

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA ELÉCTRICA - SISTEMAS ELECTRÓNICOS

DISEÑO, DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE UN BIOSENSOR DE GLUCOSA MINIATURIZADO E INTEGRACIÓN EN UNA PLATAFORMA DE MEDICIÓN DUAL PARA LA DIABETES MELLITUS TIPO II

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN INGENIERÍA

PRESENTA:
JEHÚ LÓPEZ APARICIO

TUTORES:
DR. PABLO ROBERTO PÉREZ ALCAZAR, FI-UNAM
DR. MATHIEU CHRISTIAN ANNE HAUTEFEUILLE, FC-UNAM

COMITÉ TUTOR:
DRA. MARGARITA NAVARRETE MONTESINOS, IINGEN-UNAM
DR. OLEKSANDR MARTYNYUK, FI-UNAM

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., Enero 2018

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Pérez Alcázar Pablo Roberto.

Secretario: Dra. Carreón Castro María del Pilar.

Vocal: Dr. Hautefeuille Mathieu Christian Anne.

1er Suplente: Dra. Stern Forgach Catalina Elizabeth.

2do Suplente: Dra. López Marín Luz María.

Lugar donde se realizó la tesis: Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia (LaNSBioDyT) y en el Taller de Óptica Láser, Facultad de Ciencias, UNAM.

TUTORES DE TESIS:

Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille.	Dr. Pablo Roberto Pérez Alcázar.

Examen profesional presentado el ante el Jurado:

Presidente: Dr. Pérez Alcázar Pablo Roberto.
Secretaria: Dra. Carreón Castro María del Pilar.
Vocal: Dr. Hautefeuille Mathieu Christian Anne.
1er Suplente: Dra. Stern Forgach Catalina Elizabeth.
2do Suplente: Dra. López Marín Luz María.

Tutores:
Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille.
Dr. Pablo Roberto Pérez Alcázar.

Este trabajo se desarrolló en el taller de óptica láser de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría del Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille y del Dr. Pablo Roberto Pérez Alcázar.
Las pruebas experimentales se realizaron en el taller de óptica láser de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (FC-UNAM), bajo la tutoría del Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille.
Este trabajo fue financiado por los proyectos CONACyT 246988 y 280317; y por el proyecto PAPIIT IT102017 (FC-UNAM).

El autor, sin perjuicio de legislación de Universidad Nacional Autónoma de México, otorga el permiso para el libre: uso, reproducción y distribución de esta obra; siempre que sea sin fines de lucro, se den los créditos correspondientes y no sea modificada, en especial ésta nota.

D.R. ©Jehú López Aparicio, Ciudad de México; Enero de 2018.

La redacción y edición de esta tesis se realizó utilizando: LaTeX, *Inkscape* y GIMP.

Dedicatoria

A mi Familia

$\sim$ Jehú $\sim$

Agradecimientos

El desarrollo del presente trabajo ha sido posible gracias a la contribución de muchas personas, además, se ha mejorado gracias a las numerosas observaciones, comentarios y distintos puntos de vista.

A mis tutores, Los Doctores Mathieu Christian Anne Hautefeuille y Pablo Roberto Pérez Alcázar, por la confianza, la paciencia y el apoyo brindado durante el desarrollo del presente trabajo.

Al Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille por brindarme la confianza y apoyo desde el primer momento y a lo largo de todo el trabajo, es decir, desde la propuesta, el desarrollo y la conclusión de este trabajo. Por guiar mi formación profesional y asesorar en todo momento en cada uno de los aspectos que he requerido. Por compartir en todo momento tus experiencias y puntos de vista de manera imparcial. Por la paciencia y el profesionalismo mostrado en los momentos más difíciles.

A los Doctores: María del Pilar Carreón Castro, Catalina Elizabeth Stern Forgach, Luz María López Marín, Pablo Roberto Pérez Alcázar y Mathieu Christian Anne Hautefeuille, por las observaciones, correcciones y sugerencias hechas al presente trabajo.

A los miembros del comité tutor; Los Doctores Pablo Roberto Pérez Alcázar y Margarita Navarrete Montesinos; por sus: observaciones, comentarios y sugerencias, para que este trabajo se llevara a buen término.

Al equipo de trabajo de este proyecto: Los Doctores Catalina Elizabeth Stern Forgach, Dra. Tatiana Fiordelisio Coll y Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille, así como los M. en C. Mariana Soledad Centeno Sierra y José Alfredo Jiménez Medina, por su dedicación y esfuerzo invertido en el desarrollo del Biosensor Molecular, así como su interés en crear tecnología que pueda ayudar a la sociedad.

A la Dra. Laura Oropeza Ramos, por compartir su conocimiento y experiencia para el apoyo de mi formación profesional.

M. en C. Alejandro Esparza García (CCADET), por su apoyo técnico en la obtención de los primeros perfiles de las estructuras producidas con el grabado láser.

Al Fís. Diego Zamarrón Hérnandez, por su apoyo técnico en la obtención de los perfiles de las distintas micro estructuras producidas para los micro moldes.

Al Fís. Aaron Cruz Ramírez, por su apoyo técnico en la fabricación de los micromoldes.

A la Fís. Sara Jacqueline Herrera Domínguez, por su apoyo en la caracterización de los micro electrodos para medir glucosa.

A Fís. Adriana Razo de Léon, por su apoyo en la caracterización de electrodos aplicados a un sensor de temperatura.

A Mariel Cano Jorge e Ixchetl Rojas Benito, por su apoyo en el desarrollo de electrodos para conteo celular.

M.C.I.M. Daniel Pérez Calixto, por sus observaciones y asesorías relacionadas con los aspectos físicos de esta tesis.

M. en C. Lidia Escutia Guadarrama, por su asesoría en la parte electro-química del presente trabajo.

A la Fís. Ana Lucía Cabriales Torrijos, por su paciencia y tiempo en el entrenamiento para le preparación y uso del PDMS.

Al Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia (LaNSBioDyT); por facilitar sus: instalaciones, equipo y material que fueron necesarios para el desarrollo de este trabajo; especialmente al Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille, por el esfuerzo invertido para que dicho laboratorio tuviera lugar en la Facultad de Ciencias.

Al CONACyT por la beca de Doctorado y a los proyectos CONACyT 246988 y 280317; y por el proyecto PAPIIT IT102017 (FC-UNAM).

Al Taller de Óptica Láser; a los Doctores: Víctor Manuel Velázquez Aguilar, Mathieu Christian Anne Hautefeuille y Enrique López Moreno; por facilitar las instalaciones y equipo para que este proyecto se desarrollara. Especialmente, al Dr. Víctor Manuel Velázquez Aguilar, por su asesoría, consejos, confianza y amistad. Esta relación de amistad y trabajo con la Dra. Aurora Vargas Treviño y el Dr. Sergio Vergara, me han traído a esta institución y doy gracias por ello.

Al Laboratorio de Electrónica de la Facultad de Ciencias; Al Dr. Sergio Enrique Solís Nájera, por las facilidades que el laboratorio ha tenido en el desarrollo de este proyecto, y a los laboratoristas Rosalía Meléndez López y Oswaldo Nava Carbajal por su apoyo en el préstamo de material o equipo.

Al equipo del Taller de Mecánica de la Facultad de Ciencias; Fabian Arreola Millán, Fernando Pozos Pérez y Jonatan Mares Hurtado; por el apoyo brindado en el diseño del prototipo del micromanipulador, corte de distintos sustratos y maquinado CNC. Asimismo, al equipo del Taller de carpintería por el apoyo brindado en el corte de distintos sustratos.

Al personal del Departamento de Física y personal administrativo del departamento de bienes y suministros de la facultad de ciencias.

A las firmas Maxim Integrated y Texas Instruments Incorporated por las muestras de circuitos integrados empleados en este proyecto.

A Google por el financiamiento a través del premio Google Research Awards for Latin America.

En el transcurso de este trabajo, he tenido el gusto de conocer a distintas personas a quienes quiero agradecer por su amistad y los gratos momentos que hemos compartido: Arturo Abner Jiménez Aguilar, Ana Ximena Monroy Romero, Beatriz Díaz Bello, Cindy Viridiana Peto Gutiérrez, Daniela Margarito Segundo, Erika Araceli Gonzalez Villa, Edgar Adán Jimenez Díaz, Francisco Paez Larios, Genaro Vazquez Victorio, María José González Vázquez, Martín Reyes Gallegos, Raúl Sánchez Olvera, Raúl Caudillo Viúrquez, Verenice Graciela Bautista Arce, Yasab Ruiz Hernández y Erandi Elizabeth Madrigal Anguiano, y Adrian Aupart.

Finalmente, a mis amigos que han motivado mi camino y a quienes me han apoyado en los momentos difíciles: Alfonso Pantoja Vázquez, Raúl Fernández Rojas, Virgilio Ponce, Liz Pilar, Felipe Ponce, Heriberto I. Hernández, Efrén Garín, Paco Garín, Celes Garín, Moy Garín, Ana Laura Pérez y Oscar Martínez.

A todos, Gracias.

$\sim$ Jehú $\sim$

Índice general

Dedicatoria xi

Agradecimientos xiii

Resumen xxvii

Introducción xxix

1. Biosensores 1
- 1.1. Introducción . . . 1
- 1.2. Clasificación de los biosensores . . . 3
  - 1.2.1. Biosensores piezoeléctricos . . . 4
  - 1.2.2. Biosensores electroquímicos . . . 5
    - 1.2.2.1. Conductimétricos . . . 6
    - 1.2.2.2. Potenciométricos . . . 7
    - 1.2.2.3. Voltametría cíclica . . . 8
    - 1.2.2.4. Amperométricos . . . 11
    - 1.2.2.5. Espectroscopia de impedancia electroquímica . . . 14
  - 1.2.3. Biosensores ópticos . . . 16
    - 1.2.3.1. Resonancia de plasmón superficial . . . 17
    - 1.2.3.2. Biosensores basados en interferometría . . . 19
    - 1.2.3.3. Biosensores colorimétricos y fluorescentes . . . 21

2. Miniaturizar con microtecnología 25
- 2.1. Introducción . . . 25
- 2.2. Técnicas de microfabricación . . . 26
  - 2.2.1. Fotolitografía . . . 27
  - 2.2.2. MEMS . . . 28
  - 2.2.3. Microfresado . . . 29
  - 2.2.4. Litografía suave . . . 30
  - 2.2.5. Microfabricación láser . . . 31
- 2.3. Moldes . . . 31
  - 2.3.1. Molde-Réplica . . . 32
    - 2.3.1.1. Caracterización geométrica . . . 33
  - 2.3.2. Microfresado . . . 34
    - 2.3.2.1. Maquinado y caracterización geométrica . . . 34
  - 2.3.3. Microfabricación Láser . . . 38
    - 2.3.3.1. Grabado del sustrato . . . 39

2.3.3.2. Caracterización geométrica . . . 41
2.4. Electrodos . . . 42
2.4.1. Litografía suave . . . 43
2.4.2. Microfresado . . . 44
2.4.3. Microfabricación Láser . . . 45
2.5. Caracterización eléctrica de electrodos . . . 47
2.5.1. Configuración de la medición . . . 48
2.5.2. Impedancia de los microelectrodos . . . 50
2.5.2.1. Microelectrodos de carbón . . . 50
2.5.2.2. Microelectrodos de plata . . . 52
2.5.2.3. Microelectrodos de oro . . . 53
2.5.3. Respuesta en condiciones de humedad . . . 54
2.6. Discusión . . . 55

3. Aplicación - Glucosa **57**
3.1. Transducción electroquímica . . . 57
3.1.1. Inmovilización de enzima . . . 58
3.1.1.1. Retención física . . . 59
3.1.1.2. Unión química . . . 59
3.2. Obtención de señales . . . 60
3.2.1. Polarización de electrodos . . . 63
3.2.2. Medición con un sensor . . . 64
3.2.3. Medición múltiple . . . 65
3.3. Electrodos . . . 67
3.3.1. Sensibilización de electrodos . . . 67
3.3.2. Preparación de muestras de solución con glucosa . . . 68
3.3.3. Ensamble de electrodos . . . 68
3.3.3.1. Sustratos con un solo electrodo . . . 69
3.3.3.2. Sustrato con dos electrodos . . . 70
3.3.3.3. Sustratos con 4 electrodos . . . 71
3.4. Pruebas funcionales . . . 72
3.4.1. Sustratos con un electrodo . . . 72
3.4.1.1. Molde réplica . . . 72
3.4.1.2. Microfabricación láser . . . 73
3.4.2. Medición múltiple . . . 74
3.4.2.1. Microfresado . . . 74
3.5. Discusión . . . 76

4. Aplicación Insulina **79**
4.1. Introducción . . . 79
4.2. Sensor de biomoléculas . . . 81
4.2.1. Detección de una molécula . . . 81
4.2.2. Detección de múltiples moléculas . . . 82
4.2.3. Desplazamiento de las partículas . . . 84
4.3. Materiales y métodos . . . 86
4.4. Resultados . . . 87
4.4.1. Detección de una molécula . . . 87

4.4.2. Detección de múltiples moléculas . . . 89
4.5. Integración sensor glucosa-insulina . . . 89

5. Conclusiones y trabajo futuro **93**

A. Preparación de electrodos **97**
A.1. Materiales . . . 97
A.2. Equipo . . . 97
A.3. Preparación . . . 97

B. Uso del medidor de impedancias **99**
B.1. Materiales y equipo . . . 99
B.2. Uso . . . 99

C. Preparación de PDMS **103**
C.1. Materiales . . . 103
C.2. Equipo . . . 103
C.3. Preparación . . . 103

D. Preparación de muestras con glucosa **105**
D.1. Materiales . . . 105
D.2. Equipo . . . 105
D.3. Preparación . . . 106

E. Funcionalización de partículas magnéticas **107**
E.1. Materiales utilizados . . . 107
E.2. Lavado de partículas magnéticas . . . 107
E.3. Funcionalización de partículas magnéticas . . . 107

F. Aplicaciones con microelectrodos **109**
F.1. Sensor de temperatura . . . 109
F.2. Microelectrodos para conteo celular . . . 110

G. Artículo **111**

H. Solicitud de patente **119**

Bibliografía **121**

Índice de figuras

1.1. Componentes de un biosensor [1]. 2
1.2. Curva de calibración de un biosensor. 3
1.3. Señales de excitación en voltametría: (a) barrido lineal, (b) Pulso diferencial, (c) onda cuadrada y (d) triangular. 8
1.4. Circuito electrónico simplificado para hacer voltametría cíclica. 9
1.5. Circuito electrónico de un potenciostato. 9
1.6. Ejemplo de voltagrama. 10
1.7. Proceso de reducción-oxidación [2]. 11
1.8. Tres formas de transporte de masa (a) difusión, (b) convección y (c) migración [3]. 12
1.9. Biosensor capacitivo (a) sección transversal y (b) electrodo interdigitado. 15
1.10. Biosensor óptico sin marcador. 17
1.11. SPR utilizando acomplamiento con un (a) prisma y (b) gráfica del ángulo θ vs reflectividad. 18
1.12. Interferómetro de Mach-Zehnder. 19
1.13. Pasos de ELISA directo: (a) inmovilización de antígeno, (b) anticuerpo marcado y (c) adición de sustrato, detección se señal y cuantificación. 21
1.14. Pasos empleado en el ELISA Indirecto: (a) inmovilización de antígeno, (b) incubación de anticuerpo primario, (c) incubación de anticuerpo secundario y (d) adición de sustrato, detección se señal y cuantificación. 22
1.15. Pasos de ELISA Sandwich: (a) anticuerpo de captura inmovilizado, (b) inmovilización de antígeno, (c) anticuerpo secundario marcado y (d) adición de sustrato, detección se señal y cuantificación. 23
1.16. Pasos de ELISA por competencia: (a) anticuerpo de captura inmovilizado, (b) inmovilización de antígeno y antígeno marcado con enzima y (c) adición de sustrato, detección se señal y cuantificación. 23

2.1. Método para fabricar electrodos; (a) técnicas de microfabricación, (b) el molde en un sustrato, (c) depósito del material conductor y (d) el electrodo. 26
2.2. Proceso básico de la fotolitografía. (a) sustrato, (b) depósito de material fotosensible, (c) exposición, (d) revelado y (e) grabado y (f) revelado. 28
2.3. Proceso básico para la fabricación MEMS donde: (a) es la preparación del sustrato; (b) es el proceso de depósito, (c) es la transferencia del patrón, (d) es el grabado y (e) es el producto terminado. 28
2.4. Proceso utilizado por el microfresado: (a) diseño en computadora, (b) equipo CNC y (d) sustrato. 29
2.5. Técnica molde replica: (a) molde maestro, (b) PDMS sobre el molde maestro, (c) polimerización de PDMS y (d) molde-replica. 30

2.6. Proceso de ablación láser; (a) sustrato, (b) sustrato tratado con material absorbente y (c) sustrato grabado. 31
2.7. Procedimiento para preparar un molde réplica; (a) diseño, (b) diseño impreso en termoplástico, (c) molde maestro y (d) molde-replica. 33
2.8. Perfil de una línea de un molde hecho en el termoplástico Shrinky Dinks (Figura 2.7c). (a) Diseño del molde maestro y (b) perfil de la línea (a-1). 33
2.9. Maquinado de: (a) una línea, (b) un cuadro y, (c) dos cuadros adyacentes y (c) dos cuadros opuestos por el vértice. 35
2.10. Diseño para verificar las medidas del grabado en un sustrato de PMMA. (a) ancho de una línea, (b) dimensiones del grabado, (c) distancia entre pozos adyacentes y (d) distancia entre dos pozos opuestos por el vértice. 35
2.11. (a) Maquinado de un pozo de $\sim 2x2mm$, (b) perfil en 3D de dicho grabado y (c) perfil del grabado en 3 líneas distintas. 35
2.12. Diseño de líneas (a) y cuadros (b), para observar la repetibilidad de un maquinado CNC. 36
2.13. Maquinado de líneas (a) en un sustrato de PMMA, (b) profundidad y (c) rugosidad del grabado. 36
2.14. Maquinado de cuadros (a) en un sustrato de PMMA, (b) profundidad y (c) rugosidad del grabado. 37
2.15. Maquinado de cuatro pozos adyacentes para observar la repetibilidad en distintos sustratos de PMMA. (a) Diseño, (b) pozos y (c) perfil 3D. 37
2.16. Preparación de micromoldes en un sustrato de PMMA con microfabricación láser. (a) es el diseño, (b) el proceso de grabado y (c) el grabado. 38
2.17. Diseño de microelectrodos en un archivo de mapa de bits, para (a) caracterización eléctrica, (b) aplicaciones de amperometría y (c) impedancia. 39
2.18. Proceso de grabado en acrílico mediante la técnica de microfabricación láser. (a) Sustrato de acrílico, (b) tratamiento del sustrato, (c) grabado con láser y (d) micromolde. 40
2.19. Sustrato después del grabado (a) y después de limpiar (b). 40
2.20. (a) Diseño y (b) grabado y verificación de dimensiones. 41
2.21. Perfil del grabado pasando el haz láser solo una vez sobre el sustrato. (a) Micromolde, (b) perfil de grabado en tres líneas y (c) perfil de un pozo en 3D. . 41
2.22. Control de profundidad del grabado sobre el sustrato. (a) Sustrato grabado y (b) perfil del grabado. 42
2.23. Procedimiento de depósito del material conductor. (a) Molde, (b) depósito de material conductor y (c) microelectrodo. 43
2.24. Molde (a), microelectrodos de plata (b) y de carbón (c). 44
2.25. Microelectrodos producidos con micromaquinado. (a) Sustrato micromaquinado, (b) perforación al sustrato, (c) fijación de alambre, (d) depósito de material conductor y (e) microelectrodo. 45
2.26. Procedimiento de depósito del material conductor en un micromolde preparado con microfabricación láser. (a) Micromolde grabado, (b) micromolde limpio, (c) depósito de material conductor y (d) microelectrodo. 45
2.27. Procedimiento de depósito de pasta de carbón en un molde de PMMA. (a) Micromolde, (b) depósito de pasta de carbón y (c) uso de varilla para limpiar el exceso de carbón. 46

2.28. Microelectrodos de pasta de carbón. (a) Para caracterización eléctrica y (b) para aplicación en impedancia. . . . 46
2.29. Procedimiento de depósito de pasta de tinta de plata en un micromolde de PMMA (b), utilizando una toalla de papel (a). . . . 47
2.30. Electrodos de plata. (a) y (c) ejemplos de electrodos interdigitados para aplicación en impedancia y amperometría; y (b) electrodo para aplicación en impedancia. . . . 47
2.31. (a) Configuración de 4 terminales y (b) configuración de 2 terminales. . . . 49
2.32. Configuración para la medición de impedancia. (a) Configuración de 4 terminales, (b) medidor de impedancias, (c) platina para posicionar las puntas sobre microelectrodos y (d) puntas sobre microelectrodos. . . . 50
2.33. Manipulador implementado (b) con platinas (X, Z) (a) y platinas XY con ajuste fino (c). . . . 50
2.34. Impedancia (Z (a), θ(b)) de una estructura de carbón en función del voltaje aplicado. . . . 51
2.35. Geometría de una estructura rectangular. . . . 51
2.36. Impedancia (Z (a), θ(b)) de distintas estructuras con la misma longitud y diferente área de sección transversal. . . . 52
2.37. Impedancia (Z (a), θ(b)) de una estructura con la misma área de sección transversal y distinta longitud. . . . 52
2.38. Impedancia (Z (a), θ(b)) de un microelectrodo de plata en función del voltaje aplicado. . . . 53
2.39. Modelo eléctrico para microelectrodos de carbón y plata. (Z (a), θ(b)) . . . 53
2.40. Impedancia (Z (a), θ(b)) de un microelectrodo de oro en función del voltaje aplicado. . . . 53
2.41. (a) Impedancia del microelectrodo de carbón (Figura 2.39a-1) a través del tiempo cuando una gota de agua se deposita sobre el microelectrodo y (b) R_w y C_w normalizados. . . . 54

