Matlab; el porcentaje de linealidad es 74.252%, y el ajuste polinomial 71.975% representando un resultado no deseable para representar el comportamiento de un sensor, pero entre el rango de 100-160 mg/dl podemos observar una curva muy cercana al comportamiento lineal, reduciendo nuestro rango, pero mejorando el comportamiento.



**Figura 26.** Curva Característica con el Segundo Método con la fórmula 'Matlab2Gray' del biotrodo OP3.

En la Figura 27 observamos la curva característica hallada a través del segundo método con la fórmula 'Intensity', cuyo porcentaje de linealidad es 78.509%, y puede representar correctamente el comportamiento del biosensor. También podemos observar que el valor de concentración igual a 180 mg/dl presenta un cambio brusco en comparación a los demás puntos de la gráfica. Aunque esto sucede en gran parte de los casos, tanto en el otro método y fórmulas usadas, como en los otros biotrodos analizados, no podemos concluir nada en concreto porque a la concentración de 200 mg/dl, este valor vuelve a aumentar, pareciendo seguir el comportamiento del resto de la curva.

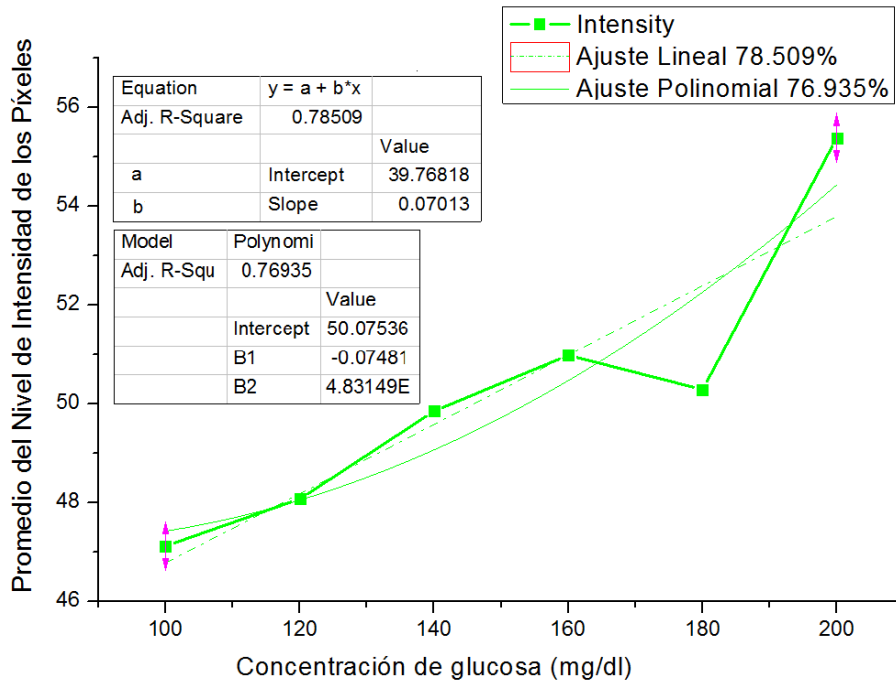


Figura 27. Curva Característica con el Segundo Método con la fórmula 'Intensity' del bioprodo OP3.

En la Figura 28 observamos la curva característica hallada a través del segundo método con la fórmula 'Gleam', cuyo porcentaje de linealidad es 5.892%, y para el ajuste polinomial 59.448% que, aunque es un mejor ajuste, ninguno puede representar correctamente el comportamiento del biosensor, debido a los cambios ascendentes y descendentes en la curva y intercepciones de valores en el eje vertical.