3.1. Esquema de la reacción oxidación-reducción. . . . 58
3.2. Circuito de transimpedancia (a) y amplificador operacional (b). . . . 60
3.3. Circuito de transimpedancia (a) montado en una tablilla de prueba (b) y conector para una tira reactiva (c). . . . 61
3.4. Voltaje vs Glucosa. . . . 61
3.5. Voltaje total vs Glucosa. . . . 62
3.6. Diagrama a bloques del sistema electrónico para procesar las señales de un sensor de glucosa. . . . 63
3.7. Respuesta de un sensor comercial cuando se polariza el electrodo. (a) Corriente de producida por una tira reactiva medida con equipo comercial SMU (b). . . . 63
3.8. Circuito utilizado para polarizar un electrodo de trabajo. (a) circuito de transimpedancia y (b) polarización con una fuente de 700 V. . . . 64
3.9. Señal de salida para dos muestras de agua con glucosa de (a) $2.5mg/dL$ y (b) $300mg/dL$. . . . 65
3.10. Circuito utilizado para procesar la señal de 4 sensores de glucosa de manera simultánea. . . . 66
3.11. Aplicación para procesar la señal de cuatro sensores de glucosa de manera simultánea. . . . 66

3.12. Elaboración de pasta (d) hecha con (a) rodio en carbón, (b) aceite mineral y sensibilizada con glucosa oxidasa (c). 67
3.13. Ensamble de una tira reactiva FreeStyle InsuLinx (a) con electrodos de Ag/AgCl - carbón (b) y dimensiones del área sensibilizada del electrodo de trabajo (c). . . 69
3.14. Procedimiento de ensamble de un electrodo de plata (a), con un electrodo de carbón utilizando un adhesivo (b) para formar un canal de acceso para la muestra (c-d). 70
3.15. Microelectrodos de carbón preparados con la pasta de Lasercon. (a) Sustrato de PMMA grabado, (b) Perforación de $550\mu m$, (c) alambre de $110\mu m$ y (d) microelectrodo. 70
3.16. Procedimiento para ensamblar electrodos. (a, b) Electrodos en sustrato de PDMS, (d) electrodos en sustratos de PMMA, ensamble de electrodos en sustratos de PDMS (c) y PMMA (d). 70
3.17. Electrodos en una tarjeta de circuito impreso. (a) Ensamble de los electrodos y (b) diseño con 2, 4 y 5 electrodos. 71
3.18. Sustrato con cuatro pozos (a) y cuatro electrodos de carbón para (b). 72
3.19. Diseño (a) y corte de separadores en vinilo (b) y cinta doble cara (c). 72
3.20. Respuesta del sensor en sustrato de acrílico (a) para muestras de agua y agua con glucosa (b). 73
3.21. Respuesta del sensor de glucosa en sustratos de PDMS (a) y PMMA(b). 73
3.22. Medición de glucosa con electrodos de plata y pasta de carbón y niveles típicos de glucosa en lágrimas, orina y sangre. 74
3.23. (a) Diseño de cuatro electrodos en un arreglo lineal, (b) canal hecho en sustrato de PMMA y (c) ensamble de electrodos y canal. 75
3.24. Medición múltiple (a, b) con cuatro electrodos del diseño Figura 3.18. 75
3.25. Moldes para microelectrodos para medición múltiple. (a) diseño, (b) maquinado en sustrato de PMMA y (c) cinta adhesiva de vinilo. 76
3.26. Medición múltiple con electrodos cuatro electrodos (a, b) del diseño Figura 3.25. 76

4.1. Método de detección de una molécula. (a) Zona de entrada del antígeno, (b) zona de reacción y (c) zona de detección óptica. 81
4.2. Método para la detección de múltiples moléculas. (a) Zona de entrada del antígeno, (b) zona de reacción y (c) zona de detección óptica. 82
4.3. Método de detección paso a paso. (a) Entrada del antígeno, (b) zona de reacción, (c) el imán desplaza a las nanopartículas a la zona de reacción y (d) el imán desplaza a las nanopartículas a la zona de detección óptica. 84
4.4. Plataforma mecánica para el control de movimiento del imán (a) y circuito electrónico de control (b). 85
4.5. Demostración de la manipulación de las partículas magnéticas en microcanales de poli-dimetilsiloxano (PDMS). 86
4.6. Geometría de la plataforma fluídica utilizada para el MDU. 86
4.7. Medición de insulina utilizando el MDU. 88
4.8. Resultados obtenidos con el MDU para insulina en muestra de sangre de humano. 89
4.9. Resultados obtenidos en el MDM descrito para la medición de GH e insulina. . . 90
4.10. Resultados obtenidos en el MDM descrito para la medición de GH (verde), insulina (rojo) y PRL (azul) simultáneamente. 90

4.11. Diseño del chip dual. (d) es la zona de entrada de la muestra, (a) es la zona de entrada del antígeno, (b) la zona de reacción, (c) es la zona de detección de biomoléculas y (e) zona de medición de glucosa. 91

F.1. Configuración del experimento para probar el sensor de temperatura (a) y respuesta de sensores de NTC y PTC (b). 109
F.2. Conteo de células mediante medición de impedancia (Z_n(a) y θ_n(b)) con microelectrodos de plata para diferentes concentraciones de suspensión Hep C9. 110

Lista de tablas

1.1. Ejemplos de ensayos comunes utilizados en la medicina. 24

2.1. Perfil en diferentes puntos (Figura 2.8a) de un molde maestro (Figura 2.7c). . . 34
2.2. Profundidad y ancho promedio de las estructuras maquinadas con microfresado en dos sustratos. 37
2.3. Altura y ancho promedio de dos estructuras. 51
2.4. Comportamiento eléctrico de los electrodos. 55

4.1. Longitudes de onda de excitación y emisión de los fluoróforos utilizados. 87

Resumen

En este trabajo se presenta el diseño, desarrollo e implementación de una plataforma miniaturizada, con capacidad de detección biológica para diagnóstico y monitoreo de la diabetes mellitus tipo II. La plataforma presentada se ha construido con un proceso de bajo costo, basado en técnicas de microfabricación.

El tamaño reducido del biosensor permite: (a) utilizar cantidades reducidas de agentes biológicos, (b) detectar con precisión y especificidad las sustancias consideradas, (c) integración fácil con los sistemas electrónicos que se desarrollaron para el procesamiento de datos y (d) garantiza un bajo costo de fabricación.

Para implementar la zona de detección de glucosa, se diseñaron y desarrollaron microelectrodos, los cuales se elaboraron utilizando las técnicas de molde-réplica, maquinado CNC y microfabricación láser. Los electrodos se sensibilizaron con la enzima glucosa oxidasa, para hacer específico el sensor.

Se utilizó la amperometría como método de detección de glucosa, tomando como base un circuito electrónico (hardware) para el procesamiento de la señal del sensor de glucosa. El sensor de glucosa puede medir concentraciones en el rango de $2.5mg/dL$ a $300mg/dL$.

El hardware diseñado para el sensor de glucosa comunica los datos de dicho sensor a una computadora y mediante un software, la computadora es capaz de leer, almacenar, y procesar esta información.

Se diseñó y desarrolló un circuito electrónico para el control y manipulación de una plataforma mecánica miniaturizada, acoplada a un cartucho microfluídico que sirve como soporte de un sensor de biomoléculas. El sensor de biomoléculas se desarrolló en el Laboratorio de Neuroendocrinología Comparada y ha demostrado ser útil para medir insulina. Dicho sensor utiliza un cartucho microfluídico, para manipular las micropartículas magnéticas en los canales fluídicos, hecho con el polímero polidimetilsiloxano.

El método de detección de biomoléculas utiliza una técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas por competencia, el cual emplea: (a) un equivalente al analito a medir, (b) un anticuerpo marcado fluorescentemente y, (c) micropartículas magnéticas, manipuladas con la plataforma electrónica y mecánica, que permiten la detección.

Además, en el Laboratorio de Neuroendocrinología Comparada, se desarrolló una aplicación para el procesamiento de imágenes del sensor de biomoléculas. Las imágenes de dicho sensor son obtenidas con un microscopio, por ello se propuso una plataforma mecánica miniaturizada, para integrar una forma de detección óptica utilizando fotodiodos y/o lentes y un teléfono.

Finalmente, los sensores de glucosa e insulina se integran en una plataforma de medición dual y en una misma plataforma electrónica y software.

Introducción

La diabetes mellitus ha crecido en rangos epidémicos, se estima que 422 millones de personas viven con diabetes alrededor del mundo [4]. La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) es la responsable de más del 90 % de todos los casos de diabetes, y entre el 60 y 90 % están relacionados con obesidad [5]. En México, la DMT2 tiene una prevalencia del 14.4 %, es decir, más de 16 millones de personas están afectadas y es la principal causa de: ceguera, enfermedad renal terminal, neuropatías debilitantes, amputación de miembros, infarto del miocardio y embolias [6].

La DMT2 es una enfermedad clínica y genéticamente heterogénea, resultado de la interacción entre factores genéticos y ambientales. Clínicamente la DMT2 se define como hiperglucemia en ayuno o postprandial, por lo tanto monitorear los niveles sanguíneos de glucosa forma una parte importante de la detección oportuna y de los objetivos de cualquier tratamiento. Sin embargo, lograr niveles apropiados de monitoreo de glucosa en sangre en la población mexicana ha demostrado ser una meta difícil de alcanzar. En México, de acuerdo a los resultados de la última encuesta de nutrición (ENSANUT del año 2012), menos de 1.6 de los 6.4 millones de individuos que se saben afectados con la enfermedad, cuentan con un control adecuado de los niveles de glucosa sanguínea. Con todo, la definición clínica de DMT2 delimita un estado relativamente tardío en el proceso de la enfermedad ya que defectos significativos en la homeóstasis de la glucosa y en el metabolismo energético son detectados mucho tiempo antes de que la diabetes ocurra [7]. En la DMT2 se produce una deficiencia relativa de insulina, hormona clave en la homeostasis de la glucosa, debida a la resistencia periférica y a un defecto secretor.

La insulina, un péptido de 51 aminoácidos secretado por las células beta del islote pancreático, ejerce acciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos, proteínas y electrolitos. Sin embargo, la retroalimentación fisiológica dominante es en la glucosa, por lo que la secreción de insulina esta acoplada a los niveles de glucosa a través de una relación dosis respuesta muy estrecha que es necesaria para mantener la concentración de glucosa plasmática dentro de un rango definido ($\sim 4.5 mmol/l$). La insulina ejerce sus acciones metabólicas a través de sus órganos "blanco", impidiendo la liberación de glucosa por el hígado y promoviendo la captura de glucosa por el músculo y el tejido adiposo. Cuando las concentraciones fisiológicas de insulina son incapaces de desarrollar esta respuesta se habla de resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina es el defecto metabólico común de las alteraciones que se agrupan en el síndrome metabólico, tales como obesidad, intolerancia a la glucosa, hipertensión arterial, dislipidemia y DMT2 [8]. Al desarrollarse existe un periodo de glucemia normal o cercana a lo normal, en la cual las células beta pancreáticas compensan la resistencia mediante la hipersecreción de insulina. Cuando eso ocurre, el páncreas fracasa en secretar suficiente insulina y se desarrolla diabetes. Por lo tanto, es de gran importancia contar con herramientas para cuantificar la sensibilidad a la insulina en humanos, que puedan ser usadas para investigar apropiadamente la epidemiología, los mecanismos fisiopatológicos, el beneficio de las intervenciones terapéuticas y el curso clínico de pacientes con resistencia a la insulina. Las formas más sencillas de valorar la sensibilidad a la insulina requieren de la medición en paralelo de los niveles sanguíneos de glucosa e insulina.

Justificación

A la fecha, no existen plataformas de medición dual glucosa-insulina miniaturizada y de bajo costo que permitan realizar un diagnóstico preciso, ni monitoreo en tiempo real de manera generalizada, como es requerido por el sector médico, tanto en México como en el resto del mundo. Debido al alto costo actual de medición de niveles sanguíneos de insulina (que se encuentran típicamente en pmol/l), el procedimiento común consiste en medir niveles de glucosa en la sangre exclusivamente, utilizando glucómetros comerciales de relativamente bajo costo. Por lo tanto, para estudios clínicos de detección temprana y monitoreo en tiempo real, se requiere de un dispositivo que pueda medir de manera dual esas dos concentraciones sin elevar demasiado el costo total del estudio por paciente.

La tecnología de los biosensores promete soluciones prácticas para responder a la necesidad de medir glucosa e insulina de forma generalizada en pacientes. El objetivo del presente proyecto es responder a las necesidades antes presentadas, ofreciendo nuevas alternativas de plataformas de detección de la diabetes, gracias a una medición dual de niveles de glucosa y de insulina en la sangre, en paralelo, con un microchip.

El diagnóstico común de la diabetes, con la única medición del nivel de glucosa sanguínea, presenta limitantes, sobre todo cuando se presenta una resistencia a la insulina y en poblaciones jóvenes o sin síntomas evidentes. Además, una medición puntual de los niveles de glucosa es necesaria pero no suficiente para revelar el estado de salud del paciente y se requiere también de un seguimiento a corto, mediano o largo plazo según los casos [9]. Además, es conveniente que el médico pueda realizar pruebas de medición de niveles de glucosa y de insulina en la sangre en paralelo, en intervalos diferentes. Cuando se logra esta medición en paralelo, se puede describir con mayor precisión la condición general del paciente en un momento dado. Esa necesidad de medir la evolución temporal de los niveles de glucosa e insulina es crítica también para monitorear la evolución de la enfermedad y para analizar el impacto inmediato o a largo plazo de los tratamientos, de la dieta o del ejercicio, aplicados al paciente [7].

Una plataforma basada en microestructuras ofrece ventajas que permite la microfabricación: una resolución elevada gracias a una detección a micro escala; bajo costo, rapidez y facilidad de producción.

Las plataformas microestructuradas son actualmente fáciles de conectar con el mundo exterior con métodos de lectura remotos por computadora o dispositivos portátiles. Adicionalmente, se puede incorporar una gran cantidad de funcionalidades para realizar detección y diagnóstico acoplando estos sensores miniaturas al plasma sanguíneo, usando métodos ópticos, eléctricos o químicos. De esa manera, usando biosensores microfabricados, el médico clínico puede obtener datos relevantes en tiempo real y, mientras, se puede generar simultáneamente una base de datos que pueda ser consultada posteriormente, usando minería de datos (data-mining). Actualmente, muchos esfuerzos se concentran en el desarrollo de biosensores de alta resolución, especificidad y sensibilidad, que puedan competir con métodos convencionales más costosos.

Recientemente se han logrado avances en el desarrollo de plataformas miniaturizadas de diagnóstico y biodetección de bajo costo, alta especificidad y alta eficiencia gracias a técnicas no convencionales de microfabricación [10]. En algunos casos, la eficiencia de los dispositivos es tan relevante que puede competir con métodos convencionales maduros . En adición a lo anterior, los sistemas microfabricados pueden proporcionar otras ventajas como: su disponibilidad, facilidad de uso, costo y requerimiento de bajos volúmenes de agentes biológicos y de sangre.

Por lo tanto, aquí se propone utilizar algunas de estas técnicas de microfabricación no

convencionales para desarrollar microbiosensores analíticos que midan glucosa e insulina en paralelo. Utilizando métodos de microfabricación láser se pueden producir una gran variedad de geometrías y dispositivos según la aplicación, desarrollándose por ejemplo: microarreglos de electrodos, canales o detectores ópticos de tamaños y formas modulares para realizar estudios de sangre o tejidos biológicos in vitro utilizando volúmenes de sangre y de agente biológico o bioquímico muy reducido.

Objetivos

El objetivo principal del presente proyecto es diseñar, desarrollar e implementar un biosensor de glucosa miniaturizado e integrarlo en una plataforma de medición dual, con capacidad de detección biológica para diagnóstico y monitoreo rápido, sencillo, de bajo costo y con alta sensibilidad de la DMT2. El biosensor deberá ser fiable y ofrecer la posibilidad de monitorear glucosa e insulina de manera dual y en tiempo real con capacidad de reportar al paciente y al médico. El "biosensor" se construirá con un proceso polivalente de bajo costo, basado en técnicas de microfabricación modernas, combinando litografía suave y litografía láser; además, el tamaño reducido del biosensor permitirá: (a) utilizar cantidades reducidas de agentes biológicos, (b) detectar con precisión y especificidad las sustancias consideradas, (c) ofrecer fácil integración con los sistemas electrónicos que se desarrollarán para el procesamiento de datos (recopilación, almacenamiento y comunicación) y (d) garantizar un bajo costo de fabricación. Finalmente, todas estas características deberán hacer posible la realización de sensores tipo "*Lab-on-Chip* (laboratorio en un chip o LoC) en los cuales están integradas todas las funcionalidades necesarias a cualquier tipo de transducción (con detección óptica, eléctrica o química) y de monitoreo (sea remoto, con o sin fuentes de energía externas, etc.)

El trabajo de este proyecto gira entorno a la realización, implementación y caracterización de tres etapas necesarias al desarrollo del biosensor:

1. Cartuchos microfluídicos como soporte del sensor y vehículo de las muestras a probar, tanto para glucosa e insulina.

2. Microelectrodos de identificación por métodos bioquímicos de detección.

3. Plataforma electrónica para procesamiento, almacenamiento y comunicación.

Este cartucho microfluídico es común a los dos métodos de detección; sin embargo, para la detección de insulina se empleó un método óptico, desarrollado en el Laboratorio de Neuroendocrinología Comparada.

Objetivos específicos

El diseño, desarrollo e implementación del biosensor se divide en las siguientes tareas:

- **Tarea 1** - Establecimiento de los procesos de microfabricación, el cual incluye:
  T1.1. la revisión bibliográfica del estado del arte y de los antecedentes del grupo de trabajo en microfabricación (litografía suave, fotolitografía, litografía láser).
  T1.2. Identificación de los métodos implementables en nuestro laboratorio y de los procesos/equipos a desarrollar.
  T1.3. Diseño de los equipos y establecimiento de los protocolos: optimización del equipo

láser existente, equipo láser con cabeza óptica de equipo comercial Blu-ray, técnica de fotolitografía, técnica de litografía suave por réplica-molde.

- **Tarea 2**: Desarrollo de la zona de detección por microelectrodos:
  T2.1. Diseño de los microelectrodos para etapa de detección, considerando las limitaciones de los métodos disponibles.
  T2.2. Elección de los métodos implementables.
  T2.3. Fabricación de los microelectrodos.
  T2.4. Comparación de los resultados y decisión sobre el método a implementar.
  T2.5. Caracterización eléctrica de los microelectrodos.
  T2.6. Funcionalización de los microelectrodos con la enzima glucosa oxidasa.
  T2.7. Fabricación de los microelectrodos finales y calibración.

- **Tarea 3**: Desarrollo de la plataforma electrónica integrada:
  T3.1. Desarrollar una plataforma electrónica basada en un microcontrolador con los siguientes módulos: (a) adquisición de datos, (b) memoria para almacenamiento de datos y, (c) comunicación cableada.
  T3.2. Caracterización y validación de la plataforma con sensores comerciales.
  T3.3. Automatización y control por interface gráfica (Software) para el sensor de glucosa.
  T3.4. Desarrollo de una plataforma electrónica para el control de una plataforma mecánica para el sensor de biomoléculas.
  T3.5. Adaptación, verificación de compatibilidad y validación con el biosensor dual final.

Metas

De manera general existen 4 metas principales que deben alcanzarse al finalizar este proyecto:

1. Establecer un proceso de microfabricación adecuado.
2. Desarrollar el cartucho microfluídico para análisis de muestras con un volúmen de $\sim \mu L$.
3. Desarrollar y caracterizar la zona de detección por microelectrodos para el sensor de glucosa.
4. Desarrollar una plataforma electrónica con capacidad de adquirir datos, almacenarlos, comunicarse con una PC, base de datos, o un dispositivo inteligente.

A continuación se detalla la estructura del presente documento de tesis.

En el Capítulo 1 se presenta el estado del arte de los biosensores, una clasificación, sus componentes principales, su principio de funcionamiento y aplicaciones.

En el Capítulo 2, de describen las técnicas utilizadas para desarrollar la zona de detección del sensor de glucosa; específicamente se habla sobre el diseño, desarrollo y fabricación de microelectrodos.

En el Capítulo 3, se describe el funcionamiento del sensor de glucosa, los métodos de sensibilización de electrodos, la electrónica requerida para procesar las señales del sensor, el ensamble de dichos electrodos y las pruebas funcionales del sensor de glucosa.

En el Capítulo 4, se describe el método utilizado para medir la insulina, además se describe el funcionamiento de la plataforma propuesta y los resultados obtenidos.

Finalmente, se presentan las conclusiones y trabajo futuro.

1 — Biosensores

1.1. Introducción

Existen dos clases de sensores, clasificados según el tipo de información que sean capaces de transformar [11]:

- Físicos: Dispositivos que detectan cambios en parámetros físicos (temperatura, presión, flujo de masa, etc.).
- Químicos: Detectan cambios de pH, concentración, composición, etc..

Un sensor químico es un dispositivo capaz de transformar una información química de una muestra en una señal analítica útil [11], Los sensores químicos constan de dos componentes básicos: un sistema de reconocimiento o receptor y un transductor. El receptor reconoce selectivamente la información química presente en la muestra y la convierte de forma que pueda ser reconocida por el transductor, el cual la convierte en una señal procesable, generalmente eléctrica u óptica. Existen tres tipos de receptores:

- Físicos: cuando no hay reacciones químicas involucradas en la detección.
- Químicos: cuando la señal proviene de una reacción química.
- Biológicos: cuando el material receptor tiene una procedencia biológica, tales como: enzimas, anticuerpos (Ab, *Antibody*), Antígeno (Ag, *Antigen*), células, etc.

Un biosensor es un dispositivo que integra un receptor biológico o bioquímico y un transductor fisicoquímico [12]. El desarrollo de los biosensores ha crecido mucho en la última década y representan actualmente una de las ramas más importantes de la química analítica y de la ingeniería biotecnológica. Su principal ventaja proviene de la posibilidad de detección rápida y específica de una sustancia en un medio complejo. Difieren de los sistemas clásicos de análisis como la espectroscopia de absorción atómica y las técnicas de cromatografía en fase líquida o gaseosa por su bajo costo de producción, su tamaño y por la posibilidad ser utilizados para mediciones directas en el sitio de interés.

Un biosensor es un dispositivo analítico que consiste en tres partes individuales: un material biológico sensible, inmovilizado, el cual involucra un elemento de reconocimiento (enzima, anticuerpo, antígeno, orgánulos, DNA, células, tejidos, o moléculas inorgánicas) integrado dentro de un transductor fisicoquímico y una parte electrónica. El biosensor, convierte la información biológica en una señal medible en forma óptica, acústica, eléctrica o magnética (ver Figura 1.1) [1]. Los biosensores modernos han evolucionado a partir de la unión de distintas disciplinas como: la física, la electrónica, la química y la biología.