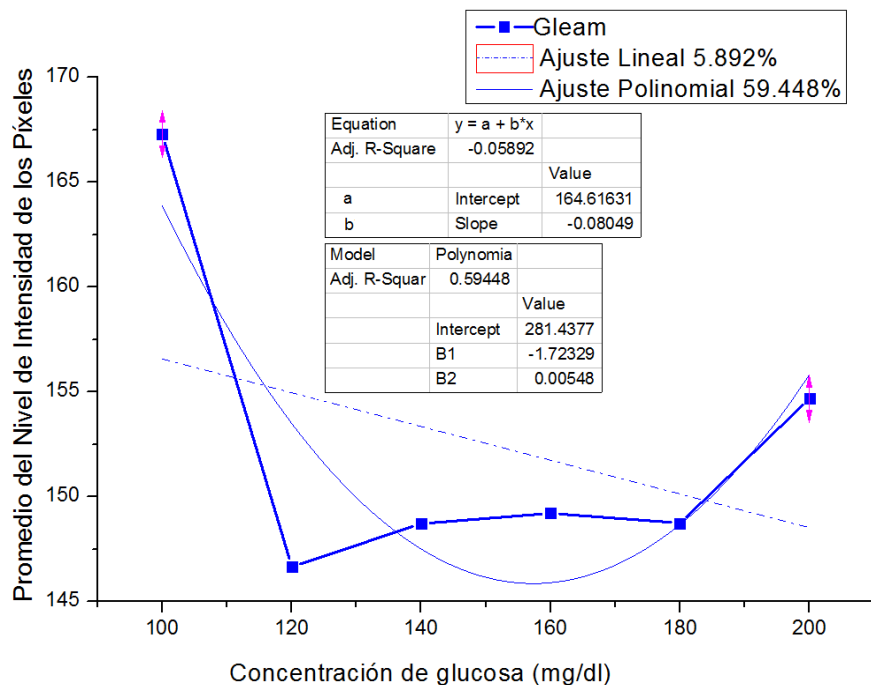
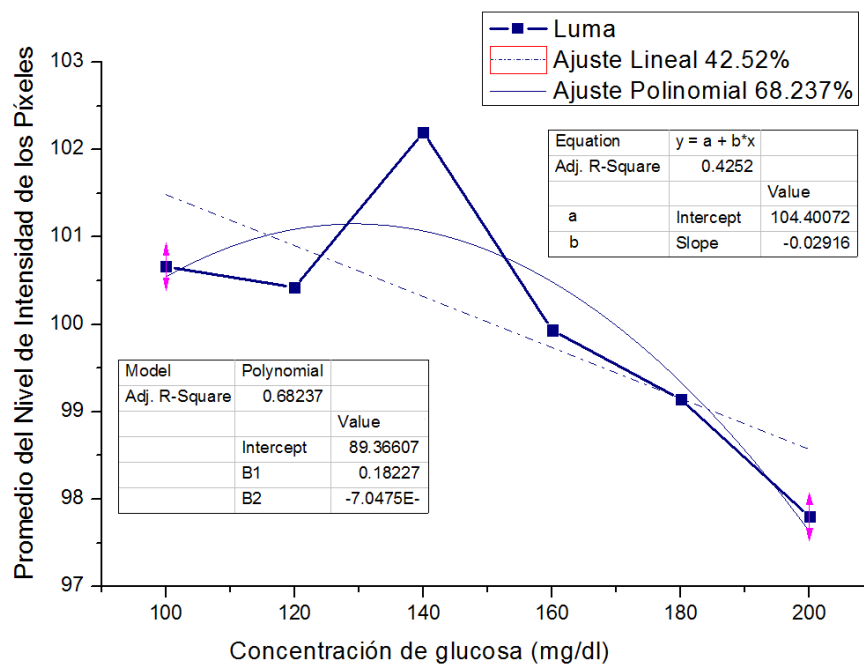


Figura 28. Curva Característica con el Segundo Método con la formula 'Gleam' del bioprodo OP3.



En la Figura 29 observamos la curva característica hallada a través del segundo método con la fórmula ‘Luma’, cuyo porcentaje de linealidad es 42.52%, y ajuste polinomial de 68.237% y aunque sea una mayor aproximación lineal, en la gráfica podemos ver que no es suficiente para representar un comportamiento apropiado que nos permita determinar valores intermedios de la concentración de glucosa, el principal problema es el valor del promedio de nivel de Intensidad en la concentración de 120 mg/dl, cuya variación es muy grande.



**Figura 29.** Curva Característica con el Segundo Método con la fórmula ‘Luma’ del bioprodo OP3.

En la Figura 30 observamos la curva característica hallada a través del segundo método con la fórmula ‘Luminance’, cuyo porcentaje de ajuste lineal es 97.847% y 98.165% de ajuste polinomial, y es la fórmula que presentó los mejores resultados. En este caso el mejor ajuste es del cuadrático, pero ambos valores representan un ajuste bastante bueno para representar el comportamiento del biosensor. En la siguiente sección se muestra una tabla con las aproximaciones lineales de todos los bioprodo evaluados, haciendo una comparativa de las fórmulas en cada método, para concluir si ‘Luminance’ representa la mejor curva característica para los demás bioprodo, y cuál de los dos métodos es el más favorable para realizar el procesamiento.