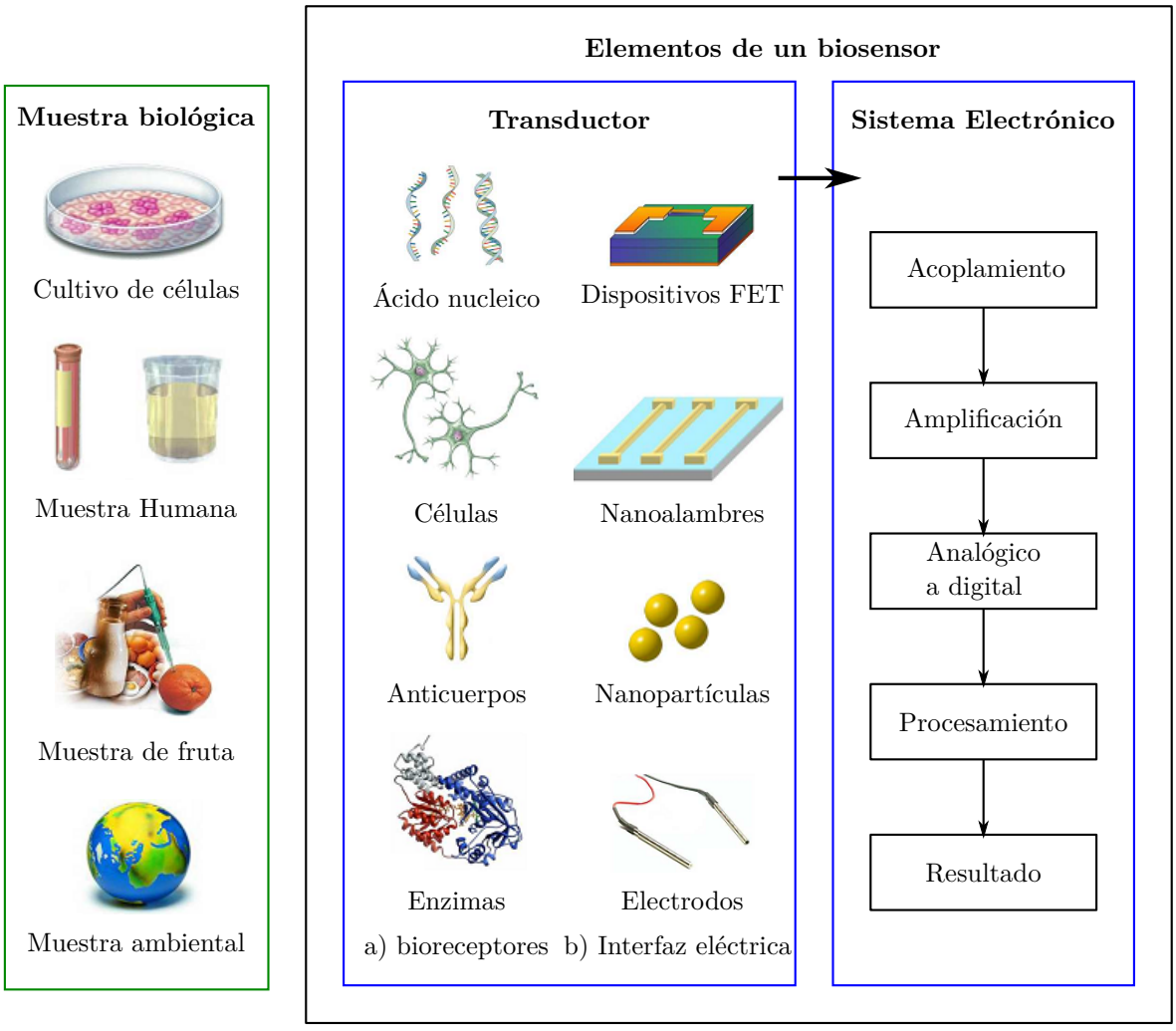


Figura 1.1: Componentes de un biosensor [1].

La tecnología de sensores inició a mediados de los 50's con Leland C. Clark Jr., quien inventó un electrodo para medir el oxígeno en la sangre de los pacientes bajo cirugía [13]. Una modificación de este sistema permitió la creación del primer dispositivo de monitoreo de glucosa. El sensor de glucosa-oxidasa es aún el más ampliamente utilizado, aunque se han agregado muchas mejoras desde 1960. Durante la década pasada, técnicas de manufactura, inicialmente desarrollada por los circuitos integrados, han hecho posible la producción de electrodos, cientos o miles de veces más pequeños, debajo de $100\mu m$ [1].

Los biosensores en el mercado representan un campo de expansión rápida, en un ritmo estimado del 60 % anual, impulsado principalmente por la industria de la salud [13], acompañada de otras áreas, tales como calidad de la comida [14] y monitoreo del ambiente [15].

Los biosensores son empleados para estudiar las interacciones entre una molécula de interés (analito) y una molécula de bioreconocimiento. La especificidad del biosensor depende del reconocimiento de las moléculas mencionadas. La sensibilidad de un biosensor depende del uso de las biomoléculas de reconocimiento, su inmovilización sobre la superficie del biosensor y del sistema de detección. Por ello, para explotar la interacción a través del bioreconocimiento, la arquitectura del biosensor también debe suprimir cualquier interacción no específica.

El sistema electrónico se utiliza para adquirir la señal del transductor, acondicionarla para procesarla, almacenarla, mostrar el resultado y comunicarla si es necesario.

Un biosensor exitoso debe cumplir con las siguientes características [1]:

- La capa de bioreconocimiento debe ser altamente específica para el propósito del análisis.
- La respuesta debe ser correcta, precisa y reproducible sobre un rango útil.
- Ser libre de ruido eléctrico.
- Si el biosensor será utilizado para monitoreo invasivo en situaciones clínicas, la prueba debe ser pequeña y biocompatible.

La sensibilidad y límite de detección (LoD, *Limit of detection*) de un biosensor determina su desempeño. El LoD es la concentración más pequeña de analito detectable con una precisión especificada o reproducible. Los biosensores tienen un curva de calibración, la cual corresponde a la respuesta que tiene a determinada concentración de analitos en una muestra. Una concentración puede ser determinada a través de una extrapolación en una gráfica de concentración vs unidad de medición, tal como se muestra en la Figura 1.2. La sensibilidad del biosensor es el cambio de concentración más pequeño que el biosensor es capaz de detectar, la cual está dada por la pendiente de la curva de calibración. El rango en el cual el sensor es sensible, se llama rango dinámico.

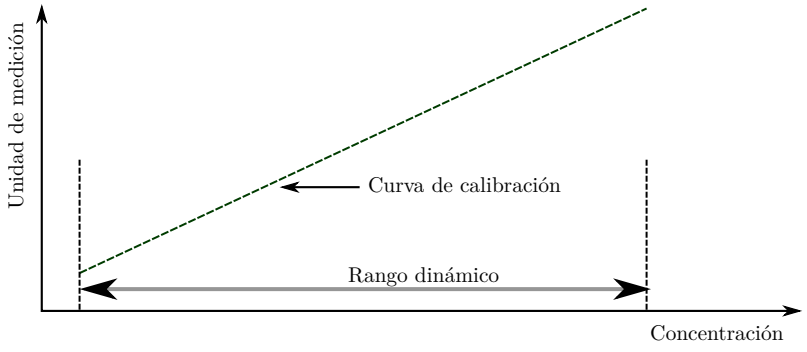


Figura 1.2: Curva de calibración de un biosensor.

1.2. Clasificación de los biosensores

La clasificación de los biosensores se puede realizar atendiendo a diferentes criterios, tales como: los receptores utilizados, la metodología para la inmovilización de dichos receptores o el tipo de transductor utilizado; este último criterio es el más utilizado [16]. Los transductores pueden ser:

- Piezoeléctricos: aquellos que transforman un cambio de masa que se da sobre el electrodo modificado, en un cambio de frecuencia de resonancia.
- Electroquímicos; aquellos que transforman una interacción electroquímica entre el analito y el electrodo en una señal eléctrica.
- Ópticos; aquellos que transforman la interacción de un analito con el receptor en una señal óptica.

1.2.1. Biosensores piezoeléctricos

El cuarzo es un cristal que experimenta el efecto piezoeléctrico, el cual tiene aplicaciones en osciladores, sensores, actuadores, etc. La relación entre el voltaje aplicado y la deformación mecánica es conocida, lo cual permite probar resonancia acústica por medios eléctricos. El fundamento teórico para el uso de la piezoelectricidad fue postulado por Raleigh en 1885, pero los hermanos Curie fueron los primeros en describir dicho fenómeno[17]. Ellos observaron que se generaba un potencial eléctrico entre dos superficies deformadas si se ejercía presión sobre las placas de cuarzo en una dirección particular. Sin embargo, el uso de dispositivos piezoeléctricos como sensores de química analítica fue hasta que Sauerbrey describió la relación frecuencia-masa [18].

Cuando un campo eléctrico oscilante se aplica a través del cristal, induce una onda acústica que se propaga a través de él. En una microbalanza de cristal de cuarzo (QCM, *Quartz Crystal Microbalance*), la onda acústica se propagará en dirección perpendicular a la superficie del cristal; para hacer esto posible, el cristal debe ser cortado en una orientación específica con respecto a los ejes del cristal [19].

Cuando se deposita una película delgada sobre la superficie del cristal cambia la frecuencia de resonancia en proporción a la masa de la película. Se alcanza una oscilación resonante cuando se incluye el cristal en un circuito de oscilación, donde las oscilaciones eléctricas y mecánicas son cercanas a la frecuencia fundamental del cristal, el cual depende del grosor de la oblea, su estructura química, su forma y su masa. El grosor del cristal determina la frecuencia de resonancia; entre más delgado es el cristal, la frecuencia de resonancia es mayor y el sensor es más sensible, sin embargo son más frágiles. Algunos factores que pueden influenciar la frecuencia de oscilación, como el grosor, la densidad y el módulo de corte del cuarzo, que son constantes, y las propiedades físicas del medio adyacente (densidad o viscosidad del aire o líquido), por lo tanto, los cambios en la frecuencia de resonancia están relacionados con la cantidad de masa acumulada sobre el cristal.

Por lo tanto, para la detección de analitos en el aire, el cambio de frecuencia esta relacionado simplemente con el cambio en la masa (ecuación 1.1).

$$\Delta f \quad \alpha \quad K\Delta m \tag{1.1}$$

Donde Δf es el cambio en la frecuencia fundamental de resonancia del cristal (f), K es una constante que se refiere a la frecuencia base del cristal ($-2.3x10^6 f^2/A$) y el área cubierta (A), Δm es la masa del material depositado.

Cuando el cristal entra en contacto con un líquido, la frecuencia de resonancia cambia debido al acoplamiento de la superficie del cristal y el líquido. La oscilación en la interfaz genera un flujo laminar plano en el líquido, el cual causa un decremento en la frecuencia proporcional a $(\rho\eta)^{1/2}$ donde: ρ y η son la densidad y la viscosidad del líquido; ρ_q y η_q, la densidad y la viscosidad del cuarzo. Por tanto, la ecuación 1.1 se puede reescribir como (ecuación 1.2):

$$\Delta f \quad = \quad f_0^{3/2} \left(\frac{\rho\eta}{\pi\eta_q\rho_q} \right)^{1/2} \tag{1.2}$$

Hay dos tipos de sensores disponibles, los de onda acústica superficial (SAW, *Surface Acustic Wave*) y cristales piezoeléctricos (PZ, *Piezoelectric*). Los dispositivos SAW pueden operar con el

principio de propagación de onda de Raleigh o como un dispositivo piezoeléctrico. El dispositivo PZ en cambio sigue la ecuación 1.1. En su nivel más simple, los dispositivos PZ se utilizan para determinar la cantidad de masa que se absorbe sobre una superficie activa. Los materiales que se inmovilizan en la superficie del cristal mediante adsorción o inmovilización química, determinan la especificidad y selectividad del sensor.

Los cristales SAW oscilan a frecuencias mayores que los cristales PZ. Teóricamente los dispositivos SAW deben ser más sensibles, sin embargo esto se ve disminuido por el requerimiento de un película muy delgada de depósito.

Una QCM mide los cambios en la masa absorbidas por unidad de superficie de un electrodo mediante la medición del cambio en la frecuencia de un resonador de cristal de cuarzo. La QCM se puede utilizar bajo vacío, en la fase gaseosa y, más recientemente, en ambientes líquidos [20, 21].

Debido a la posibilidad de medir frecuencias con alta precisión, algunos sistemas comerciales son diseñados para medir cambios de masa hasta de $100\mu g$, con una resolución de ng. Los límites de detección que se pueden alcanzar con estos cristales de cuarzo están alrededor de $10^{-9}kg$ [22]. Además de medir la frecuencia, se puede medir la disipación para ayudar al análisis. La disipación es un parámetro de cuantificación de amortiguación del sistema y se relaciona con las propiedades de visco-elasticidad de una muestra.

Los primeros biosensores piezoeléctricos, utilizados para la determinación de concentración de los correspondiente anticuerpos, fueron cristales recubiertos de antígeno [23]. Desde entonces, se ha convertido en un práctica común en biosensores el uso de anticuerpos [24, 25, 26, 27] y enzimas [28] como un recubrimiento específico para el análisis en fase líquida, por el contrario, este no ha sido el caso para el análisis en fase gaseosa.

En la fase gaseosa, algunas aplicaciones incluyen: análisis de drogas [28], sensor de olores [29, 30] y detección de explosivos [31], entre otros.

El fundamento teórico y el principio de operación de los biosensores piezoeléctricos es relativamente simple; sin embargo, es importante considerar que cuando se utiliza la forma simple de la ecuación 1.1, puede existir una diferencia entre la frecuencia de corrimiento predicha y la obtenida experimentalmente; debido a que dicha ecuación fue derivada para depósitos de película delgada monocapa. Además de los biosensores piezoeléctricos, se encuentran los sensores electroquímicos que se describen a continuación.

1.2.2. Biosensores electroquímicos

Las técnicas electroanalíticas se ocupan de la interacción entre la electricidad y la química, es decir, las mediciones de las magnitudes eléctricas, como la corriente, el potencial o la carga y su relación con los parámetros químicos [3]. El uso de tales mediciones para fines analíticos tiene una amplia gama de aplicaciones, incluyendo monitoreo ambiental, control de calidad industrial y análisis biomédico.

Los biosensores electroquímicos proveen una forma de analizar el contenido de una muestra biológica debido a la conversión directa de un evento biológico a una señal electrónica. Con ello se pueden cuantificar procesos biológicos o bioquímicos, los cuales son importantes en aplicaciones médicas y biotecnológicas. La sensibilidad del sensor depende de la geometría de la superficie, el mecanismo de transducción y las moléculas receptoras de reconocimiento. Debido a esto, se han invertido esfuerzos en la reducción de las dimensiones de los sensores para aumentar la relación señal-ruido.

El principio de funcionamiento de los biosensores electroquímicos, se basa en la detección

electroquímica de los immunoagentes o marcadores tales como enzimas, iones metálicos u otros compuestos electroactivos [32].

A diferencia de muchas mediciones químicas, que involucran soluciones homogéneas en bulto, los procesos electroquímicos tienen lugar en la interfase electrodo-solución. Los biosensores electroquímicos emplean dos tipos principales de mediciones electroanalíticas que son potenciométricos y potenciostáticos. Ambos tipos requieren al menos dos electrodos (conductores) y una solución de muestra de contacto (electrolito), que constituyen la celda electroquímica. La superficie del electrodo es, por lo tanto, una unión entre un conductor iónico y un conductor electrónico. Uno de los dos electrodos responde al analito objetivo y se denomina el electrodo de trabajo. El segundo, denominado electrodo de referencia, es de potencial constante, es decir, independiente de las propiedades de la solución. Las celdas electroquímicas pueden clasificarse como electrolíticas (cuando consumen electricidad de una fuente externa) o galvánicas (si se utilizan para producir energía eléctrica).

Las técnicas de potencial controlado (potenciostático) se ocupan del estudio de los procesos de transferencia de carga en la interfaz electrodo-solución y se basan en situaciones dinámicas, es decir, cuando existe un flujo de corriente. En estas técnicas, se utiliza el potencial del electrodo para derivar una reacción de transferencia de electrones y se mide la corriente resultante. El papel del potencial es forzar a las especies químicas a ganar o perder un electrón, es decir, a reducirse u oxidarse, respectivamente. Por consiguiente, la corriente resultante refleja la velocidad a la que los electrones se desplazan a través de la interfaz electrodo-solución. Por esta razón, las técnicas potenciostáticas pueden medir cualquier especie química que sea electroactiva, es decir, que se pueda reducir u oxidar.

A pesar de que los biosensores electroquímicos pueden utilizar una variedad de elementos de reconocimiento, utilizan predominantemente enzimas, debido a sus capacidades de unión específica y a la actividad biocatalítica. Los inmunosensores, por su parte, utilizan anticuerpos o antígenos para monitorear eventos de unión en reacciones electroquímicas.

Los biosensores electroquímicos son robustos, poseen un amplio rango de linealidad y tiempos de respuesta cortos. Los sistemas de procesamiento de señales requeridos son relativamente económicos, fáciles de manejar y de miniaturizar; y además son de uso común en la mayoría de laboratorios de análisis.

En electroquímica, la reacción bajo estudio podría generar: una corriente medible (*amperométrico*), un potencial medible o una acumulación de carga (*Potenciométrico*) o alterar las propiedades conductoras de un medio (*conductimétrico*) entre electrodos. Además, existen otras técnicas de detección como *impedimétricas*, que miden impedancia (resistencia y reactancia), y *efecto de campo*, los cuales utilizan la tecnología usada por los transistores para medir una corriente, que es el resultado de un efecto potenciométrico en la compuerta del electrodo. Entonces, existen tres grupos de transductores utilizados en los biosensores electroquímicos, según la técnica utilizada para obtener la información de la muestra: *conductimétricos*, *potenciométricos* y *amperométricos*.

1.2.2.1. Conductimétricos

Los biosensores conductimétricos, se basan en la medida del cambio de conductividad provocado por el analito, ya sea en la solución de medida o en la membrana selectiva. En este tipo de sensores la conductividad (Λ) es proporcional a la concentración de iones (C) según la ecuación 1.3.

$$\Lambda = \frac{k}{C} \tag{1.3}$$

donde: k, es la conductividad específica $[S/cm^2]$ de la solución o de la membrana selectiva; y C, la concentración de iones $[mol/cm^3]$. En este tipo de sensores, se realiza la medición de la resistividad con una señal de corriente directa (DC, *Direct Current*), sin embargo, para realizar mediciones de impedancia se utiliza, una señal de corriente alterna (AC, *Alternating Current*) [33]. La capacidad de medir impedancia posibilita el desarrollo de biosensores, en los cuales los cambios en las propiedades dieléctricas en la superficie de un electrodo puede ser detectada. La unión de analitos a elementos de afinidad inmovilizados se pueden detectar directamente sin la necesidad de marcadores. Estos cambios se pueden determinar midiendo la impedancia eléctrica [34]. Estos biosensores han sido utilizados para detectar antígenos - anticuerpos [35], proteínas [33], iones metálicos [36] y fragmentos de DNA [37]; así como para caracterizar los componentes de una muestra sanguínea humana [38] o glucosa en una muestra de sangre humana [39, 40].

1.2.2.2. Potenciométricos

Esta técnica consiste en la determinación de una diferencia de potencial eléctrico en condiciones de circuito abierto entre un electrodo de trabajo y uno de referencia; la medida de ésta diferencia se relaciona con la concentración del analito de acuerdo a la ecuación de Nersnt 1.4

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} ln \left(a_i + \Sigma_{i,j} k_{i,j}^{pot} a_j^{Z_i/Z_j} \right) \tag{1.4}$$

donde: a_i, es la actividad del ion principal; a_j, la actividad del ion interferente; Z_i y Z_j, son las cargas de los iones principal e interferente, y $k_{i,j}^{pot}$, es el coeficiente de selectividad.

Existen dos tipos de procesos que pueden conducir corrientes en una interfase electrodo-solución: en el primero, hay una transferencia directa de electrones vía una reacción de oxidación en un electrodo y, en el segundo, una reacción de reducción. A los procesos de este tipo se les llama procesos faradaicos, porque están gobernados por la ley de Faraday, la cual establece que la extensión de una reacción química que se efectúa en un electrodo es proporcional a la intensidad de corriente, llamada corriente faradaica (La reacción de 1 mol de sustancia implica un cambio de $n \times 96487C$). La corriente faradaica es una medida directa de la velocidad de la reacción redox.

Los inmunosensores potenciométricos se basan en un cambio en el potencial que se produce entre un electrodo de trabajo y uno de referencia, como resultado de la interacción específica entre un anticuerpo y su antígeno. Este tipo de sensor utiliza el efecto de la concentración sobre la relación intensidad-potencial. Esta relación depende de la velocidad a la que el analito es llevado a la superficie del electrodo (transferencia de masa) y de la cinética de la reacción de transferencia en la superficie del electrodo. Una de las principales desventajas de este tipo de detección es el cambio, en el orden de decenas de milivoltios, en el potencial que surge de la interacción entre un anticuerpo y su antígeno [32]. Por otra parte, las interferencias de la matriz de muestras, pueden prevenir que esta pequeña señal se detecte correctamente. Por lo tanto, estos sensores a menudo tienen una fiabilidad y sensibilidad comprometida.

1.2.2.3. Voltametría cíclica

La voltametría es una técnica electroquímica que se basa en la medición de la corriente que se produce en una celda electroquímica en condiciones de polarización de concentración, es decir, cuando se aplica un potencial a la celda, para hacer que una reacción tenga lugar a una velocidad apreciable. La voltametría cíclica (CV, *Cyclic Voltammetry*) es una técnica utilizada en el estudio de los procesos de oxidación y reducción en diferentes medios, de los procesos de adsorción sobre superficies y de los mecanismos de transferencia de electrones en electrodos químicos modificados [2].

En voltametría se aplica una señal de excitación de potencial variable a un electrodo de trabajo (WE, *Working Electrode*) en una celda electroquímica. Esta señal de excitación causa como respuesta una corriente característica, que es la cantidad mensurable en este método. En la Figura 1.3 se muestran las formas de cuatro de las señales de excitación más comunes en voltametría, aunque la clásica es el barrido lineal que se muestra en la Figura 1.3a, en la que el voltaje que se aplica a la celda aumenta linealmente (usualmente de $2V$ a $3V$) en función del tiempo. La corriente que se genera en la celda se registra en función del tiempo y el voltaje aplicado.