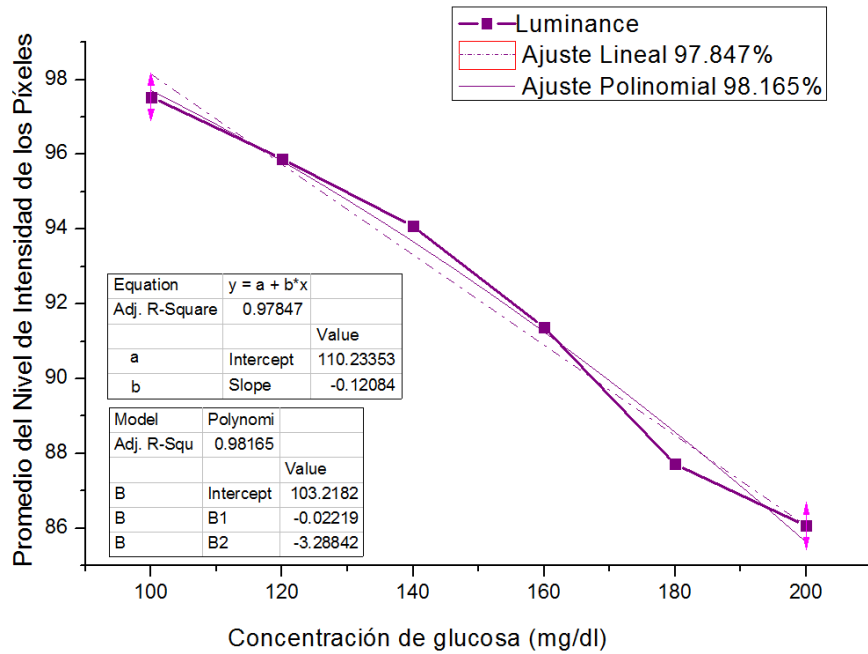


Figura 30. Curva Característica con el Segundo Método con la formula 'Luminance' del bioprodo OP3.

En la Figura 31 observamos la curva característica hallada a través del segundo método con la fórmula 'Value', cuyo porcentaje de linealidad es 78.506%, y 77.091% para el ajuste polinomial cuyo resultado no es del todo apropiado para el comportamiento de un sensor.

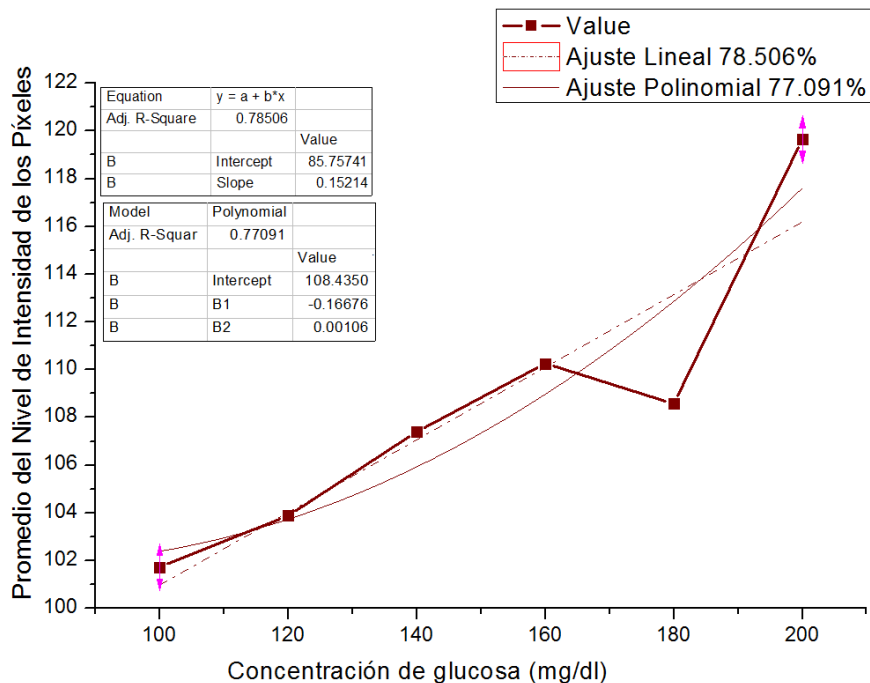


Figura 31. Curva Característica con el Segundo Método con la formula 'Value' del bioprodo OP3.

En la Figura 32 observamos la curva característica hallada a través del segundo método con la fórmula ‘Luster’, cuyo porcentaje de linealidad es 78.633% y 77.918%, cuyo resultado no es apropiado para el comportamiento de un sensor. Pero tanto en el caso de ‘Value’ y ‘Luster’ podemos observar que, en un rango reducido, específicamente de 100-160 mg/dl mejor considerablemente la aproximación lineal de la curva.

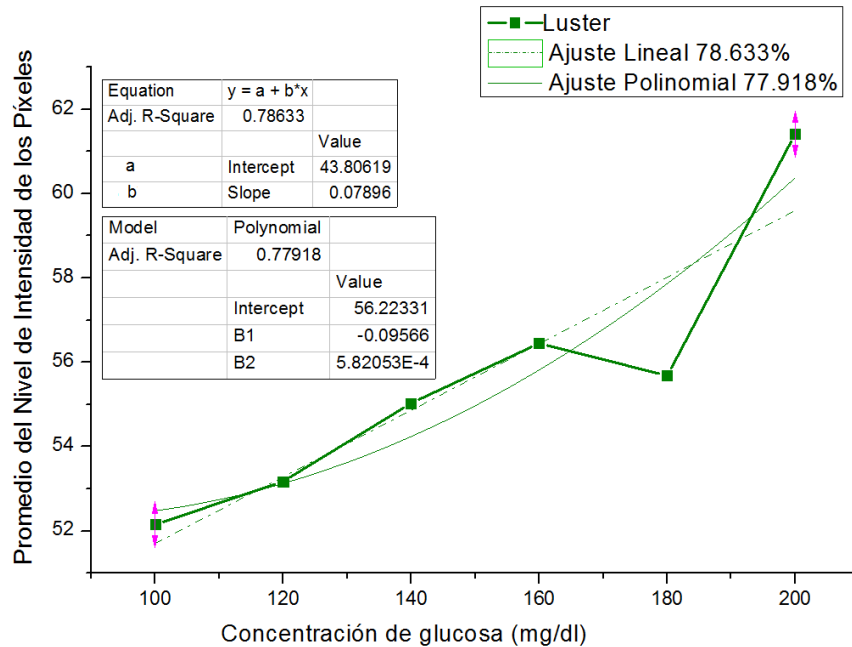


Figura 32. Curva Característica con el Segundo Método con la formula ‘Luster’ del bioprodo OP3.

### 5.3. Análisis de la Aproximación Lineal de los Bioprodo tratados:

A continuación, se reúnen en dos tablas los valores de aproximación lineal calculados para los bioprodo tratados, por los dos métodos de procesamiento de imágenes y con las siete fórmulas de conversión a escala de grises. Los bioprodo seleccionados OP2, OP3, OP14-16, BO1-15, fueron caracterizados, capturando imágenes de mediciones realizadas, su procesamiento y el respectivo tratamiento de los datos. En la Tabla 4 y 5 se muestran los porcentajes de ajuste lineal de las curvas características de cada bioprodo clasificados por fórmula y método. Por consiguiente, mostraremos dos tablas, cada una con los valores del ajuste lineal hallados para las curvas separadas según la fórmula de conversión a escalas de grises. La primera para los datos convertidos a partir de la imagen promedio reconstruida y la segunda para los datos promedio a partir de los resultados de las treinta imágenes convertidas a escala de grises.

**Tabla 4.** Ajustes lineales obtenidos de las curvas características graficadas de la conversión a escala de grises de las imágenes promedio de cada bioprodo con sus respectivas concentraciones.

<b>Bioprodo</b>	<b>RCB2Gray</b>	<b>Intensity</b>	<b>Gleam</b>	<b>Luma</b>	<b>Luminance</b>	<b>Value</b>	<b>Luster</b>
<b>OP2</b>	0.0114	0.0137	0.0827	0.0868	0.128	0.0047	0.0085
<b>OP3</b>	0.963	0.9699	-0.0573	-0.0909	0.9718	0.974	0.9699
<b>OP14</b>	0.0472	0.0715	0.1944	0.0023	0.0336	0.0453	0.4156
<b>OP15</b>	0.0276	0.073	0.0036	0.0368	0.0198	0.1085	0.1034
<b>OP16</b>	0.3430	0.3265	0.0539	0.0008	0.2007	0.3171	0.3079
<b>BO1</b>	0.8305	0.4481	0.7234	0.5854	0.9228	0.3776	0.8005
<b>BO2</b>	0.0377	0.0277	0.0887	0.0261	0.8129	0.4529	0.4685
<b>BO3</b>	0.4369	0.2077	0.5864	0.3329	0.7636	0.6778	0.3868
<b>BO4</b>	0.8895	0.9239	0.9279	0.5596	0.9576	0.7567	0.9406
<b>BO5</b>	0.6424	0.7449	0.7569	0.2987	0.8227	0.7254	0.6968
<b>BO6</b>	0.8408	0.7205	0.5228	0.4862	0.8738	0.3633	0.7198
<b>BO7</b>	0.7099	0.7070	0.4842	0.3382	0.8416	0.6237	0.6367
<b>BO8</b>	0.7405	0.8664	0.9476	0.9651	0.8583	0.8748	0.8781
<b>BO9</b>	0.6539	0.6635	0.5051	0.6770	0.6742	0.7134	0.7282
<b>BO10</b>	0.7161	0.4315	0.4555	0.2200	0.8518	0.8067	0.2940
<b>BO11</b>	0.0051	0.0871	0.0368	0.3954	0.8141	0.4274	0.0004
<b>BO12</b>	0.3669	0.3483	0.5719	0.4816	0.4101	0.5332	0.4525
<b>BO13</b>	0.3971	0.4310	0.3713	0.2037	0.6484	0.6460	0.6463
<b>BO14</b>	0.6378	0.1864	0.2397	0.2582	0.4784	0.3646	0.1434
<b>BO15</b>	0.7060	0.8025	0.3088	0.0740	0.8693	0.9151	0.9097

Cabe destacar, que para cada fórmula y cada bioprodo se tienen sus curvas características archivadas para poder ser consultadas. Pero para el análisis de los resultados nos basaremos en el valor del ajuste lineal, debido a que este puede representar el porcentaje de cercanía de la curva característica de cada bioprodo a una curva lineal. Es deseable una curva característica lineal porque su tendencia ascendente o descendente, según sea el caso, nos asegura que no habrá intercepción en los datos y por lo tanto cada valor de concentración de glucosa tendrá un único valor correspondiente al promedio de la intensidad. También es importante mencionar que se tomó el rango completo para evaluar la linealidad, aunque algunas de las curvas pueden presentar mayor ajuste lineal en rangos más reducidos, pero para fines de este proyecto se usó el rango 100mg/dl-200mg/dl.