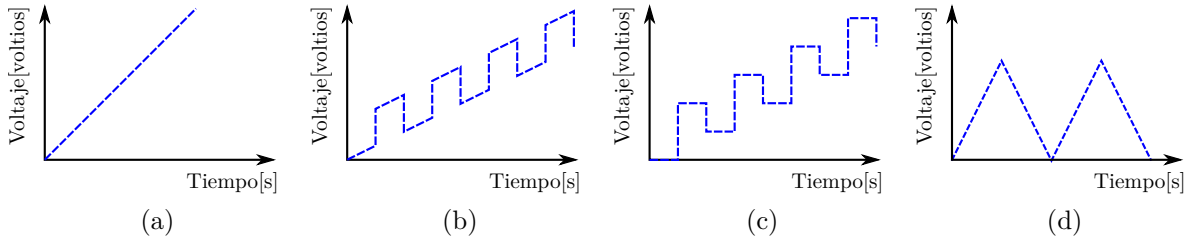


Figura 1.3: Señales de excitación en voltametría: (a) barrido lineal, (b) Pulso diferencial, (c) onda cuadrada y (d) triangular.

En la Figura 1.3(b,c) se muestran dos señales de excitación pulsados. En estos casos la corriente se mide en el tiempo de vida de dichos pulsos y se registra en función del tiempo. Con la forma de onda triangular que se muestra en la Figura 1.3d, el potencial varía en forma cíclica entre dos valores; primero aumenta hasta un máximo y después disminuye con la misma pendiente hasta su valor original. Mientras este proceso se repite, la corriente se mide y registra en función del tiempo.

En un experimento de voltametría cíclica, el potencial del electrodo de trabajo con respecto al electrodo de referencia es barrido linealmente con respecto al tiempo, mediante una señal triangular, tal como de muestra en la Figura 1.3d (Voltametría cíclica). Este proceso se conoce como tasa de muestreo y se especifica en voltios por segundo (V/s).

En una medición electroquímica típica, llevada a cabo en una celda electroquímica, se aplica un potencial de escaneo, mediante una fuente de voltaje (V_S), entre el contraelectrodo (CE, *Counter Electrode*) y el electrodo de trabajo (WE, *Working Electrode*); el potencial (E) se mide entre el *WE* y el electrodo de referencia (RE, *Reference Electrode*) con un voltímetro (V_M) y el voltaje total (V_S) se ajusta para mantener el potencial deseado en el *WE* con respecto al *RE*; y la corriente se mide entre el *WE* y el *CE* con un amperímetro (A_M), tal como se muestra en la Figura 1.4.

La Figura 1.5 muestra el diagrama electrónico de un potenciostato diseñado con amplificadores operacionales (OpAmp).

La celda consta de tres electrodos sumergidos en una solución que contiene al analito y un exceso de un electrolito no reactivo (electrolito soporte). Las dimensiones del *WE* son de tamaño

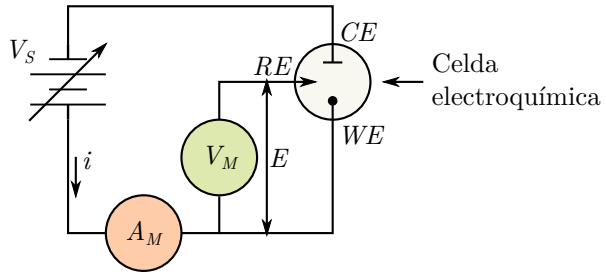


Figura 1.4: Circuito electrónico simplificado para hacer voltametría cíclica.

reducido con el objetivo de intensificar su tendencia a ser polarizado. El *RE*, por lo general, es de calomel saturado o de plata-cloruro de plata. El *CE* es a menudo una espiral de alambre de platino. La fuente de la señal es un generador de voltaje de barrido lineal (V_S), Figura 1.4, que alimenta a un circuito potenciostático similar al que se muestra en la Figura 1.5. La impedancia de entrada del OpAmp que contiene al electrodo de referencia es tan grande que a través de él no circula corriente. Por lo tanto la corriente de la fuente circula del *CE* al *WE*. Además, el circuito de control ajusta la corriente, de manera que el potencial entre el *RE* y el *WE* es idéntico al voltaje de salida del generador de señales. La corriente resultante se convierte en voltaje a través de un circuito de transimpedancia. Finalmente, este voltaje se registra a través del tiempo por el sistema de adquisición de datos y se grafica en un voltagrama, tal como se muestra en la Figura 1.6.

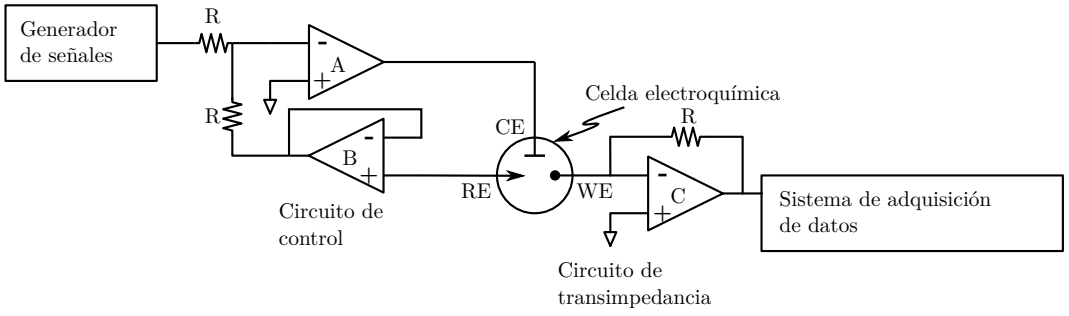


Figura 1.5: Circuito electrónico de un potenciostato.

Para obtener las mediciones necesarias y construir un voltagrama como el que se muestra en la Figura 1.6, se puede emplear el siguiente procedimiento:

- Seleccionar el potencial E para RE con respecto a WE.
- Ajustar el voltaje de la celda (CE a WE) para obtener el voltaje deseado E (Control en lazo cerrado).
- Medir la corriente (i).
- Seleccionar un nuevo voltaje (E) y repetir el procedimiento hasta que el barrido se complete. Cuando el procedimiento es un barrido simple entre dos potenciales, se conoce como voltametría de barrido lineal. Cuando el barrido se configura de tal modo que cuando se alcanza un potencial y luego el barrido es invertido, se conoce como voltametría cíclica.
- Graficar los resultados.

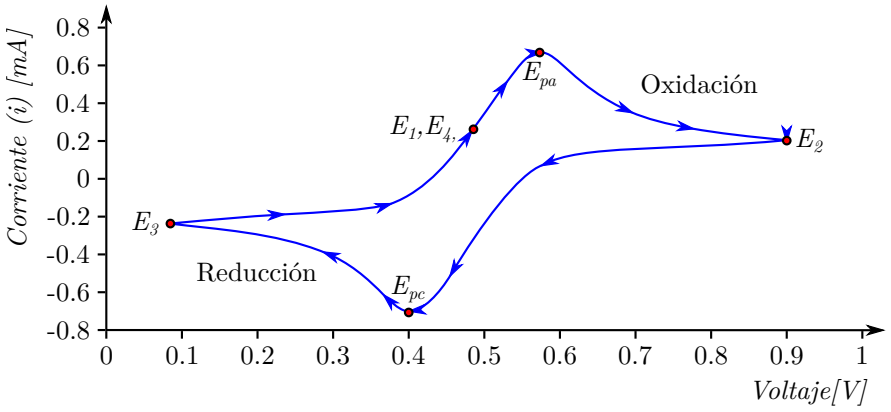


Figura 1.6: Ejemplo de voltagrama.

Una vez que el experimento se completa, se grafica la corriente i obtenida contra el voltaje, obteniendo la gráfica que se conoce como voltagrama. El ejemplo de voltagrama que se muestra en la Figura 1.6 tiene 4 vertices donde: $E1$, es el potencial de inicio; $E2$ y $E3$, potenciales de conmutación; y $E4$, potencial final. El pico de voltaje en la forma de onda son los potenciales anódicos (E_{pa}) y catódico (E_{pc}), los cuales dependen del área de contacto de los electrodos con el electrolito soporte y de la velocidad de barrido de voltaje. En este ejemplo, el escaneo inicia en $E1$ y se hace cada vez más positivo causando que la corriente anódica se incremente rápidamente hasta el pico de potencial anódico (E_{pa}). En $E2$, el potencial de escaneo conmuta a negativo para invertir el barrido. A medida que el electrodo se reduce, la corriente catódica se hace más negativa. El pico de potencial catódico ocurre en E_{pc}. En el tercer potencial, $E3$, la dirección se invierte de nuevo y el voltaje se barre hasta alcanzar $E4$. A partir de este barrido, se puede obtener y analizar información importante sobre el experimento.

Los microelectrodos se fabrican con diferentes materiales como: fibra de carbono, platino, oro y plata. El material de dichos electrodos se elige de manera que permitan la reacción electroquímica, sin participar en el proceso, por lo que generalmente se eligen materiales inertes. Además, si tienen forma de alambre o fibra, se les pueden incorporar otros materiales.

Una de las características principales que debe presentar un electrodo de referencia, es que sea no polarizable, es decir, que su potencial no se vea alterado como consecuencia de los cambios en la interfase, debido al paso de una corriente apreciable.

Uno de los electrodos de referencia muy empleado es el electrodo de plata-cloruro de plata ($Ag/AgCl$), el cual se puede preparar utilizando un alambre de plata puro, sobre el cual se realiza un depósito electrolítico de $AgCl$, por un tiempo de 10 minutos, en una solución Cloruro de potasio(KCl) o ácido clorhídrico (HCl) 0.1 M. Otra forma de prepararlo es a través de la reducción de óxido de plata (AgO) en un horno, a partir de una pasta húmeda de este óxido que recubre un alambre de Platino(Pt), tal como se preparan los electrodos comerciales. este procedimiento es considerado el más adecuado para la preparación de este tipo de electrodos.

Los electrodos de trabajo pueden ser de carbono vítreo, pasta de carbono, oro, cobre, níquel, platino u otro material.

De manera general, los electrodos se eligen según la aplicación en la que se requieran, considerando la composición de la solución a la que son expuestos y el intervalo de potenciales

que se espera obtener de la reacción. Así, por ejemplo, para medir glucosa se pueden emplear electrodos de oro, plata, plata-cloruro de plata, platino, carbón, u otro material que no participe en la reacción electroquímica, es decir un material inerte. La glucosa se oxida a un potencial de $0.7V$ y por lo tanto la celda (en este caso la muestra entre los electrodos) estará expuesta a un potencial similar.

1.2.2.4. Amperométricos

Los biosensores amperométricos basan su funcionamiento en la medición de una corriente eléctrica, producida por intercambios electrónicos entre el sistema biológico y un electrodo mantenido a un potencial constante. La amperometría es una técnica en la que se registra una corriente en función de la concentración de un analito en una muestra.

Los biosensores amperométricos emplean electrodos con enzimas inmovilizadas en su superficie, lo cual los hace selectivos. Sin embargo, su buen funcionamiento depende en gran medida de la inmovilización de la enzima, por ello dicha inmovilización debe permitir un íntimo contacto entre la enzima y el transductor, manteniendo inalterable, en medida de lo posible, la estabilidad de dicho sistema de reconocimiento biológico. Los métodos de inmovilización de enzimas comprenden métodos físicos, fundamentalmente por adsorción o por atrapamiento, y métodos químicos, ya sea mediante una unión covalente o por entrecruzamiento (crosslinking) [41].

Los biosensores amperométricos emplean generalmente un par de electrodos, uno de trabajo y otro de referencia. En el electrodo de trabajo se produce una corriente eléctrica y la respuesta del sistema es monitoreada a medida que el analito se deposita sobre este electrodo, debido a que la señal de respuesta cambia. La corriente producida por la oxidación o reducción de especies de analito electroactivos en una superficie del electrodo se monitorea en condiciones controladas. La magnitud de la corriente es luego relacionada con la cantidad de analito presente [32].

Los biosensores amperométricos emplean un potencial controlado (señal de voltaje de corriente directa) para obtener una respuesta de corriente que está relacionada con la concentración del analito de interés. Este objetivo se logra mediante el monitoreo de la transferencia de electrones durante el proceso Reducción-Oxidación (redox) del analito (Figura 1.7).

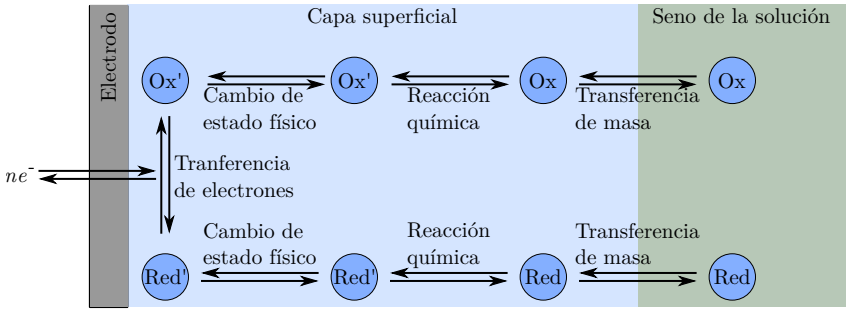


Figura 1.7: Proceso de reducción-oxidación [2].

En la Figura 1.7 se representan tres regiones de una semicelda electroquímica, las cuales incluyen: el electrodo, una capa superficial de la solución adyacente al electrodo y el seno de la solución o solución en bulto. Cualquiera de las etapas intermedias mostradas en esta figura podrían limitar la velocidad de la reacción global y la magnitud de la corriente. La transferencia de masa, involucra el movimiento de la forma oxidada (Ox) y reducida (Red) desde el seno de

la solución hacia la capa superficial y viceversa. Algunas reacciones de semicelda son precedidas por una reacción química intermedia en la cual se forman especies Ox' o Red', que participan en el proceso de transferencia de electrones.

En una reacción redox, cuando una especie cede electrones se dice que se oxida; y cuando gana electrones, se reduce, tal como se muestra en la ecuación 1.5.

$$O + ne^- \rightleftharpoons R \tag{1.5}$$

donde O y R, representan las formas oxidadas y reducidas de la pareja redox; ne^-, una cantidad (n) de electrones (e^-). Tal reacción ocurrirá en una región de potencial que hace que la transferencia de electrones sea termodinámicamente o cinéticamente favorable. Para los sistemas controlados por las leyes de la termodinámica, el potencial del electrodo puede utilizarse para establecer la concentración de las especies electroactivas en la superficie ($C_O(0,t)$ y $C_R(0,t)$) según la ecuación de Nernst (1.6).

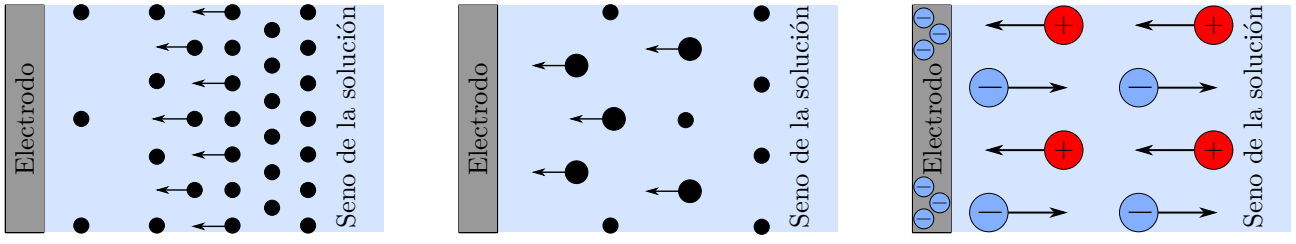
$$E = E^O + \frac{2.3RT}{nF} log \frac{C_O(0,t)}{C_R(0,t)} \tag{1.6}$$

Donde: E^O, es el potencial estándar para la reacción redox; $R = 8.314 JK^{-1}mol^{-1}$, la constante de gas universal; T, la temperatura en grados Kelvin; n, el número de electrones transferidos en la reacción y; $F = 96487C$, la constante de Faraday.

La concentración de analitos en la capa superficial del electrodo (concentración de equilibrio), está determinada por el potencial del electrodo (ecuación 1.6). Sin embargo, tal concentración es generalmente distinta de la del seno de la solución, lo cual se debe a que, aún cuando el equilibrio en la superficie del electrodo se alcanza de manera instantánea, la consecución del equilibrio entre el electrodo y la solución requiere de un tiempo mayor (generalmente de minutos).

En un proceso de reducción-oxidación tienen lugar algunas etapas como: el transporte de masa de las especies electroactivas a la superficie del electrodo, la transferencia de electrones a través de la interfase y el transporte del producto a la solución en bulto. La velocidad neta de la reacción, y por lo tanto la corriente medida, puede ser limitada por el transporte de masa del reactivo o por la velocidad de transferencia de electrones. El proceso más lento será el determinante de la velocidad, además, la velocidad también puede depender del potencial empleado en el experimento. Cuando la reacción global es controlada únicamente por la velocidad a la que las especies electroactivas alcanzan la superficie, se dice que la corriente está limitada por el transporte de masas.

El transporte de masas ocurre de tres formas distintas (Figura 1.8).



(a) (b) (c)

Figura 1.8: Tres formas de transporte de masa (a) difusión, (b) convección y (c) migración [3].

- *Difussión*: Movimiento espontáneo bajo la influencia del gradiente de concentración, desde regiones de concentración alta a regiones de concentración baja (Figura 1.8a).

- *Convección*: Movimiento físico asociado con la agitación, el flujo de la solución, la rotación o vibración del electrodo. La convección también puede ocurrir naturalmente como resultado de los gradientes de densidad (Figura 1.8b).

- *Migración*: Movimiento de partículas cargadas a lo largo de un campo eléctrico, es decir, donde la carga es llevada a través de la solución por iones (Figura 1.8c).

El flujo (J), una medida de la velocidad del transporte de masa en un punto fijo, se define como el número de moléculas que penetran en una unidad de área en un plano imagnario en una unidad de tiempo y se expresa en unidades de $[mol \cdot cm^2 \cdot s^{-}1]$. El flujo al electrodo se describe matemáticamente por una ecuación diferencial, conocida como la ecuación de Nernst-Planck (1.7), dada aquí para una dimensión.

$$J(x,t) = -D\frac{\partial C(x,t)}{\partial x} - \frac{zFDC}{RT}\frac{\partial \phi(x,t)}{\partial x} + C(x,t)V(x,t) \tag{1.7}$$

Donde: D es el coeficiente de difusión (cm^2/s); $\partial C(x,t)/\partial x$, el gradiente de concentración a una distancia x en un tiempo t; $\partial \phi(x,t)/\partial x$, el gradiente de potencial; z y C, la carga y la concentración de las especies electroactivas; $V(x,t)$, la velocidad hidrodinámica en la dirección x; R, la constante de gas universal; T, la temperatura en grados Kelvin; y F, la constante de Faraday. En un medio acuoso, D está en al rango de 10^{-5} y 10^{-6} $[cm^2/s]$. La corriente i, es directamente proporcional al flujo y al área superficial (A) del electrodo (ecuación 1.8).

$$i = -nFAJ \tag{1.8}$$

Tal como se indica en la ecuación 1.7, la situación es compleja cuando los tres modos de transporte ocurren de manera simultánea, por ello, es complicado relacionar la corriente a la concentración de analito. Esto puede simplificarse suprimiendo la electromigración mediante la adición de un exceso de sal inerte. Esta adición de una alta concentración del electrólito de soporte (en comparación con la concentración de iones electroactivos) ayuda a reducir el campo eléctrico aumentando la conductividad de la solución. Los efectos de convección se pueden eliminar usando una solución quiescente. En ausencia de efectos de migración y convección, el movimiento de las especies electroactivas está limitado por la difusión. La reacción que ocurre en la superficie del electrodo genera un gradiente de concentración adyacente a la superficie, que a su vez da lugar a un flujo de difusión. Las ecuaciones que rigen los procesos de difusión son, por lo tanto, relevantes para muchos procedimientos electroanalíticos.

De acuerdo con la primera ley de Fick (1.9), la velocidad de difusión (el flujo) es directamente proporcional a la pendiente del gradiente de concentración.

$$J(x,t) = -D\frac{\partial C(x,t)}{\partial x} \tag{1.9}$$

Combinando las ecuaciones 1.8 y 1.9 se tiene una expresión general para la respuesta en corriente (ecuación 1.10)

$$i = -nFAD\frac{\partial C(x,t)}{\partial x} \tag{1.10}$$

Por lo tanto, la corriente es proporcional al gradiente de concentración de las especies electroactivas. Como se indica por las ecuaciones anteriores, el flujo de difusión depende del tiempo. Tal dependencia es descrita por la segunda ley de Fick (para la difusión lineal) (1.11):

$$\frac{\partial C(x,t)}{\partial t} = D\frac{\partial^2(C(x,t))}{\partial x^2} \tag{1.11}$$

Esta ecuación refleja la velocidad de cambio de la concentración con respecto al tiempo entre planos paralelos en los puntos x y $x + dx$, que es igual a la diferencia de flujo en los dos planos. La segunda ley de Fick es válida para las condiciones asumidas, es decir, planos paralelos entre sí y perpendiculares a la dirección de difusión, específicamente, condiciones de difusión lineal. En general, las leyes de Fick describen el flujo y la concentración de las especies electroactivas como funciones de posición y tiempo.

En el caso del presente trabajo, se utilizaron electrodos con una geometría cuadrada y, cuando estos se ensamblaron, se formaron dos electrodos paralelos, entre los cuales se formo un canal para el transporte de la muestra; estos detalles se muestran en el capítulo 3.

Debido a que en los sensores amperométricos se monitorea la corriente producida por el proceso redox mencionado, estos se pueden interconectar mediante un amplificador operacional, en una configuración conocida como transimpedancia. En el circuito empleado en el presente trabajo, se aplica una diferencia de potencial al electrodo de trabajo ($\sim 0.7V$), para ayudar a transportar el reactivo a la superficie del electrodo, ya que la difusión, convección o migración son insuficientes, además, favorece el proceso de oxidación-reducción. De esta manera las señales de corriente se pueden transformar en una señal de voltaje y pueden ser leídas y procesadas mediante algún microcontrolador comercial.

Los biosensores amperométricos son robustos y fáciles de miniaturizar, por lo que se pueden emplear volúmenes de muestra en el orden de los μL; además, pueden ser empleados en biofluidos turbios con compuestos ópticamente absorbentes y fluorescentes, proporcionando así una oportunidad para analizar mezclas con diversos componentes, tales como fluidos biológicos para el diagnóstico de enfermedades o monitoreo del estado de pacientes. A pesar de estas ventajas, los biosensores amperométricos tienen baja estabilidad, baja relación señal-ruido, rango dinámico limitado, y no permiten la identificación única de respuesta con el evento bioquímico [1].