Podemos observar en la tabla 4 que para los primeros cinco bioproductos se consiguió que uno de ellos, OP3, obtuvo un ajuste lineal mayor al 90% en cinco de las siete fórmulas utilizadas para la conversión de la imagen a escala de grises, cabe destacar que dentro de estos cinco bioproductos dos fueron fabricados con una cantidad de 1 mg de glucosa oxidasa y los tres restantes con 2 mg de enzima. Pero para el segundo lote, conformado por quince bioproductos todos fueron fabricados con 1 mg de glucosa oxidasa y se obtuvo que diez de ellos tienen un ajuste lineal mayor a 80% con la fórmula de conversión a escala de grises etiquetada como “luminance”.

**Tabla 5.** Ajustes lineales obtenidos de las curvas características graficadas con el promedio de la conversión a escala de grises de las treinta imágenes captadas por bioproducto para cada concentración.

<b>Bioproducto</b>	<b>RCB2Gray</b>	<b>Intensity</b>	<b>Gleam</b>	<b>Luma</b>	<b>Luminance</b>	<b>Value</b>	<b>Luster</b>
<b>OP2</b>	0.0151	0.018	0.2174	0.139	0.2319	0.0075	0.0112
<b>OP3</b>	0.7425	0.7851	-0.058	0.4252	0.9785	0.7851	0.7863
<b>OP14</b>	0.0422	0.0645	0.1591	0.0123	0.0356	0.0576	0.3968
<b>OP15</b>	0.0134	0.0531	0.0124	0.3219	0.0069	0.0874	0.0831
<b>OP16</b>	0.3437	0.3257	0.1923	0.0328	0.1714	0.3182	0.3099
<b>BO1</b>	0.7604	0.5054	0.5183	0.6684	0.6300	0.442	0.8725
<b>BO2</b>	0.0123	0.0120	0.3844	0.0097	0.7876	0.5033	0.5212
<b>BO3</b>	0.4194	0.1829	0.5795	0.3493	0.7929	0.6906	0.3747
<b>BO4</b>	0.6337	0.7686	0.8236	0.5765	0.665	0.4072	0.7773
<b>BO5</b>	0.6502	0.745	0.6458	0.6068	0.753	0.7313	0.7043
<b>BO6</b>	0.2282	0.6105	0.4956	0.5977	0.1568	0.0568	0.5783
<b>BO7</b>	0.6972	0.6802	0.3607	0.3089	0.7978	0.5691	0.598
<b>BO8</b>	0.7548	0.8739	0.7830	0.9574	0.8843	0.8878	0.8871
<b>BO9</b>	0.6440	0.6497	0.7378	0.5578	0.6828	0.7061	0.7182
<b>BO10</b>	0.7877	0.5430	0.4083	0.1175	0.7784	0.7816	0.3757
<b>BO11</b>	0.0991	0.0135	0.0606	0.7031	0.6897	0.4342	0.0155
<b>BO12</b>	0.3052	0.2946	0.6342	0.4480	0.4052	0.5069	0.4191
<b>BO13</b>	0.4096	0.4420	0.4040	0.2008	0.6673	0.6609	0.6601
<b>BO14</b>	0.4691	0.2396	0.2035	0.2645	0.7402	0.4153	0.2164
<b>BO15</b>	0.7032	0.7828	0.5605	0.0950	0.8231	0.8963	0.8922

En la tabla 5, en contraste con la tabla 4, observamos que los resultados en OP3 son solo cuatro fórmulas las que tienen un ajuste lineal mayor a 80%, además, en el caso de casos que su ajuste lineal es mayor a 80% disminuye a dos en el caso de “luminance” y “luma”, y tres para la fórmula etiquetada como “luster”. Por lo tanto, a partir de los resultados conseguidos, se seleccionó los bioproductos fabricados con 1 mg de glucosasa oxidasa, primero porque proporcionaron los mejores resultados, tanto en el momento de ser evaluados con el procesamiento digital de imágenes, como al evaluar el recubrimiento de las fibras. Y en cuanto a las fórmulas utilizadas, se concluye que el mejor resultado se consigue con la fórmula ‘Luminance’.

Podemos observar en ambas tablas, que a partir de ambos métodos se lograron conseguir resultados que nos demuestran que es posible conseguir una curva característica con un comportamiento cercano al lineal, en algunos casos hasta mayor del 90% de linealidad. Pero el método que obtuvo mayor cantidad de linealidad tomando en cuenta todas las fórmulas para la caracterización de los bioproductos es el primer método, el cual se obtiene de la imagen promedio reconstruida de la toma de las treinta imágenes continuas capturadas con la cámara para cada concentración. Además, el primer método tiene un ahorro en el uso de recursos de procesamiento digital, debido a que cada imagen de las treinta capturadas no es convertida con las siete fórmulas como es el caso del segundo método, sino que solo se aplica cada fórmula una vez, para la imagen promedio hallada por cada concentración.