1.2.2.5. Espectroscopia de impedancia electroquímica

Como se mencionó en las secciones anteriores, los biosensores voltamétricos y amperométricos miden la corriente en un electrodo como función del potencial o voltaje aplicado al electrodo-solución; estos métodos emplean una señal de voltaje de corriente directa. En contraste, los biosensores de impedancia miden el cambio de la impedancia eléctrica en una interfaz electrodo-solución empleando señales de corriente alterna [42].

La espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS, *Electrochemical Impedance Spectroscopy*) se basa en la determinación de los cambios de impedancia mediante el empleo de una señal de voltaje de AC a una frecuencia fija y la medición de la corriente resultante. Este proceso se repite para distintas frecuencias. La relación voltaje-corriente proporciona la impedancia [43]. La señal de voltaje empleada, es una onda sinusoidal de AC con amplitudes que pueden estar entre (5 mV_{pp} a 2 V_{pp}) sobrepuesta en un potencial de DC. La señal de CA escanea el dominio de la frecuencia, permitiendo la excitación individual de los diferentes procesos con diferentes constantes de tiempo. Por lo tanto, los procesos lentos como reacciones químicas y procesos rápidos como conducción iónica se pueden estudiar de forma independiente de esta manera.

El espectro de impedancias se analiza utilizando un modelo equivalente de circuito eléctrico que incluye capacitores (C), inductores (L) y resistores (R). La impedancia es un término que

describe la resistencia eléctrica de un circuito en corriente alterna y se define por la razón entre la magnitud de la señal de potencial eléctrico alterno y la magnitud de la señal de corriente alterna, y el ángulo de fase, tal como se muestra en la ecuación 1.12.

$$Z = V/I \tag{1.12}$$

donde: Z, es la impedancia $[\Omega]$; $V = \Delta V sen(\omega t)$, es valor instantáneo del potencial eléctrico $[V]$; $I = \Delta I sen(\omega t + \phi)$, es valor instantáneo de la corriente eléctrica $[A]$; ΔE y ΔI , son la amplitud máxima y $\omega = 2\pi f$, es la frecuencia angular.

La EIS es una técnica que permite detectar cambios, en un medio líquido y/o en la superficie del electrodo, que pueden estar relacionados con varios fenómenos, tales como: un cambio en la concentración de la muestra, un reconocimiento selectivo u otros eventos que pueden ser difíciles de observar. Además, se puede utilizar para caracterizar propiedades eléctricas intrínsecas de cualquier material o solución y su interfaz [44]. El análisis de la impedancia del sistema observado como una función de la frecuencia y la amplitud de la señal de excitación, proporciona información cuantitativa acerca de la conductancia, la constante dieléctrica y las propiedades estáticas de las interfaces de un sistema, y su cambio dinámico debido a fenómenos de absorción o el cambio de transferencia.

Muchos sensores de afinidad utilizan un sonda de captura que se une a la molécula de interés, es decir el analito, de manera selectiva. Por lo tanto, si en la interfaz electrodo-solución, la impedancia cambia debido a dicha captura, se puede asociar dicho cambio de impedancia a la concentración de analitos en dicha solución.

Algunos sensores miden el cambio de capacitancia en la interfaz electrodo solución, el cual se debe al cambio del espesor y/o comportamiento dieléctrico debido a la unión entre el analito y la capa de biorreconocimiento. Por lo tanto, la unión entre el analito y el elemento de afinidad inmovilizado puede ser detectado sin marcador o mediante alguna reacción, realizando mediciones de la capacitancia eléctrica o impedancia con un electrodo o un arreglo de electrodos, tal como se muestra en la Figura 1.9.

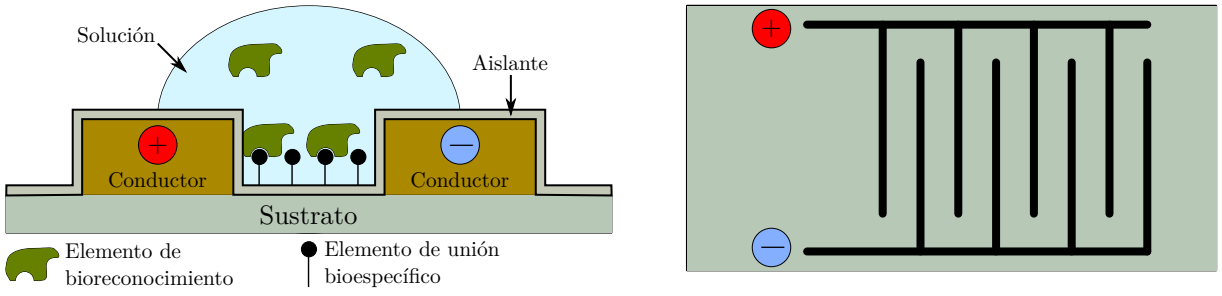


Figura 1.9: Biosensor capacitivo (a) sección transversal y (b) electrodo interdigitado.

En la terminología electroquímica, un proceso faradaico es aquel en el que la carga se transfiere a través de una interfaz, sin embargo, las corrientes transitorias pueden fluir sin transferencia de carga en procesos no farádicos (por ejemplo, cargando un condensador). En EIS farádica, una especie redox se oxida y se reduce alternativamente mediante la transferencia de un electrón hacia y desde el electrodo. Por lo tanto, la EIS farádica requiere la adición de una especie redox activa y condiciones de polarización de DC. En contraste, no se requiere reactivo adicional para la EIS no farádica. El término biosensor capacitivo se asigna habitualmente a un sensor basado en un esquema no farádico [45].

En la medición de capacitancia se emplean dos configuraciones de electrodos. La primera configuración consiste en electrodos interdigitados, en el cuál se realizan mediciones del cambio en la capacitancia entre dos electrodos con un elemento de reconocimiento inmovilizado entre ellos (Figura 1.9). La otra configuración, consiste en medir mediante el uso de un potenciostato, es decir electrodos inmersos en un electrolito tal como se hace en voltametría cíclica (Subsección 1.2.2.3), con un elemento de reconocimiento inmovilizado en la superficie del electrodo de trabajo [34]. La configuración que se muestra en la Figura 1.9 puede ser utilizada para medición de impedancia. En dichos biosensores, la impedancia se ajusta a un modelo eléctrico de una resistencia-capacitor (ver [42]).

Los biosensores de impedancia requieren un mínimo de dos electrodos. El electrodo de trabajo es usualmente sensibilizado y el electrodo de referencia o contraelectrodo es usualmente mantenido a un potencial fijo, pero se puede emplear dicho método para un arreglo de microelectrodos [46].

La inmovilización de biomateriales tales como enzimas, antígeno/anticuerpo o DNA en la superficie de los electrodos altera la capacidad de transferencia electrones. Esto permite el análisis de espectroscopia de impedancia de dichos cambios en la superficie del electrodo debido a bioreconocimiento. Basado en este principio se han desarrollado biosensores de impedancia sensibilizados con enzimas para medir urea e inmunoglobulina G [47], glucosa utilizando glucosa oxidasa [39]; detección de proteínas [48, 49], entre otros ejemplos.

La espectroscopia de impedancia electroquímica permite la detección de analitos sin marcadores, debido al cambio de las propiedades eléctricas en la superficie del electrodo; sin embargo, el uso de marcadores hace específico y selectivo a un sensor, por ello la mayoría de los sensores utilizan marcadores. La principal ventaja de los sensores sin marcador es el monitoreo en tiempo real, lo que generalmente no es posible con sensores con marcador, debido a que las mediciones de impedancia se llevan a cabo una vez que el equilibrio ha sido alcanzado [45].

Los sensores de impedancia se pueden interconectar mediante sistemas electrónicos tales como amplificadores de instrumentación, circuitos integrados generadores de funciones y microcontroladores comerciales, para el procesamiento de las señales. Esto permite diseñar aplicaciones con un tamaño de instrumento pequeño y un costo relativamente bajo.

La principal limitación en la fabricación de biosensores electroquímicos se debe a la inmovilización de biomoléculas en la superficie del transductor. Idealmente, esta inmovilización debe ser perfectamente irreversible y estable en el tiempo, sin desactivar la biomolécula y preservando una excelente accesibilidad a ella, permitiéndole cierta movilidad conformacional para permitirle su actividad biocatalítica.

1.2.3. Biosensores ópticos

Los biosensores ópticos son una herramienta de análisis con una variedad de aplicaciones en la investigación biomédica, la salud, la industria farmaceútica y el monitoreo ambiental, entre otras. Estos sensores son inmunes a la interferencia electromagnética y capaz de realizar detección multiplexada en el mismo dispositivo. De manera general, existen dos métodos que se emplean en estos sensores: el primero de ellos consiste en la detección basada en fluorescencia y el segundo, en una detección sin marcadores.

En la detección basada en fluorescencia tanto el analito como la molécula de bioreconocimiento están marcados con tintes o colorantes. La intensidad de la fluorescencia indica la presencia del analito y la intensidad de la interacción entre el analito y las moléculas de bioreconocimiento. Aunque la detección basada en fluorescencia es muy sensible, con un límite de detección de

hasta de una sola molécula [50], el proceso de marcado es laborioso y puede interferir con la función de la biomolécula. Además, el analisis cuantitativo presenta un reto debido a que no pueden colocarse de manera controlada, el mismo número de fluoróforos en cada molécula [51].

En contraste, en la detección sin marcadores, los analitos no están marcados o alterados y son detectados en su forma natural. Este tipo de detección es relativamente fácil y económico de realizar y además permite una medición cuantitativa de la interacción molecular. Adicionalmente, algunas mediciones sin marcadores miden el cambio de índice de refracción (RI, *refractive index*) inducido por las interacciones moleculares, el cual se relaciona con la concentración de analitos. Los sensores ópticos sin marcadores incluyen métodos que miden el índice de refracción, la absorción óptica y la espectroscopía raman. Los sensores que se basan en la medición del índice de refracción pueden detectar el índice de refracción de la solución debido al cambio inducido por la unión entre moléculas.

En la Figura 1.10 se muestra un diagrama conceptual del biosensor óptico, en donde se emplea una molécula de bioreconocimiento tal como un anticuerpo. Los analitos que se encuentran en la solución buffer se unen a la molécula de bioreconocimiento de la capa superficial entre el sustrato y la solución, lo cual cambia el índice de refracción en la superficie del sensor, que puede ser detectado opticamente como una señal de transducción de sensado. En la mayoria de los sensores ópticos, la luz de sensado se localiza en la superficie del sensor, con un campo evanescente que decae en la solución.

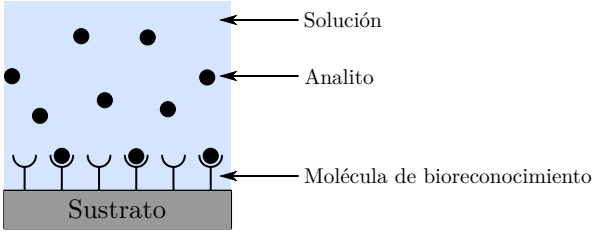


Figura 1.10: Biosensor óptico sin marcador.

Existen distintos arreglos propuestos para los biosensores ópticos sin marcadores, los cuales incluyen sensores basados en: (1) resonancia de plasmón superficial, (2) interferometría, (3) guía de onda óptica, (4) resonadores de anillo, (5) fibra óptica y (6) cristal fotónico.

1.2.3.1. Resonancia de plasmón superficial

Los biosensores de resonancia de plasmón superficial (SPR, *Surface Plasmon Resonance*) fueron empleados primeramente en 1983 [52], desde entonces esta técnica se ha convertido en una herramienta para el estudio de las interacciones entre moléculas de bioreconocimiento y analitos. Algunos trabajos describen de manera más extensa este método.

Los metales, además de reflejar la luz, tienen una propiedad óptica menos conocida; bajo ciertas condiciones la luz puede viajar sobre la superficies metálicas. Esta onda electromagnética involucra a los electrones libres en los metales. Rufus Ritichie descubrió éstas ondas en los años 50 del siglo pasado [53].

Una SPR es una oscilación de densidad de carga que ocurre en la interfaz de dos medios con constantes dieléctricas de signos opuestos, tal como un metal (oro o plata) y un dieléctrico [54]. Los plasmones son explicados clásicamente usando el modelo de Drude de los metales. El metal es tratado como un cristal tridimensional de iones positivos, junto a un gas de electrones deslocalizado que se mueve en esta red de iones que forman un potencial periódico [55].

En un metal, la luz es reflejada cuando la frecuencia es inferior a la frecuencia de plasma, debido a que los electrones en el metal apantallan el campo eléctrico incidente. La luz de frecuencia superior a la frecuencia de plasma es transmitida, debido a que los electrones del metal no pueden responder tan rápidamente para poder apantallar el campo. En la mayoría de los metales, la frecuencia de plasma está en el ultravioleta, haciéndolos reflectivos en el rango de la luz visible. Algunos metales, como lo es el cobre o el oro, presentan transiciones electrónicas de bandas en el rango visible, por lo cuál algunas longitudes de onda del visible son absorbidas, emitiendo su color característico [55].

Existen algunos métodos para empleados en la SPR, tales como el acoplamiento con un prisma (Figura 1.11), una guía de onda, una fibra óptica o con una rejilla.

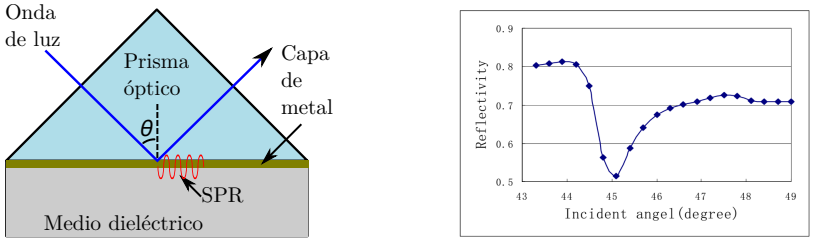


Figura 1.11: SPR utilizando acomplamiento con un (a) prisma y (b) gráfica del ángulo θ vs reflectividad.

En la configuración de acoplamiento con prisma, la luz incidente es totalmente reflejada en la interfaz prisma-metal y genera un campo evanescente que penetra en la capa de metal, con una intensidad que decae exponencialmente a cero. La luz polarizada que se filtra sobre la superficie de la película de metal, excitará la oscilación de los electrones confinados en ella. La Resonancia de plasmón superficial se produce en la interfaz recubierta de metal cuando el vector de onda de la luz incidente coincide con la de los plasmones de superficie en la película del metal, dando como resultado que la intensidad del haz de la luz reflejada disminuya significativamente. El ángulo incidente a partir de este momento se llama, ángulo de SPR. El ángulo de SPR, es sensible a los cambios del índice de refracción; por lo tanto, las variaciones en el índice de refracción en la superficie del sensor, inducida por la interacción entre la molécula analito objetivo y el elemento de reconocimiento biomolecular inmovilizado sobre la superficie del sensor, se pueden observar como cambios en el ángulo de resonancia [56], lo cual produce una gráfica similar a la que se muestra en la Figura 1.11b. En este caso se realizó una medición experimental de un ángulo de resonancia (45.1 grados) de un sistema de SPR [56]. En el ángulo de resonancia, la constante de propagación del campo evanescente coincide con la onda de plasmón superficial, tal como se describe en la ecuación 1.13, y como resultado el fotón se acoplará en la onda de plasmón superficial.

$$\frac{2\pi}{\lambda} n_p sin\theta = \beta_{sp} \tag{1.13}$$

donde: λ, es la longitud de onda incidente; n_p el índice de refracción del prisma; θ, el ángulo de incidencia y; β_{sp}, la constante de propagación de la onda de plasmón superficial.

El acoplamiento con prisma se ha empleado en estudios de diagnóstico, en donde el fenómeno que se presenta en la superficie de una película metálica delgada se modifica al absorber concentraciones bajas de bioagentes o pequeños cambios ambientales y permiten una detección óptica relativamente sencilla [57]. Así estos sensores se han empleado para detección de aire y gases del aliento de diferentes personas [56], y glucosa [58], entre otros.

El acoplamiento de guías de onda es una alternativa al acoplamiento de prismas. En una guía de onda, la luz se propaga mediante la reflexión total interna y genera un campo evanescente en la interfaz guía de onda-metal, lo cual excita a la onda de plasmón superficial de la misma forma que la configuración del prisma. Las fibras ópticas se emplean de una forma similar, y en este caso, se remueve una capa de la fibra y se recubre de una película de metal [59]. Además, las ondas de plasmón superficial pueden ser excitadas mediante acoplamiento de rejillas. En este caso la luz incide en una rejilla metálica. Si el momento de la luz difractada paralelo a la superficie de la rejilla, es el mismo que la constante de propagación del plasmón superficial, la luz se acoplará a la onda de plasmón superficial de la manera como se muestra en la ecuación 1.14.

$$\frac{2\pi}{\lambda} n_d sin\theta + \frac{2\pi}{\Lambda} = \pm\beta_{sp} \tag{1.14}$$

donde: n_d, es el índice de refracción del medio dieléctrico; m, un entero que representa el orden de refracción y; Λ, es el periodo de la rejilla. Con el acoplamiento de rejilla, la luz incide directamente en la superficie metálica, por lo que requiere que el fluido de muestra sea ópticamente transparente.

Entonces, la detección de analitos con SPR, se lleva a cabo mediante el monitoreo del ángulo de resonancia [60], guía de onda resonante [61] o cambio de intensidad resonante [62].

1.2.3.2. Biosensores basados en interferometría

La interferometría Mach-Zehnder (MZI, *Mach Zehnder Interferometer*), es una técnica en la que se hace viajar un haz de luz polarizado, coherente y de una sola frecuencia de un láser a través de una guía de onda, el cual se divide simétricamente en dos caminos en una Y. Uno de los caminos tiene una ventana sobre ella, lo que permite que el campo evanescente interactúe con la muestra (área del sensor) mientras que el otro camino sirve como referencia y está protegido de la muestra con una capa de revestimiento, tal como se muestra en la Figura 1.12. Los dos caminos se recombinan a la salida, lo que produce un patrón de interferencias con una variación sinusoidal que depende de la diferencia de los índices de refracción de los brazos sensor y referencia, y de la longitud de la interacción, esto se puede relacionar con la concentración del analito a medir. Un fotodetector puede emplearse para medir la intensidad.

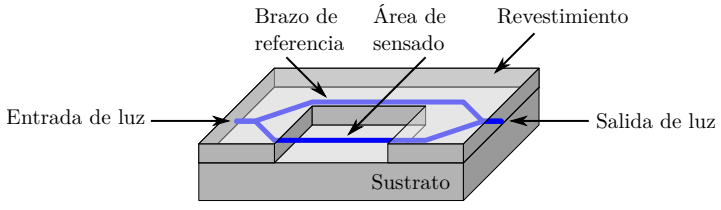


Figura 1.12: Interferómetro de Mach-Zehnder.

Generalmente, la estructura de la guía de ondas debe ser de polarización única y modo único de modo que la interferencia multimodal y de polarización cruzada no aparezcan en la salida. Cuando se lleva a cabo una reacción bioquímica en el área del sensor, el camino a través del cual luz que viaja experimentará un cambio en su índice de refracción, lo que provoca un cambio de fase óptico y un cambio en la intensidad luminosa; esto se puede medir con un fotodetector en base a la ecuación 1.15.

$$I(\Delta n_{eff}) \quad \alpha \quad cos(\Delta n_{eff}\kappa_0 L) \tag{1.15}$$

donde: Δn_{eff}, es el cambio en el índice de refracción; κ_0, la amplitud del vector de onda y; L, la distancia entre un dispositivo de carga acoplada (CCD, *Charge-Coupled Device*) que se emplea para hacer el sensado y el chip. Usualmente, incrementando la longitud entre el chip y y el CCD, incrementa la señal de sensado. Sin embargo, debido a la función coseno, el cambio de la señal en los límites máximo y mínimo no es sencillo de resolver, debido a que no es una relación lineal.

La plataforma del sensor interferométrico proporciona una referencia interna para la compensación de las fluctuaciones del índice de refracción y la absorción inespecífica. Los sensores interferométricos tienen un rango dinámico más amplio que la mayoría de los otros tipos de sensores.

El límite de detección es generalmente limitado por el ruido electrónico y mecánico, inestabilidades de la fuente de luz y el ruido químico. El MZI ha sido empleado en aplicaciones de biosensado, por ejemplo, para medir glucosa [63, 64], con un límite de detección en el índice de refracción de 10^{-5}.

Otra técnica utilizada es el interferómetro de Young (YI, *Young's interferometer*), que funciona de manera similar al MZI. En un YI, la luz de polarización única de modo único y coherente, se acopla a la guía de onda, luego se divide en un brazo de referencia y en otro de detección, pero en lugar de recombinar los brazos como en el MZI, la salida óptica de los dos brazos se combinan para formar franjas de interferencia en una pantalla de detector, tal como un CCD. En este caso, la distribución de intensidad($I(\chi)$), a través de la pantalla (χ), está dado por la ecuación 1.16

$$I(\chi) \quad = \quad 1 + cos\left(\frac{2\pi n d}{\lambda_0 f}\chi - \delta\right) \tag{1.16}$$

donde: λ_0 es la longitud de onda en el vacío; n, el índice de refracción; δ, el corrimiento de fase debido al cambio en el índice de refracción; d, la distancia entre los brazos y; f, la distancia entre la salida del YI y la pantalla. La ecuación muestra que un cambio de fase en el brazo de referencia provoca un cambio en la posición de las franjas de interferencia.

El primer sensor que mostró la viabilidad de este tipo de sensores fue empleado para medir el índice de refracción en líquidos y gases [65], en un trabajo posterior se muestra un límite de detección de 10^{-7} unidades de índice de refracción [66].

Una tercera configuración de interferometría muy similar, que se ha utilizado en biosensores, es el interferómetro de Hartman (HI, *Hartman interferometer*). En esta configuración, las moléculas de funcionalización están modeladas en tiras en la parte superior de una guía de ondas planas, la luz se acopla dentro y fuera de la guía de ondas plana usando rejillas. La óptica se coloca cerca de la salida del chip para crear interferencia entre pares de tiras funcionalizadas. Este tipo de arreglo ha sido empleado para detectar influenza y salmonela [67].

Aunque los sensores mencionados previamente tienen diferencias en su diseño, su principio de funcionamiento es similar, la onda guiada experimenta un cambio de fase a medida que su campo evanescente interactúa con la muestra, por lo tanto tienen un desempeño similar. Existe otro sensor más llamado de Interferometría de retrodispersión (BI, *Backscattering interferometry*), el cual emplea un área de monitoreo más pequeño. El primer sensor empleado, que demuestra

este concepto, utilizó un sensor con una superficie porosa de silicon, en donde tanto la superficie superior como la parte inferior del sensor poroso sirve como superficie reflectora; por lo que, cuando los analitos son capturados por las moléculas de bioreconocimiento inmovilizadas en los poros, se observa un corrimiento en la señal de interferencia. Este sensor se utilizó para medir concentraciones de DNA con un límite de detección de $2pM$ [68].

Otro ejemplo de este sensor, es un inmunoensayo de disco biológico (BioCD). En este trabajo se utilizó un disco reflectante grabado con moléculas de bioreconocimiento, tales como anticuerpos. El disco se hace girar y entonces puede ser leído mientras un rayo láser enfocado se refleja fuera de la superficie del disco y de las manchas de anticuerpos. Los bordes de las manchas biomoleculares producen una señal de interferencia. El disco se incuba con la muestra. Si los puntos de bioreconocimiento capturan a las proteínas, la señal de interferencia cambia cuando el disco se lee nuevamente después del secado. En este trabajo se logró detectar proteína con un límite de detección de $100pg/mL$ [69, 70].

1.2.3.3. Biosensores colorimétricos y fluorescentes

Existe una técnica conocida como ELISA (ELISA, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) ó ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, la cual es una técnica en la que un analito es capturado por un anticuerpo específico sobre un sustrato y posteriormente marcado con una enzima.

Existen diferentes configuraciones empleadas en el ELISA tales como: directo, indirecto, sandwich y competitivo.

El ELISA directo se lleva a cabo mediante los siguientes pasos:

- Inmovilizar un antígeno (Ag, *Antigen*) por adsorción en una base y lavar para remover las moléculas que no fueron unidas (Figura 1.13a);
- Incubar con un anticuerpo (Ab, *Antibody*) marcado con una enzima (Figura 1.13b), si los anticuerpos reaccionan con los antígenos, el complejo quedará solubilizado, luego de lavar para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado; y
- Agregar un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora y realizar la lectura visual o colorimétrica del producto final (Figura 1.13c),

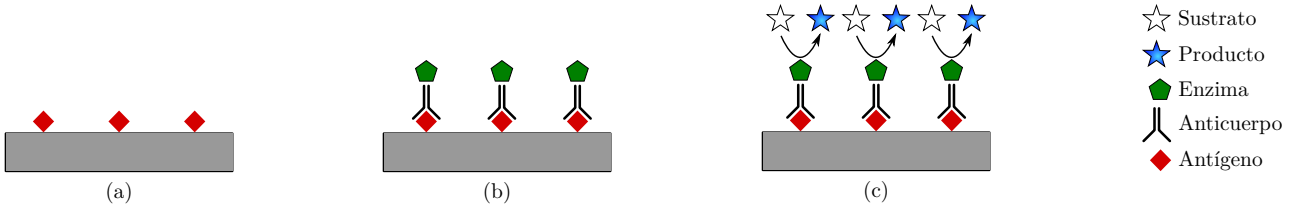


Figura 1.13: Pasos de ELISA directo: (a) inmovilización de antígeno, (b) anticuerpo marcado y (c) adición de sustrato, detección se señal y cuantificación.

En ELISA colorimétrico convencional, se genera una señal mediante la conversión del sustrato enzimático en una molécula coloreada (Figura 1.13) y se cuantifica la intensidad del color de la solución midiendo la absorbancia con un lector de placas. Aunque se puede distinguir entre solución no coloreada y coloreada a simple vista, esto sólo puede lograrse a altas concentraciones del analito, por lo tanto, hacer una inspección a simple vista es inadecuada para una detección

a bajas concentraciones. Entonces, dicho ensayo se puede incorporar como un transductor en un biosensor y hacer una detección ópticamente.

El ELISA indirecto se lleva a cabo siguiendo los siguientes pasos:

- Inmovilizar un antígeno por adsorción en una base y lavar para remover las moléculas que no fueron unidas (Figura 1.14a);
- Incubar con un anticuerpo primario (no marcado) y lavar para eliminar los anticuerpos primarios que no se hayan unido al antígeno (Figura 1.14b);
- Incubar con un anticuerpo secundario marcado con una enzima y lavar para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado (Figura 1.14c); y
- Agregar un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora y realizar la lectura visual o colorimétrica del producto final (Figura 1.14d).

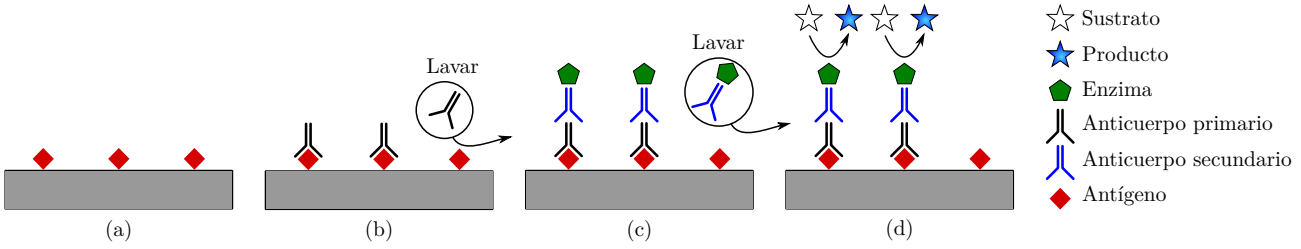


Figura 1.14: Pasos empleado en el ELISA Indirecto: (a) inmovilización de antígeno, (b) incubación de anticuerpo primario, (c) incubación de anticuerpo secundario y (d) adición de sustrato, detección se señal y cuantificación.

Para realizar el ELISA Sandwich se requiere de dos anticuerpos compatibles que reconozcan diferentes partes (epítopos) del mismo antígeno. De manera general, este método consiste en:

- Incubar el anticuerpo primario (anticuerpo de captura) en una base (Figura 1.15a);
- Inmovilizar el antígeno durante la incubación, luego los antígenos libres son removidos a través de un lavado (Figura 1.15b);
- Incubar con un anticuerpo secundario (anticuerpo de detección), marcado con una enzima y luego los anticuerpos libres son removidos con un lavado (Figura 1.15c); y
- Agregar un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora y realizar la lectura visual o colorimétrica del producto final (Figura 1.15d)

En los casos anteriores, cuanto mayor es la concentración de analitos, la intensidad de la señal es mayor.

Finalmente, cada uno de los métodos descritos anteriormente se pueden modificar para medir moléculas basándose en su capacidad para interferir con un ensayo pretitulado conocido. Dichos ensayos se pueden usar para estudiar antígenos o anticuerpos y pueden ser competitivos o inhibidores basándose en las condiciones específicas de cada ensayo. En ambos tipos de ensayos, un sistema pretitulado es desafiado con la presencia de la muestra de ensayo cuya actividad de unión se determina entonces a partir del grado de la interferencia resultante en el sistema establecido.

En ELISA por competencia se emplean los siguientes pasos:

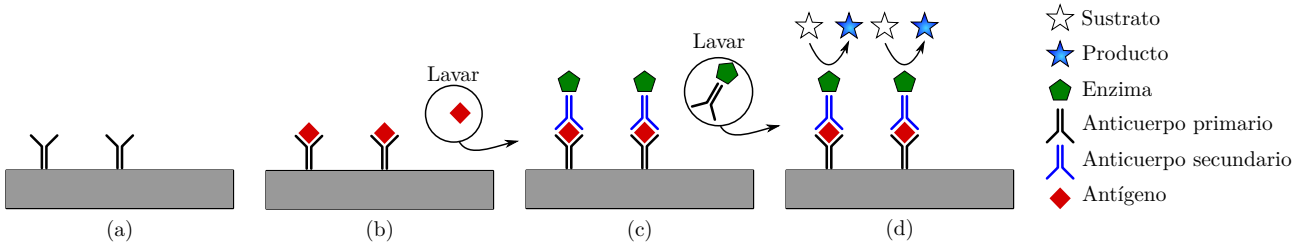


Figura 1.15: Pasos de ELISA Sandwich: (a) anticuerpo de captura inmovilizado, (b) inmovilización de antígeno, (c) anticuerpo secundario marcado y (d) adición de sustrato, detección se señal y cuantificación.

- Inmovilizar el anticuerpo primario (anticuerpo de captura) en una base (Figura 1.16a);
- Inmovilizar el antígeno marcado con enzima durante la incubación y luego los antígenos libres son removidos a través de un lavado (Figura 1.16b); y
- Agregar un sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora y realizar la lectura visual o colorimétrica del producto final (Figura 1.16c).

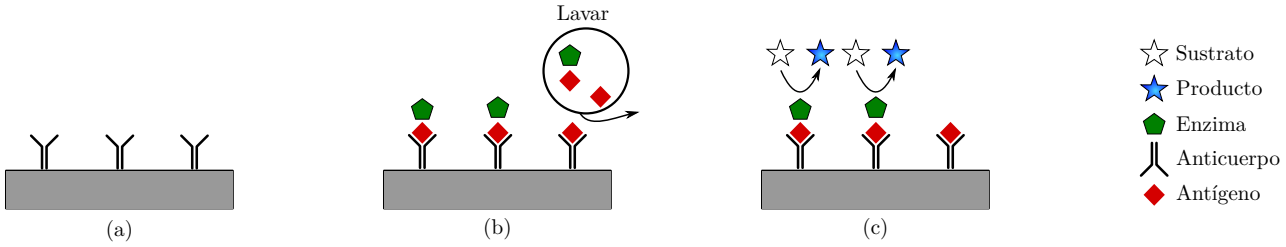


Figura 1.16: Pasos de ELISA por competencia: (a) anticuerpo de captura inmovilizado, (b) inmovilización de antígeno y antígeno marcado con enzima y (c) adición de sustrato, detección se señal y cuantificación.

En el caso de ELISA por competencia, cuanto mayor es la concentración de analitos, la intensidad de la señal es menor.

ELISA ha sido utilizada principalmente en inmunología para detectar la presencia de anticuerpos o antígenos en una muestra [71], para ver la generación de anticuerpos en un organismo, e incluso para la determinación de la constante de disociación del equilibrio de antígeno-anticuerpo en una solución [72].

Aunque existe una gran variedad de sensores y métodos empleados para la detección de un analito en particular, en la medicina se emplean algunos métodos comunes, como los que se muestran en la Tabla 1.1[73].

Tabla 1.1: Ejemplos de ensayos comunes utilizados en la medicina.

Analito	**Método de ensayo**
Glucosa	Biosensor amperométrico
Urea	Biosensor potenciométrico
Lactato	Biosensor amperométrico
Hepatitis B	Inmunoensayo quimioluminiscente
Candida albicans	Immunoensayo piezoeléctrico
Colesterol	Biosensor amperométrico
Penicilina	Biosensor potencométrico
Sodio	Electrodo de vidrio selectivo de iones
potasio	Electrodo selectivo de intercambio iónico
Calcio	Electrodo Ionóforo selectivo de iones
Oxygen	Sensor de enfriamiento fluorescente
Insulina	ELISA
pH	Electrodo de vidrio selectivo de iones

Hasta este punto se han presentado distintos métodos empleados por los biosensores para la detección de un analito; estos sensores emplean una plataforma en la que se integra una zona de detección, en la que se inmovilizan las moléculas de bioreconocimiento específico y que se puede miniaturizar empleando técnicas de fabricación convencionales que se describen en el siguiente capítulo.

2 — Miniaturizar con microtecnología

2.1. Introducción

La miniaturización de dispositivos microestructurados permite incorporar diferentes estudios en un espacio reducido utilizando volúmenes analíticos muy bajos ($\sim \mu L$) [74]. También, el panel de materiales compatibles con las técnicas a desarrollar es muy amplio, lo que facilita el desarrollo de biosensores a la medida. El grupo de Whitesides en Harvard siempre ha insistido en las ventajas de biosensores microfluídicos y han podido incorporar varios estudios de glucosa y proteínas en una sola hoja de papel pequeña [75]. En 2010 se publicó un artículo resumiendo todas las ventajas que los biosensores con microfluídica pueden presentar para los países en desarrollo (costo, eficiencia, facilidad de desarrollo y utilización, etc.) [76].

Con la miniaturización de biosensores se pueden desarrollar arreglos de electrodos, canales o guías y detectores ópticos de tamaños y formas modulares para realizar estudios utilizando cantidades reducidas de agente biológico o bioquímico ($\sim \mu L$), además de mejorar la sensibilidad de los sensores. La miniaturización permite el desarrollo de plataformas que pueden ser utilizadas para mediciones directas en el sitio de interés.

El crecimiento de la tecnología de la microelectrónica y de su miniaturización ha permitido también el desarrollo de biosensores miniaturizados. Los objetivos principales son los biosensores implantables o la asociación de varios biosensores con el fin de obtener datos de múltiples analitos simultáneamente. En particular, es posible fabricar micro-biosensores con inmovilización de biomoléculas en la superficie de un amplio rango de electrodos, como electrodos interdigitados (IDT, *Interdigitated microelectrodes*) o transistores a efecto de campo (FET, *Field-Effect Transistor*), gracias al uso de las técnicas de microfabricación.

Como se mencionó en el capítulo anterior, uno de los principales componentes de un biosensor, es el transductor (ver Figura 1.1), que consta de un bioreceptor y una interfaz eléctrica, la cual es empleada para recuperar una señal eléctrica del sensor que es procesada posteriormente. La interfaz eléctrica, electrodos, son necesarios en sensores [77, 78] y biosensores [79, 80] para obtener señales de componentes no metálicos como analitos biológicos o actividad celular. Los electrodos son utilizados típicamente en aplicaciones de voltamperometría [81, 82], amperometría [78, 83, 84, 85, 86] e impedancia [87]. Para evitar algún tipo de bioactividad en biosensores, los electrodos pueden estar hechos de materiales como: oro, acero inoxidable, platino, plata o carbón; y se preparan mediante el empleo de alguna técnica de fabricación.

Los sensores de glucosa, usualmente emplean la técnica de amperometría y al menos un par de electrodos, que pueden ser de distintos materiales. Trabajos previos han demostrado que se puede monitorear glucosa e insulina con una respuesta lineal y resoluciones respectivas de $3mM$ y $100nM$, empleando amperometría y electrodos, gracias a un dispositivo de "sensor dual"[88]. En este caso, la medición no presentaba reactividad cruzada, lo que es normalmente un problema para los dispositivos tipo "multisensor". Sin embargo, las corrientes son del orden de pA. Por lo tanto, en el presente trabajo se propone un sistema electrónico con capacidad para procesar la

información de dichos sensores, además de tener la capacidad para medir glucosa en un rango de $5mg/dL$ a $300mg/dL$ e insulina en un rango de $0.025\mu g/L$ a $1.5\mu g/L$, de manera dual y en tiempo real. El rango propuesto se debe a que dichas moléculas se pueden encontrar en fluidos como: plasma sanguíneo, saliva y orina, en tal concentración. Para miniaturizar estos sensores se emplearán algunas técnicas de microfabricación que se describen en la sección 2.2.

Como se ha descrito en el capítulo previo, los electrodos utilizados en aplicaciones de voltamperometría, amperometría e impedancia, pueden estar hechos de materiales distintos y ser preparados empleando una técnica de microfabricación. Entonces, la metodología propuesta en el presente trabajo es elaborar electrodos de la siguiente manera (Figura 2.1):

- Producir una microestructura en un sustrato mediante una técnica de microfabricación (Figura 2.1a).
- Usar la microestructura como un molde para contener un material conductor (Figura 2.1b).
- Llenar el molde con un material conductor (Figura 2.1c), y finalmente
- Obtener el microelectrodo (Figura 2.1d), tal como se muestra en la Figura 2.1.

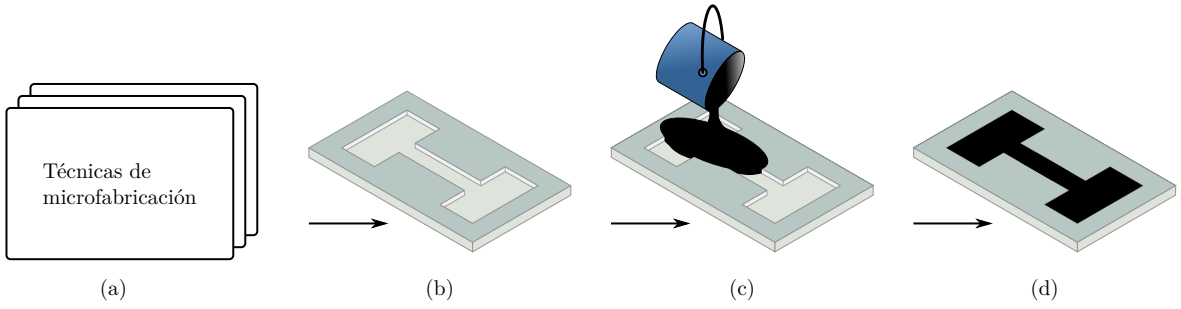


Figura 2.1: Método para fabricar electrodos; (a) técnicas de microfabricación, (b) el molde en un sustrato, (c) depósito del material conductor y (d) el electrodo.

2.2. Técnicas de microfabricación

En la actualidad existe una tendencia hacia el desarrollo de tecnología que nos permita explorar el mundo microscópico; así surgió en 1970, en Estados Unidos, lo que se denominó Sistemas Microelectromecánicos (MEMS, *Micro Electromechanical Systems*), en Europa Tecnología de Micro Sistemas (MST, *Micro Systems Technology*) ó Micro Máquinas en Japón (Micro Machines) [89].

Los MEMS surgieron como dispositivos integrados por elementos mecánicos y electrónicos, los cuales funcionaban como sensores y actuadores de tamaño micrométrico, fabricados por medio de técnicas usadas en semiconductores; *p.e.* en obleas de silicio. Estas técnicas se basan en la fotolitografía. El concepto de MEMS se ha extendido a dispositivos miniaturizados tales como sistemas: magnéticos, térmicos, fluídicos y ópticos; con o sin partes móviles, y a la utilización de otros materiales estructurales como titanio, nitruros, cerámicos, metales y polímeros [90].

La microfabricación se refiere a la tecnología que se encarga de la fabricación plana y tridimensional de estructuras y sistemas con dimensiones micrométricas [91]. La cantidad

y variedad de tecnologías disponibles para fabricar microproductos es enorme. Todas estas tecnologías se pueden clasificar en tres grandes grupos: (a) los métodos de fabricación con enfoque descendente (partiendo de una pieza inicial se obtienen piezas más pequeñas). (b) los métodos de fabricación con enfoque ascendente (partiendo de partículas pequeñas se construyen estructuras funcionales más grandes) y, (c) las tecnologías nuevas o combinación de las existentes. Sin embargo, se han publicado distintos criterios para clasificar a las tecnologías de miniaturización; por ejemplo, Marc J. Madou citó las tecnologías de miniaturización más relevantes y las organizó en técnicas convencionales (involucran litografía) y no convencionales (las cuales pueden o no incluir métodos litográficos) [92].

Los procesos basados en tecnologías de microIngeniería (MET, *MicroEngineering Technologies*) incluyen métodos que se caracterizan por la producción de componentes, moldes y superficies microestructuradas, los cuales son de gran utilidad en los biosensores, para el diseño de canales para transporte de una muestra o para el desarrollo de electrodos.

Las tecnologías de MicroIngeniería pueden ser procesos: (a) Mecánicos: micromaquinado con diamante, microfresado, microtaladrado y microrrectificado; (b) MEMS; (c) Asistidos por energía: como el maquinado por haz láser (LBM, *Laser Beam Machining*) o; (d) Métodos de réplica. Estas tecnologías se describen a continuación.

2.2.1. Fotolitografía

La fotolitografía es una derivación de la técnica general conocida como litografía. La litografía suave, complementa la etapa de transferencia del patrón dentro del proceso de fabricación de microestructuras. En este proceso, un patrón se transfiere a una resina fotosensible mediante la exposición a una fuente de luz UV a través de una máscara. La máscara, generalmente de cromo u óxido de hierro, consiste de patrones opacos sobre un soporte transparente, que se utiliza para definir las características de diseño sobre el sustrato expuesto. El material fotosensible expuesto a la luz se vuelve más soluble (resina positiva) o menos soluble (resina negativa) en una solución química [93]. La resolución del diseño en la resina depende de la resolución en el plano de la máscara, de la potencia de exposición a la luz y de la longitud de onda utilizada.

El proceso básico de la fotolitografía consiste en (Figura 2.2) [92]:

(a) *Preparar la superficie*: limpiar el sustrato, deshidratarlo y eventualmente depositar un químico que promueva la adhesión de la resina fotosensible.

(b) *Depositar el material fotosensible*: asegurando la homogeneidad de la capa y controlando el espesor (se puede aplicar un horneado suave para mejorar la adhesión al sustrato).

(c) *Alinear la máscara y exponer*: Se alinea la máscara para transferir el patrón mediante exposición del material fotosensible a la luz (potencia y el tiempo de exposición controlado).

(d) *Revelar*: Se disuelven las zonas solubles de acuerdo al tipo de resina. En esta misma etapa se aplica un segundo horneado (hard bake) para endurecer la resina fotosensible restante.

(e) *Grabar*: La superficie expuesta del dióxido de silicio se graba según el patrón deseado.

(f) *Revelar*: la resina se disuelve para revelar el patrón transferido.

El patrón transferido puede ser modificado después repitiendo el proceso. La precisión de la alineación de la máscara y el sustrato es crítica en este caso. Existen otras derivaciones de litografía, en los que se varía básicamente la fuente de luz para mejorar la resolución [92].