Por otra parte, se hizo un tratamiento de los datos sin tomar en cuenta las fórmulas de conversión a escala de grises, si no, haciendo uso del método que aplica Matlab, para representar la imagen en tres matrices, una para cada color del formato RGB, a partir de las cuales se hallaron las imágenes en escala de grises con cada una de las fórmulas usadas en los métodos anteriores. Hay una matriz que representa el color rojo (R), otra matriz para el color verde (G) y finalmente, para el color azul (B), también se aplicó por ambos métodos. El primer método hallando el promedio de las tres matrices individuales de la imagen promedio obtenida para cada concentración, y el segundo método hallando el promedio de las treinta imágenes obtenidas para las tres matrices obtenidas para cada concentración y finalmente el promedio total de los promedios obtenidos.

A continuación, se muestran en las Tablas 6 y 7 los valores de aproximación lineal hallados de cada curva R, G y B, para cada método.

**Primer Método:**

**Tabla 6.** Ajustes lineales obtenidos de las curvas características graficadas con el promedio de las tres matrices provenientes de la imagen promedio calculada por bioprodo para cada concentración.

<b>Bioprodo</b>	<b>R(rojo)</b>	<b>G(verde)</b>	<b>B(azul)</b>
<b>OP2</b>	0.0438	0.0099	0.014
<b>OP3</b>	0.6872	0.792	0.9015
<b>OP14</b>	0.0005	0.0495	0.1584
<b>OP15</b>	0.141	0.0011	0.1465
<b>OP16</b>	0.0019	0.5393	0.7927
<b>BO1</b>	0.8653	0.3926	0.6039
<b>BO2</b>	0.0787	0.0006	0.0078
<b>BO3</b>	0.1265	0.7517	0.3773
<b>BO4</b>	0.0052	0.4811	0.7061
<b>BO5</b>	0.1983	0.6576	0.7437
<b>BO6</b>	0.3393	0.8041	0.6232
<b>BO7</b>	0.6035	0.6494	0.4579
<b>BO8</b>	0.8885	0.4851	0.9583
<b>BO9</b>	0.6065	0.6567	0.663
<b>BO10</b>	0.1245	0.9365	0.3911
<b>BO11</b>	0.0934	0.1542	0.4843
<b>BO12</b>	0.2334	0.5282	0.4303
<b>BO13</b>	0.5343	0.3253	0.3625
<b>BO14</b>	0.231	0.0003	0.255
<b>BO15</b>	0.5401	0.317	0.1302

Observando ambas tablas, no se puede analizar en concreto si algún color por si solo representa mayor absorción debido a la variación en los valores de aproximación lineal entre un bioprodo y otro. Además, no se observa un patrón que nos permita determinar si alguna matriz de color tiene un comportamiento lineal más cercano. Por consiguiente, no es posible realizar con este método un análisis individual del comportamiento por longitud de onda, debido a que para hallar el promedio se tomó en cuenta todo el rango de la imagen y no por fragmentos con distancias predeterminadas separando los colores según su posición.

**Segundo Método:**

**Tabla 7.** Ajustes lineales obtenidos de las curvas características graficadas con el promedio de las tres matrices de las treinta imágenes captadas por bioprodo para cada concentración.

<b>Bioprodo</b>	<b>R(rojo)</b>	<b>G(verde)</b>	<b>B(azul)</b>
<b>OP2</b>	0.0424	0.0065	0.013
<b>OP3</b>	0.9898	0.958	0.9778
<b>OP14</b>	0.0001	0.0537	0.1674
<b>OP15</b>	0.1199	0.0008	0.1274
<b>OP16</b>	0.0008	0.5453	0.7975
<b>BO1</b>	0.8658	0.6485	0.6652
<b>BO2</b>	0.0776	0.0004	0.0078
<b>BO3</b>	0.1445	0.7597	0.3746
<b>BO4</b>	0.0037	0.2669	0.6292
<b>BO5</b>	0.168	0.6401	0.7394
<b>BO6</b>	0.6171	0.3737	0.6836
<b>BO7</b>	0.5323	0.6026	0.3773
<b>BO8</b>	0.8807	0.4864	0.9658
<b>BO9</b>	0.5834	0.6498	0.6277
<b>BO10</b>	0.0471	0.9863	0.4037
<b>BO11</b>	0.0748	0.2792	0.6253
<b>BO12</b>	0.2004	0.4303	0.375
<b>BO13</b>	0.5559	0.3362	0.3636
<b>BO14</b>	0.2219	0.0002	0.2622
<b>BO15</b>	0.5215	0.3006	0.102

Por lo tanto, afectan como ruido al resto de la imagen, pero no es objetivo de esta tesis hacer un análisis por longitud de onda, entonces para poder realizar la caracterización del biosensor debemos tomar en cuenta las tres matrices y realizar la conversión a escala de grises.



# Capítulo 6

## Conclusiones

Para la caracterización del biosensor de glucosa, todo el trabajo se dividió en fases que correspondían, a la fabricación de los bioprodos, el arreglo experimental y el procesamiento de la señal, por lo tanto, se hará un recuento de las conclusiones que se llegaron con cada fase de este proyecto.