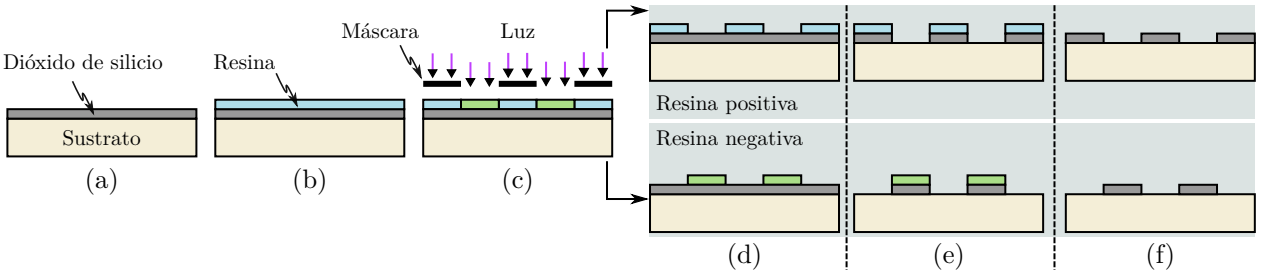


Figura 2.2: Proceso básico de la fotolitografía. (a) sustrato, (b) depósito de material fotosensible, (c) exposición, (d) revelado y (e) grabado y (f) revelado.

Con esta técnica se puede producir una estructura tridimensional, es decir un molde maestro (Figura 2.2d), que puede ser utilizada para producir réplicas mediante litografía suave, que se describe en la subsección 2.2.4. Además, con esta técnica se pueden producir estructuras con un material conductor, las cuales pueden ser usadas como electrodos, que son parte importante en un transductor de los biosensores (ver Figura 1.1).

2.2.2. MEMS

La mayoría de las técnicas de fabricación de MEMS tienen sus raíces en los métodos de fabricación estándar (litografía) desarrollados por la industria de semiconductores. Además, los materiales de fabricación utilizados en MEMS son más variados, ya que se pueden usar polímeros, cerámica, biomateriales, carbono, etc.[93]. En la Figura 2.3 se muestra el proceso básico que se utiliza para la fabricación de MEMS.



Figura 2.3: Proceso básico para la fabricación MEMS donde: (a) es la preparación del sustrato; (b) es el proceso de depósito, (c) es la transferencia del patrón, (d) es el grabado y (e) es el producto terminado.

Las películas de distintos materiales se depositan con técnicas químicas o físicas (Figura 2.3b); sus propiedades dependen de la técnica utilizada, las cuales pueden ser: deposición química por vapor (CVD, *Chemical Vapor Deposition*), deposición física por vapor (PVD, *Physical Vapor Deposition*), oxidación, electro deposición, pulverización catódica de partículas (*sputtering*) del material deseado en alto vacío y técnica de recubrimiento por giro (*spin coating*) [94].

Posterior al depósito de la película (Figura 2.3c), se realiza la transferencia del patrón diseñado mediante una etapa de fotolitografía empleando una resina fotosensible. Otra técnica utilizada para transferir el patrón en la resina o directamente sobre el material sin requerir a la fotolitografía es el grabado directo por medio de la ablación láser. La transferencia de patrón por fotolitografía es generalmente seguida por un paso de grabado, con productos químicos en estado líquido o gaseoso, con el fin de obtener una película con el patrón diseñado mediante la remoción selectiva de material sobre el sustrato. La ablación láser puede ser muy útil ya que,

si se realiza directamente sobre el sustrato, no requiere de una etapa posterior; esta técnica se describe en los siguientes párrafos.

El grabado (Figura 2.3d) puede ser superficial (*surface micromachining*) o volumétrico (*bulk micromachining*) y este último a su vez puede realizarse en seco o húmedo según el tipo de productos utilizados (*Dry/Wet etch*) [95].

Por último, se realiza la unión de sustratos ya sea para integrar múltiples funcionalidades, estructuras de mayor complejidad o para fines de empaquetado para llegar a un producto o prototipo terminado con el cual se puedan realizar las pruebas de caracterización.

Dentro de este proceso, el depósito de material, la transferencia de patrón y el grabado son tres etapas que pueden ser repetidas de acuerdo a las especificaciones del diseño y condiciones de fabricación de la estructura micrométrica [95].

2.2.3. Microfresado

El sistema de fresado es un método de fabricación que utiliza cortadores rotativos para remover material de un sustrato. Este método hace uso de software de control y programación para controlar el movimiento de los cortadores en tres dimensiones y lograr una resolución micrométrica. En la Figura 2.4 se muestra el proceso general empleado por este método que consiste en [96]: (a) preparar un diseño asistido por computadora (CAD, *Computer-aided design*); (b) utilizar una fresadora para transferir el diseño al sustrato mediante una herramienta de corte; y (c) el diseño se ha transferido en el sustrato acorde con el diseño.



(a) (b) (c)

Figura 2.4: Proceso utilizado por el microfresado: (a) diseño en computadora, (b) equipo CNC y (d) sustrato.

El sistema de fresado básico consiste en: (1) una mesa de trabajo para el posicionamiento de la pieza de trabajo, en este caso el sustrato; (2) una herramienta de corte, usualmente una fresa y; (3) un mandril para asegurar y girar la herramienta de corte.

Usualmente la mesa de trabajo lleva a cabo el movimiento en el eje X e Y y el eje Z es controlado por la herramienta de corte.

La geometría y dimensiones de las estructuras producidas por este método, dependen de la geometría y dimensiones del cortador empleado, y se pueden utilizar como: un molde maestro por el proceso de litografía suave; un molde para preparar electrodos, mediante el depósito de un material conductor en dichas estructuras; o un canal para transportar microfluídos, desde luego, para ello la estructura debe sellarse.

Además de las técnicas mencionadas existen otras técnicas, como la litografía suave y microfabricación láser, que se describen a continuación.

2.2.4. Litografía suave

La mayoría de los procesos de microfabricación comunes basados en la microelectrónica requieren de equipo especializado y preparación de máscaras de alta resolución, resultando en un proceso relativamente costoso y que consume mucho tiempo; por ello es importante desarrollar métodos que permitan realizar prototipos de manera rápida y a bajo costo [97].

Con la litografía suave se pueden producir estructuras tridimensionales con superficies bien definidas y controlables, con distintos polímeros, además de permitir el uso de materiales compatibles con aplicaciones biológicas. Esta técnica se puede utilizar para producir estructuras que puedan ser utilizadas como moldes para depositar en ellas un material conductor y producir de esta forma electrodos, los cuales son empleados por los biosensores piezoeléctricos y electroquímicos.

Existen diversas técnicas de litografía suave, por ejemplo: (a) Molde réplica (REM, *REplica Molding*), la cual permite obtener una estructura a partir de un molde maestro; (b) Impresión de microcontacto (μCP, *Micro-Contact Printing*), la cual se puede utilizar para estampar un diseño sobre algún sustrato, tal como se haría con un sello sobre una hoja de papel; (c) Estampado (hot embossing), la cual es una técnica en la que se estampa un patrón sobre un polímero que es calentado a una temperatura mayor a su temperatura de transición vítrea (Tg) [98].

La técnica de REM requiere de: (a) un molde maestro, elaborado mediante alguna de las técnicas de fabricación mencionadas; (b) emplear el molde maestro para verter, en él, el polímero con el cual se desea preparar la réplica; y (c) polimerizar para obtener una réplica del molde maestro.

En la Figura 2.5 se muestra el proceso de la técnica molde réplica propuesta y empleada en el presente trabajo, en la cual se utiliza: (a) molde maestro, hecho en un sustrato de polimetilmetacrilato (PMMA); (b) se vierte en él polímero polidimetilsiloxano (PDMS); (c) se polimeriza el PDMS, mediante el uso de un horno y se desprende el polímero curado del molde maestro obteniendo así; (d) la réplica del molde.

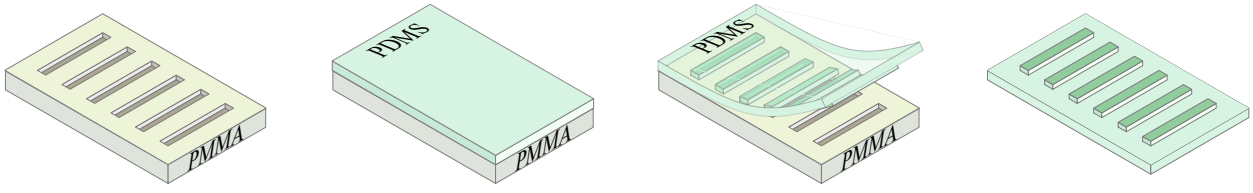


Figura 2.5: Técnica molde replica: (a) molde maestro, (b) PDMS sobre el molde maestro, (c) polimerización de PDMS y (d) molde-replica.

La principal ventaja de la litografía suave es su tiempo de desarrollo, ya que se realiza el diseño deseado y obtiene la estructura resultante en menos de 24 horas. Es un método que utiliza una gran variedad de polímeros y, por lo tanto, existen muchos materiales que se pueden utilizar[98]. Además, es una técnica de fabricación de bajo costo. Se ha convertido en una tecnología útil para una serie de aplicaciones que incluyen la biología celular, microfluídica, lab-on-a-chip y fotónica flexible [98].

Además de las técnicas mencionadas existen otros enfoques, como el de la microfabricación láser, que se describe a continuación.

2.2.5. Microfabricación láser

La aplicación de la tecnología láser en la microfabricación tiene ventajas por ser un proceso sin contacto mecánico y por facilitar la creación de prototipos sin bajar la calidad y la precisión del corte en los materiales. También ofrece la posibilidad de utilizar al láser para microfabricación local basada en la ablación (se remueve una parte del material) o bien en la sinterización (se adhiere un material a un sustrato dado por calentamiento).

La tecnología láser en la microfabricación puede ser aplicada como [91]: (a) herramienta directa por medio de la ablación, corte y adición de material o; (b) herramienta indirecta para la fabricación de máscaras para procesos litográficos y transferencia de patrones.

La microfabricación a partir de la tecnología láser aprovecha: el calor producido por la luz láser, el hecho de que el haz puede ser enfocado y la absorción de la luz por el material bajo prueba [99]; por lo tanto, es importante conocer: la longitud de onda de la luz láser empleada; la potencia eléctrica u óptica; diámetro del punto mínimo a la distancia focal (spot) y; comprender que fenómeno físico, óptico o químico ocurre durante la interacción del haz láser con el material con el que entra en contacto. Con lo dicho previamente se puede hacer el diseño de algún patrón que se desea transferir en un sustrato.

En la Figura 2.6, se muestra un diagrama de un proceso de ablación láser, en donde: (a) es el sustrato, (b) el haz láser enfocado sobre el sustrato tratado con un material absorbente, y (c) el sustrato grabado en las regiones expuestas al haz láser.

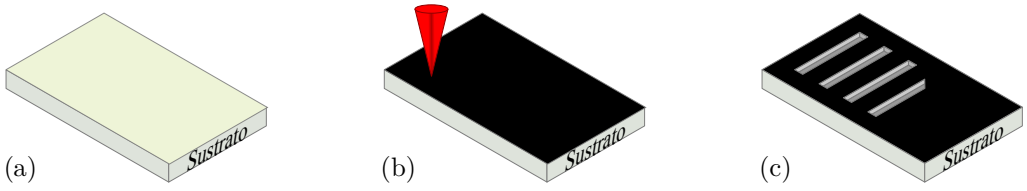


Figura 2.6: Proceso de ablación láser; (a) sustrato, (b) sustrato tratado con material absorbente y (c) sustrato grabado.

Con la aplicación de la tecnología láser en la microfabricación, se pueden obtener estructuras sobre algún sustrato, que pueden ser utilizados como un molde maestro para hacer mediante ellos réplicas o como un molde que pueda ser usado para preparar electrodos.

A continuación se presentan los métodos de microfresado, molde replica y microfabricación láser, empleados para la obtención de moldes.

2.3. Moldes

Existen distintos métodos para producir estructuras tridimensionales, que pueden ser utilizados como moldes, tales como: la fotolitografía, molde réplica y microfresado entre otros. Además, los materiales sobre los cuales son elaboradas dichas estructuras son diversos, dependiendo de la aplicación de interés. En el presente trabajo se elaboraron moldes en sustratos de PMMA y PDMS, empleando los métodos de molde-réplica, maquinado CNC y microfabricación láser.

Los materiales que se eligieron como sustratos para elaborar los micromoldes son los polímeros PDMS (SYLGARD 184 [100]) y PMMA (Plastiglas de México S.A. de C.V.). El PDMS es un polímero orgánico basado en silicio y se eligió debido a que es: biocompatible, transparente, inerte, inocuo y no inflamable; además, si se deposita sobre una superficie, se

extiende por toda la superficie y se amolda a todas las imperfecciones de esta, haciéndolo ideal para replicar estructuras a micro y nano escala [98]. El PMMA, se obtiene de la polimerización del metacrilato de metilo y se puede encontrar en el mercado en hojas de *244 x 122 cm*. El sustrato de PMMA utilizado en el presente trabajo se obtuvo, cortando una hoja de PMMA de *244 x 122 cm* y *3mm* de grosor en piezas del tamaño de un portaobjetos (*1"x 3"*) utilizando un equipo CNC. Se eligió este material por ser: biocompatible, accesible, de bajo costo, un material que se puede maquinar con CNC, y ofrecer la posibilidad de ensamblar con otra pieza de PMMA. Además, el uso de PMMA y PDMS como sustratos, nos permite ensamblar las estructuras para formar el canal de transporte de fluidos hacia la zona de detección, es decir, hacia los electrodos.

2.3.1. Molde-Réplica

Recordemos que el molde-réplica obtenido será llenado con un material conductor, por ello, la estructura del molde maestro debe ser en relieve.

En la literatura existe un método reportado en el que se emplea un termoplástico, shrinky dinks, para preparar estructuras tridimensionales con aplicaciones en microfluídica [10, 101]. Este método permite preparar prototipos de manera rápida, fácil y de bajo costo. El método mencionado consiste en el siguiente procedimiento:

- Preparar el diseño del patrón que se desea transferir en el termoplástico mediante el uso de un software de edición de imágenes, considerando que el termoplástico se encoge $\sim 60\,\%$ de su tamaño original.
- Imprimir el diseño con una impresora láser sobre la hoja del termoplástico (de 6 a 8 veces).
- Limpiar el exceso de tinta en el termoplástico con un hisopo humedecido con alcohol isopropílico y acetona (10:1).
- Recortar el diseño y colocarlo en un horno a $160°C$ durante 5 minutos.
- Retirar la pieza del horno y dejar enfriar.
- Limpiar la pieza con alcohol isopropílico.

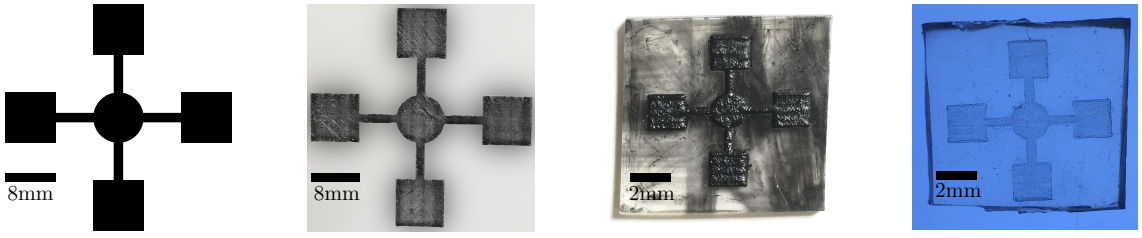
El proceso descrito previamente, permite crear una estructura en relieve, que puede ser usado como molde maestro. La preparación del molde maestro se puede hacer con diferentes técnicas de fabricación, sin embargo, por facilidad y por la reducción del tiempo empleado en dicho proceso, se eligió hacer este molde empleando el termoplástico mencionado.

En la Figura 2.7 se ilustra el procedimiento empleado por la técnica de molde-replica, en donde: (a) es el diseño hecho en un software de edición de imágenes, (b) es la impresión en la hoja del termoplástico (shrinky dinks), (c) es el termoplástico después de ser horneado y que se usa como molde maestro, (d) es la réplica en PDMS del molde maestro.

Para replicar el molde deseado se emplea el siguiente procedimiento:

- El molde se coloca en un recipiente, que pueda tolerar temperaturas mayores a $80°C$.
- Se vierte PDMS (proporción 10:1, prepolímero: agente curante, ver apéndice C) en el recipiente con el molde maestro.

- Se coloca el recipiente en una parrilla a $80°C$ durante 1 hora, para polimerizar. La temperatura puede ser mayor a $80°C$, lo importante es que el molde tolere dicha temperatura.
- Se retira el recipiente de la parrilla, y se desprende la réplica del molde maestro.



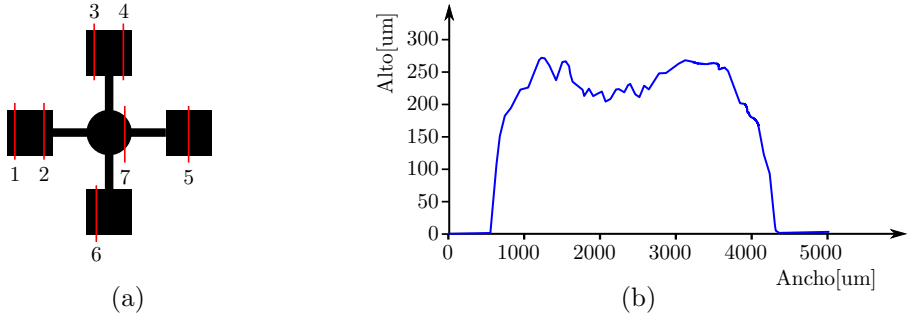
(a) (b) (c) (d)

Figura 2.7: Procedimiento para preparar un molde réplica; (a) diseño, (b) diseño impreso en termoplástico, (c) molde maestro y (d) molde-replica.

Entonces, con este método se obtienen réplicas de estructuras que pueden ser utilizadas como moldes para elaborar electrodos o como canales para el transporte de muestras. Sin embargo, debido a que la geometría de las réplicas dependen de la geometría del molde maestro, es muy importante conocer la topología de dichas estructuras mediante su caracterización geométrica.

2.3.1.1. Caracterización geométrica

Para cada una de las estructuras usadas como molde maestro se obtuvo el perfil en diferentes regiones con un perfilómetro (KLA Tencor D600). En este caso se presenta una serie de dichas mediciones para una estructura en forma de cruz que se muestra en la Figura 2.8a. En la Figura 2.8b, se muestra el perfil de una de las líneas (Figura 2.8a-1). Aunque este método ofrece obtener estructuras en relieve que pueden ser utilizados como molde maestro, se puede observar que el perfil del relieve es irregular y que además la altura de dichas estructuras difieren una de otra (Tabla 2.1). Por ello, el uso de este termoplástico, no es recomendable para producir estructuras en donde la repetibilidad es un factor importante. A pesar de esto, puede ser utilizado para elaborar un prototipo rápido, tal como se muestra en la Figura 2.24.



(a) (b)

Figura 2.8: Perfil de una línea de un molde hecho en el termoplástico Shrinky Dinks (Figura 2.7c). (a) Diseño del molde maestro y (b) perfil de la línea (a-1).

Tabla 2.1: Perfil en diferentes puntos (Figura 2.8a) de un molde maestro (Figura 2.7c).

# de línea	Altura promedio μm	Ancho promedio μm
1	259	3411
2	237	3419
3	245	3493
4	225	3476
5	258	3440
6	231	3243
7	216	3305
Promedio	238 ± 21	3398 ± 91

Debido a las irregularidades observadas a partir de los perfiles obtenidos de las estructuras del molde maestro, se eligió el método de microfresado para elaborar los moldes requeridos.

2.3.2. Microfresado

Con este método se pueden obtener estructuras tridimensionales con un solo paso, que pueden ser utilizadas directamente como moldes para elaborar un electrodo o como un canal para transportar algún fluido, desde luego para ello el canal debe sellarse.

En el taller de mecánica de la Facultad de Ciencias, existe un equipo de maquinado CNC IS400 de Gravograph, que se utilizó para preparar moldes en sustratos de PMMA. Este equipo permite el corte en las direcciones XYZ y para ello utiliza el software de control propietario.

2.3.2.1. Maquinado y caracterización geométrica

El equipo CNC utilizado permite pasos de $200\mu m$ en los ejes XYZ y el cortador utilizado tiene un diámetro de $800\mu m$. Para observar las dimensiones mínimas de las estructuras que se pueden hacer en un sustrato de PMMA, se maquinaron las siguientes estructuras (Figura 2.9):

- Una línea de $5mm$ de longitud (Figura 2.9a), que permite conocer el ancho mínimo del canal que puede realizarse.
- Un cuadro de $4x4mm$ (Figura 2.9b), para conocer la profundidad mínima que se puede alcanzar, es decir el paso mínimo en el eje Z.
- Dos cuadros adyacentes de $4x4mm$ (Figura 2.9c), lo cual nos permite conocer la separación mínima, en el eje X o Y, entre grabados paralelos y,
- Dos cuadros adyacentes opuestos por un vértice (Figura 2.9c), para conocer la separación mínima, en los ejes X y Y entre dos grabados adyacentes.

El resultado de los grabados de la Figura 2.9 se muestra en la Figura 2.10. En la Figura 2.10a se muestra el grabado de una línea, en la cuál se observa que el ancho de la línea corresponde con el diámetro del cortador, es decir, el ancho mínimo que se puede lograr para un canal es de $800\mu m$ usando este cortador. Las dimensiones ($ancho$ x $largo$) del grabado (Figura 2.10b) corresponden con $4x4mm$, tal como se especificó en el diseño, y la separación mínima entre dos cuadros adyacentes (Figura 2.10c y Figura 2.10d) es de $200\mu m$.

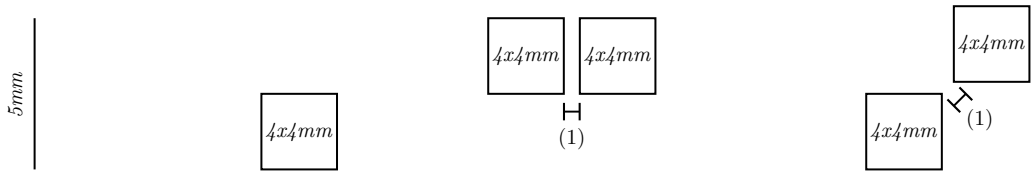


Figura 2.9: Maquinado de: (a) una línea, (b) un cuadro y, (c) dos cuadros adyacentes y (c) dos cuadros opuestos por el vértice.