En la preparación de los bioprodos se hizo uso de la técnica Sol-Gel, permitiendo aprobar el hecho de la versatilidad de esta técnica, que logró satisfactoriamente la encapsulación de la enzima en un recubrimiento sólido y poroso de sílice en la superficie de la fibra óptica plástica. El mejor método para aplicar este proceso para el caso específico del biosensor de glucosa es realizarlo a temperatura ambiente y realizar el periodo de secado en una temperatura menor a los ocho grados centígrados, evitando de esta manera la desnaturalización de la enzima glucosa oxidasa. Además, el proceso para realizar el recubrimiento se hizo a través del procedimiento dip-coating obteniendo bioprodos con una capa delgada, sólida y firme donde se encuentra encapsulada la enzima.

Por otra parte, para captar las imágenes del haz de luz transmitido por la fibra óptica plástica, se utilizó la cámara de un Smartphone, y hay que resaltar que para este hecho es necesario mantener totalmente oscura el área durante la captura de las imágenes y de esta manera, evitar la interferencia de otros haces de luz en la imagen que puedan causar ruido en el análisis. También es necesario garantizar la posición constante y repetible de los elementos del arreglo experimental (fuente, rejilla de difracción y cámara), durante la captura de las imágenes.

Y finalmente, la evaluación de las imágenes captadas se realizó mediante software Matlab, a través de dos métodos y con la ayuda de siete fórmulas para la conversión de la imagen a escala de grises. De lo cual se pudo determinar que el mejor método es construir una imagen promedio de las imágenes que sean captadas en la opción disparo continuo de la cámara del smartphone, en los experimentos de esta imagen por las características del celular fueron treinta las imágenes capturadas, y a partir de esta imagen promedio realizar las siete conversiones para cada una de las concentraciones probadas, este método fue llamado durante el desarrollo de la tesis, primer método, de esta forma se permite ahorrar recursos computacionales, también se observó mayor número de bioproductos con aproximación lineal mayor a 80%.

Además, se determinó que de las siete fórmulas la que presenta mayor linealidad es la fórmula etiquetada como 'luminance'. Las curvas se hicieron en un rango de 100-200 mg/dl, debido a las necesidades de los laboratorios clínicos de determinar los valores de glucosa en la sangre en este rango para casos de diabetes.

Por último, después del análisis de los resultados obtenidos, se determinó que es viable realizar un biosensor de glucosa usando fibra óptica plástica, a través de determinación y análisis de la señal obtenida mediante procesamiento digital de imágenes.

## **Trabajos a Futuro**

Como trabajo futuro se pudiera desarrollar un programa que aplique el primer método y convierta la imagen a escala de grises con esta fórmula permitiendo calcular los valores de glucosa con la curva característica previamente registrada. La curva característica representaría los niveles de glucosa versus la media de nivel de gris de la imagen captada, que permita la construcción de un biosensor de glucosa, también es necesario una evaluación de la estabilidad y selectividad para poder ser comercializado.

# Bibliografía

- [1] IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8.
- [2] G. J. Owens, R. K. Singh, F. Foroutan, M. Alqaysi, C. Han, Ch. Mahapatra, and J. C. Knowles, "Sol-gel based materials for biomedical applications" Published by Elsevier. Progress in Materials Science 77 (2016) 1–79 (2016) Ltd 0079-6425.
- [3] V. González Rumayor, E. García Iglesias, O. Ruiz Galán, y L. Gago Cabezas. "Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria" informe de vigilancia tecnológica de la colección «vt» y de la presente edición: CEIM. Dirección General de Universidades e Investigación (2005) M-2213-2005.
- [4] C. Jiménez, y D. E. León P. "Biosensores: Aplicaciones y Perspectivas en el control y calidad de procesos y Productos Alimenticios". Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Volumen 16 número 1. págs. 144-154 (2009) ISSN 0121-4004.
- [5] E. Alvarado-Méndez, R. Rojas-Laguna, J. A. Andrade-Lucio, D. Hernández-Cruz, R. A. Lessard, J. G. Aviña-Cervantes, "Design and characterization of pH sensor based on sol gel silica layer on plastic optical fiber". Sensors & Actuators B 106 (2005)518-522.
- [6] J. A. Saavedra García, "Sensor de pH usando fibra óptica plástica a través de un Smartphone". Universidad de Guanajuato División de Ingenierías Campus Irapuato-Salamanca. Tesis para obtener el grado en Maestro en Ingeniería Eléctrica Instrumentación y Sistemas Digitales (2017).

- [7] J. D. Wright, N. A.J.M., Sommerdijk, “Sol-Gel materials: Chemistry and applications”, Primera edición. Editorial: CRC Press, (2001)3-14.
- [8] Wolfbeis, O. S.; Oehme, I.; Papkovskaya, N.; Klimant, I. “Sol-gel based glucose biosensors employing optical oxygen transducers, and a method for compensating for variable oxygen background”. *Biosensors and Bioelectronics* (2000) 15, 69-76.
- [9] S. Tierney, B. M. Hasle Falch, D. R. Hjelme, and B. Torger Stokke, “Determination of Glucose Levels Using a Functionalized Hydrogel-Optical Fiber Biosensor: Toward Continuous Monitoring of Blood Glucose in Vivo”. *Anal. Chem.* (2009) 81, 3630–3636.
- [10] F. Hussaina, D. J. S. Birchb, and J. C. Pickupa. “Glucose sensing based on the intrinsic fluorescence of sol-gel immobilized yeast hexokinase”. *Analytical Biochemistry* 339 (2005) 137–143.
- [11] P. N. Patel, V. Mishra, and A. S. Mandloi. “Optical Biosensors: Fundamentals & Trends”. Review Article. *Journal of Engineering Research and Studies*. Vol. I Issue I (2010) 15-34.
- [12] M. D. Marazuela and M. C. Moreno-Bondi. “Fiber-optic biosensors – an overview”. *Anal Bioanal Chem* 372 :664–682 DOI 10.1007 (2002) s00216-002-1235-9.
- [13] F. Long, A. Zhu and H. Shi. “Recent Advances in Optical Biosensors for Environmental Monitoring and Early Warning”. *Sensors* (2013) 13, 13928-13948; DOI 10.3390/s131013928.
- [14] M. L. Rojas. “Diseño y síntesis de materiales “a medida” mediante el método de sol-gel”. [www.uned.es/publicaciones](http://www.uned.es/publicaciones) (2015). ISBN electrónico: 978-84-362-6496-8.
- [15] U. Schubert and N. Hüsing. *Synthesis of Inorganic Materials*, 3rd edn, VCH-Wiley Verlag GmbH, (2012) Weinheim, ISBN 3-527-32714-1.

- [16] D. Levy and M. Zayat. "The Sol-Gel Handbook". Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (2015). Print ISBN: 978-3-527-33486-5.
- [17] C. J. Brinker and G. W. Scherer. Sol-Gel Science "The physics and chemistry of Sol-Gel Processing". Academic Press, Inc. An imprint of Elsevier (1990). ISBN: 978-0-12-134970-7.
- [18] R. B. Figueira, C. J. R. Silva and E. V. Pereira. "Influence of experimental parameters using the Dip-Coating method on the barrier performance of hybrid Sol-Gel coatings in strong alkaline environments". *Coatings* (2015) ISSN: 2079-6412, 5, 124-141; doi:10.3390/coatings5020124.
- [19] Rahaman, M.N. "Ceramic Processing". CRC Press (2007). pp. 242–244. ISBN 0-8493-7285-2.
- [20] D. Quéré. "fluid coating on a fiber". *Annual Review of Fluid Mechanics* (1999). 31 (1): 347–384. doi:10.1146/annurev.fluid.31.1.347. ISSN 0066-4189.
- [21] L. C. Klein. "Sol-gel optics processing and applications". Kluwer international series in engineering and computer science: SECS 259. Springer Science and Business Media New York (1994). DOI 10.1007/978-1-4615-2750-3.
- [22] J.F. Kennedy, and C.A. White. *Handbook of Enzyme Biotechnology*. Wiseman, A., ed. Ellis Horwood Ltd., Chichester. (1985) pp. 147-207.
- [23] K. Martinek, and V.V. Mozhaev. *Immobilization of enzymes: An approach to fundamental studies in biochemistry*. *Adv. Enzymol.*(1985) 57: 179-249.
- [24] S. Braun, S. Rappoport, S. Shteizer, R. Zusman, S. Druckmann, D. Avnir and M. Ottolenghi. "Design and Properties of Enzymes Immobilized in Sol-Gel Glass Matrices". *Biotechnology: bridging research and applications*. Proceedings of the US-Israel Research Conference on Advances in Applied Biotechnology June 24-30 (1990) Haifa, Israel.

- [25] J. Raba, and H.A. Mottola. "Glucose Oxidase as an Analytical Reagent". *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 25(1):1–42 (1995).
- [26] D. Keilin, and E. F. Hartree, "Properties of Glucose Oxidase (Notatin)" *Biochem. J.* (1948), 42, 221–229.
- [27] J. Konecny. *Survey of Progress in Chemistry*, Vol. 8; Academic Press: New York, (1977), pp. 195–251.
- [28] M. A. Alarcón Sanabria y J. A. Saavedra García. "Herramienta de Software para el Reconocimiento de Fallas Tipo Desprendimientos en Pavimento Flexible". Universidad Industrial de Santander, (2014).
- [29] J. C. Russ. *The image processing handbook*. CRC press, (2016).
- [30] R.C. González, R. E. Woods, F. D. Rodríguez, and L. Rosso. *Tratamiento digital de imágenes*, volume 3. Addison-Wesley New York, (1996).
- [31] C. Kanan and G. W. Cottrell. Color-to-grayscale: does the method matter in image recognition *PloS one*, 7(1):e29740, (2012).