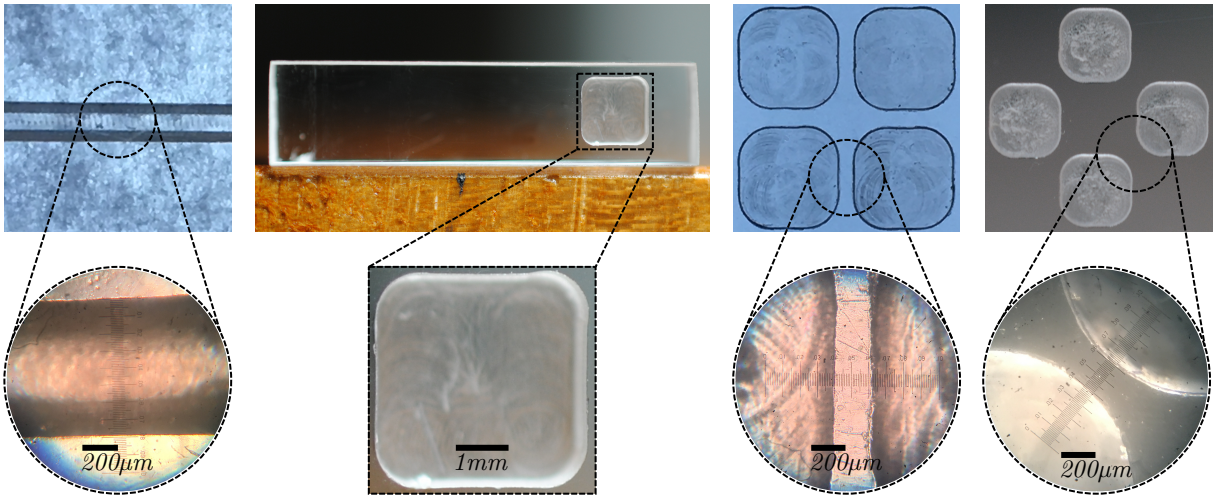


Figura 2.10: Diseño para verificar las medidas del grabado en un sustrato de PMMA. (a) ancho de una línea, (b) dimensiones del grabado, (c) distancia entre pozos adyacentes y (d) distancia entre dos pozos opuestos por el vértice.

Para observar la topología del grabado, se maquinó el cuadro que se muestra en la Figura 2.11a, en un sustrato de PMMA. De este grabado se obtuvo un perfil en 3D y en tres líneas distintas (Figura 2.11b); el resultado muestra que el perfil es similar en dichas líneas (Figura 2.11c) y que la profundidad es uniforme en todo el grabado ($\sim 135\mu m$). Un pozo como el que se muestra en Figura 2.11b se puede utilizar para llenar de material conductor y elaborar un microelectrodo. Además esta técnica se puede utilizar para maquinar estructuras con distinta geometría y que podrían ser utilizadas para elaborar canales para fluídos.

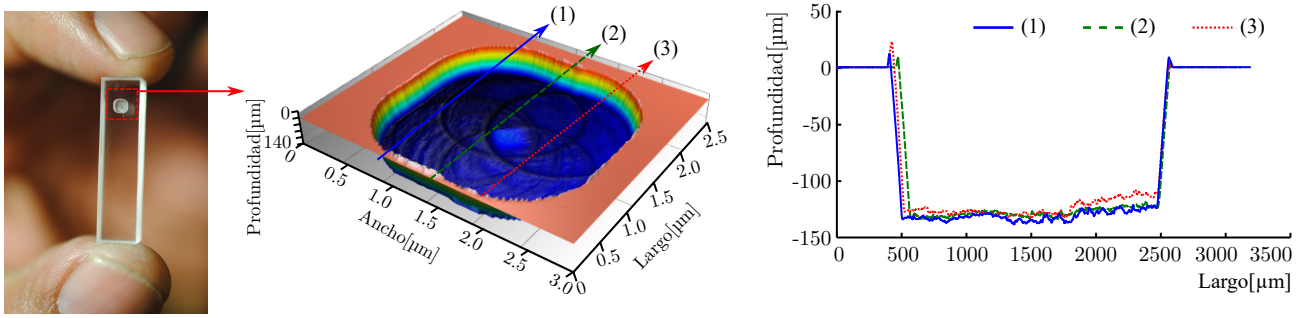


Figura 2.11: (a) Maquinado de un pozo de $\sim 2x2mm$, (b) perfil en 3D de dicho grabado y (c) perfil del grabado en 3 líneas distintas.

Debido a que estos moldes se llenaron con un material conductor, es deseable que la sección transversal o longitud de los moldes sea el mismo entre uno y otro, para que las características eléctricas de los electrodos también sean similares entre ellos. Esto es debido a que la resistencia de una estructura depende de la longitud y de su sección transversal. Uno de los parámetros que puede cambiar en la sección transversal es la rugosidad. Para observar si este parámetro es afectado por la veces que el cortador pasa sobre la misma región, se maquinaron dos diseños en un sustrato de PMMA. (a) El primero consiste de líneas de $5mm$ de longitud y; (b) el segundo, en cuadros de 2 x $2mm$. Para cada uno de los diseños anteriores el cortador pasó sobre la misma región 1, 2, 4, 8 y 16 veces (Figura 2.12).

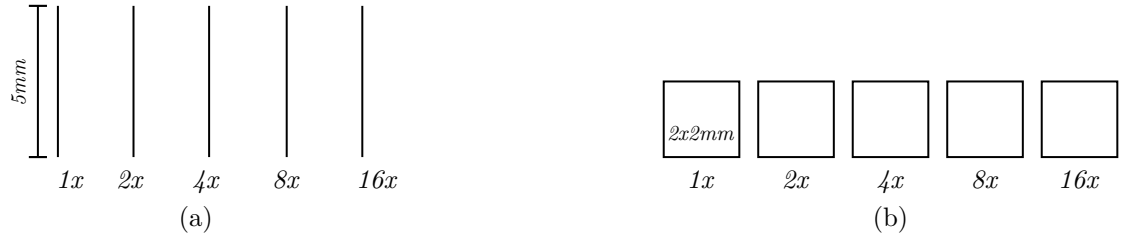


Figura 2.12: Diseño de líneas (a) y cuadros (b), para observar la repetibilidad de un maquinado CNC.

En la Figura 2.13a se muestra el grabado de la Figura 2.12a, en donde el cortador de la máquina CNC pasó en cada una de las líneas 1, 2, 4, 8 y 16 veces, respectivamente. Se observa que la profundidad no es la misma en todos los grabados (Figura 2.13b). Estas diferencias debidas a la inclinación, se deben principalmente a la dificultad de alinear el sustrato en la plataforma de la máquina CNC. Además, la rugosidad no cambia significativamente con el paso sucesivo del cortador (Figura 2.13c).

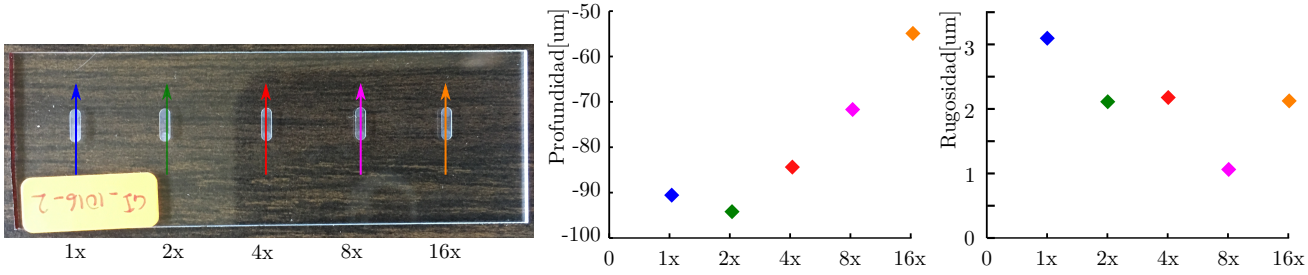
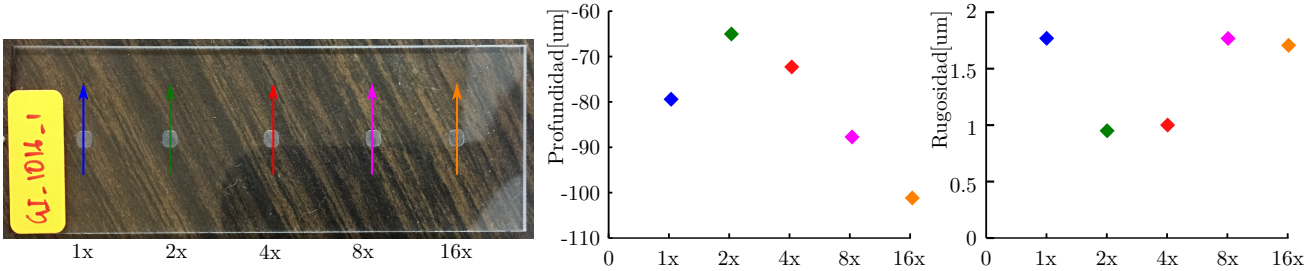


Figura 2.13: Maquinado de líneas (a) en un sustrato de PMMA, (b) profundidad y (c) rugosidad del grabado.

De manera similar, en la Figura 2.14 se muestra el grabado de los cuadros de $\sim 2x2mm$ (Figura 2.12b); de los perfiles de este grabado, también se puede observar que la profundidad tampoco es la misma en cada pozo y la rugosidad tampoco disminuye conforme el número de pasos. Por lo tanto, si se desea maquinar la misma estructura en diferentes regiones de un sustrato, debe considerarse que la profundidad puede cambiar significativamente.

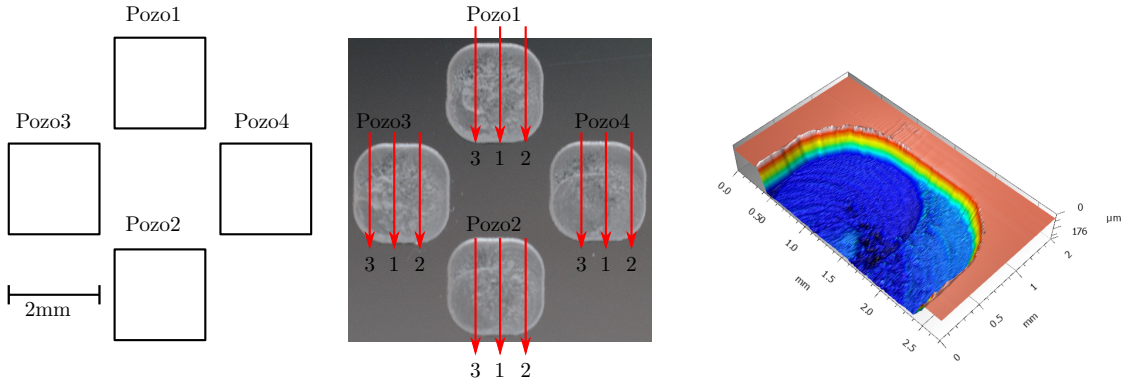
Por otro lado, para verificar si la profundidad de los pozos es similar en regiones adjuntas y en distintos sustratos, se grabaron cuatro pozos en un sustrato (sustrato 1) (Figura 2.15) y luego otros cuatro en un sustrato distinto (sustrato 2). Para cada uno de los pozos se obtuvo el perfil en tres líneas (Figura 2.15b) y se calculó la profundidad promedio de cada pozo. Esto se realizó para dos sustratos distintos; los resultados se muestran en la Tabla 2.2.

De la Tabla 2.2, se observó que la profundidad entre pozos adyacentes varía $\sim 5\,\%$ (Tabla 2.2), mientras que, la profundidad de los pozos hechos en distintos sustratos, puede cambiar en



(a) (b) (c)

Figura 2.14: Maquinado de cuadros (a) en un sustrato de PMMA, (b) profundidad y (c) rugosidad del grabado.



(a) (b) (c)

Figura 2.15: Maquinado de cuatro pozos adyacentes para observar la repetibilidad en distintos sustratos de PMMA. (a) Diseño, (b) pozos y (c) perfil 3D.

Tabla 2.2: Profundidad y ancho promedio de las estructuras maquinadas con microfresado en dos sustratos.

Pozo	**Sustrato 1**		**Sustrato 2**	
	Profundidad promedio μm	Ancho promedio μm	Profundidad promedio μm	Ancho promedio μm
1	124	2069	344	2081
2	116	1970	344	2069
3	120	2055	329	1994
4	128	1947	371	2105

más de 100 %. Por lo tanto, si se desea utilizar este método para preparar moldes, es necesario hacer un grabado previamente para establecer la coordenada Z_0 y entonces hacer el grabado requerido por el diseño, como usualmente se hace con cualquier pieza que se maquina con equipo CNC; sin embargo, debido a la rugosidad producida por la herramienta, no se eligió hacer dicho maquinado previamente, pues este sustrato se debe ensamblar con otro para propósitos de construir estructuras más elaboradas. Aún así, se utilizó dicha técnica para producir electrodos que se probaron y de los cuales se muestran resultados en la sección 2.4.2.

2.3.3. Microfabricación Láser

Este método se propone debido a que: (a) es un método de un solo paso, (b) no requiere de una máscara para la transferencia del patrón, (c) no requiere pasos adicionales de revelado, pre-horneado o post-horneado, (d) alcanza una resolución en el orden de los μm, (e) y la geometría es controlable. Este método, hace uso de la ablación láser para remover o extraer material de manera local de la superficie de nuestro sustratos [99].

Nuestro método de microfabricación se basa en una plataforma láser con una unidad de CD-DVD para producir microcanales sobre sustratos de PMMA, que son utilizados como micromoldes para producir microelectrodos, con un método similar al que se describe en [102]. La plataforma mencionada utiliza una unidad óptica (OPU, *Optical Pick-up Unit*) de un sistema comercial de grabación/reproducción de CD/DVD, que contiene un par de diodos láser, uno infrarrojo de *780nm* correspondiente al CD y otro rojo de *650nm* correspondiente al DVD. La OPU está montada en una plataforma mecánica con control motorizado y movimiento en los ejes X, Y y Z. El movimiento en el eje Z permite ajustar el enfoque del haz láser sobre la muestra que se desea grabar con el apoyo de un objetivo de microscopio; los movimientos en los ejes X y Y, permiten desplazar la muestra según el diseño que se desea grabar en el sustrato. Las plataformas mecánicas (Platinas de *Newport*) que permiten el movimiento en X y Y son controladas por motores a pasos (ZFS25B de Thorlabs) con una resolución de $1\mu m$. El tiempo de encendido y la potencia eléctrica suministrada al diodo láser, así como el encendido y apagado de los motores a pasos, son controlados por un circuito electrónico conectado a una computadora a través del puerto paralelo. El circuito electrónico permite controlar la operación del diodo láser en modo continuo o pulsado a través de un circuito controlador de diodos láser (LDD, *Laser Diode Driver*) para garantizar la corriente suministrada; los pulsos pueden ser monoestables con un ancho de $3.2\mu s$, $24\mu s$, $8\mu s$, $272\mu s$, $900\mu s$, $1.6ms$ a $5.8ms$. El circuito electrónico recibe órdenes a través de una computadora que envía dichas instrucciones mediante un software de control. El software de control, procesa la información del diseño que se requiere transferir al sustrato a través de un archivo de mapa de bits, el cual contiene información del diseño en dos dimensiones (2D). Además, el circuito previamente montado en una protoboard se ha implementó en una tarjeta de circuito impreso (PCB, *Printed Circuit Board*), para mejorar su desempeño.

En la Figura 2.16 se muestra un diagrama general de los pasos de nuestro método para preparar un micromolde en sustrato de acrílico usando microfabricación láser: (a) es un diseño 2D hecho en *inkscape*; (b) el proceso de grabado en el equipo de microfabricación láser y; (c) el micromolde en un sustrato de acrílico.

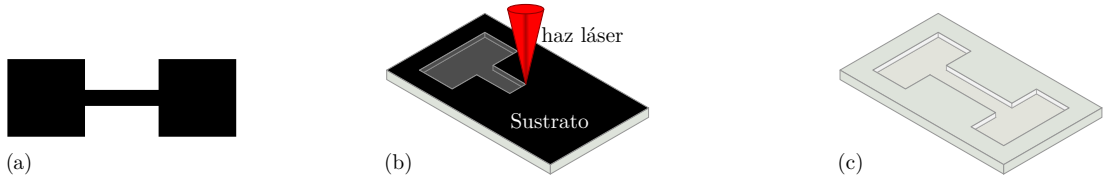


Figura 2.16: Preparación de micromoldes en un sustrato de PMMA con microfabricación láser. (a) es el diseño, (b) el proceso de grabado y (c) el grabado.

El primer paso de nuestro método de fabricación es el diseño (Figura 2.16a), el cuál consiste en proponer una geometría que se desea transferir al sustrato de acrílico. El diseño se elaboró utilizando el software *Inkscape*, mediante el cual se obtuvo un archivo de mapa de bits, que se utilizó por el equipo para transferir al sustrato de PMMA. En la Figura 2.17, se muestran algunos ejemplos de diseños propuestos para: (a) caracterizar eléctricamente electrodos de

carbón, (b) elaborar electrodos de plata y, (c) elaborar electrodos de carbón como sensor de temperatura.

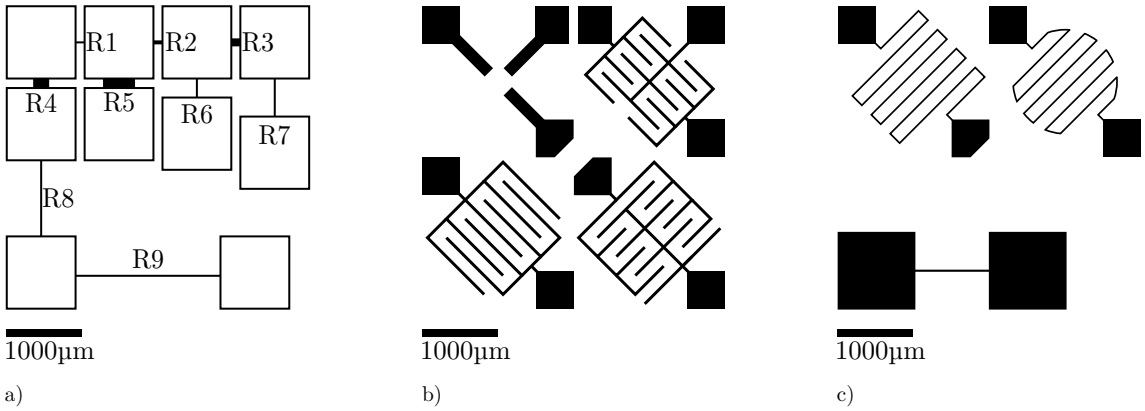


Figura 2.17: Diseño de microelectrodos en un archivo de mapa de bits, para (a) caracterización eléctrica, (b) aplicaciones de amperometría y (c) impedancia.

2.3.3.1. Grabado del sustrato

Debido a que el PMMA es transparente a las longitudes de onda (*650nm*) del láser de la plataforma utilizada, es necesario depositar una película de nanopolvo de carbon (Sigma-Aldrich, parte no. 633100) sobre dicho sustrato. Para ello es necesario distribuir dichas partículas de manera homogénea, garantizando un grabado uniforme. Para depositar el nanopolvo de carbón en el sustrato de PMMA se siguen los siguientes pasos:

- Limpiar la superficie del sustrato con un hisopo y alcohol isopropílico,
- Depositar una gota de alcohol isopropílico sobre el sustrato de PMMA,
- Depositar una pequeña cantidad de nanopolvo de carbón ($\sim 5\mu g$), y
- Esparcir el nanopolvo de carbón sobre el sustrato de acrílico.

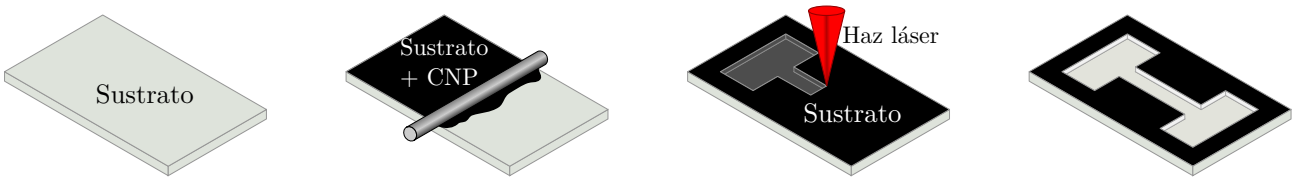
Después de preparar la muestra se coloca en la plataforma del equipo de microfabricación. Con la ayuda de las platinas XYZ, se puede ubicar con precisión la región del sustrato en donde se quiere transferir el diseño, así como el enfoque del haz láser sobre la superficie del sustrato. Debido a la longitud de onda del haz láser (*650nm*), el equipo de microfabricación cuenta con un sistema de visualización para facilitar al usuario dichos ajustes. El software permite un control numérico por computadora y la transferencia del diseño pixel por pixel. Para transferir el diseño al sustrato, el usuario debe:

- Establecer la plataforma XY, en su posición inicial.
- Verificar que el haz enfoque la superficie en la que se va a transferir el diseño.
- Configurar los parámetros de grabado: el tiempo de pulso, la potencia eléctrica del diodo láser, el número de pasos en la misma región y la resolución (μm x $pixel$).
- Especificar la ruta del archivo de diseño.

- Iniciar el proceso de grabado.

En la Figura 2.18 se muestran los pasos del proceso de grabado con nuestro método de microfabricación láser, los cuales consisten en:

- Limpiar el sustrato de PMMA.
- Depositar una película de nanopolvo de carbón.
- Enfocar el haz láser sobre el sustrato.
- Obtener el sustrato grabado.



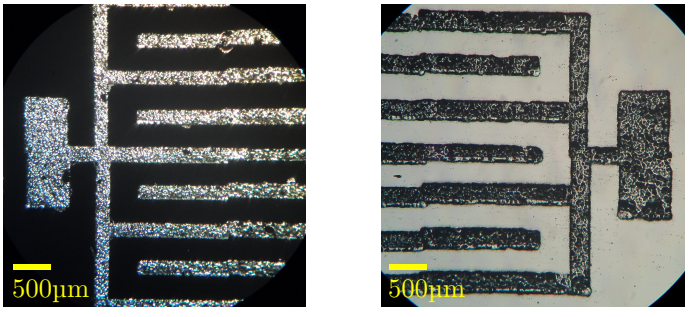
(a) (b) (c) (d)

Figura 2.18: Proceso de grabado en acrílico mediante la técnica de microfabricación láser. (a) Sustrato de acrílico, (b) tratamiento del sustrato, (c) grabado con láser y (d) micromolde.

Después de transferir el diseño con el equipo de microfabricación láser, se limpia el sustrato de la siguiente manera:

- Se remueven las partículas de nanopolvo de carbón mediante el uso de un hisopo humedecido con alcohol isopropílico.
- El sustrato se pone en un baño ultrasónico durante 10 minutos a $23°C$ usando agua destilada para remover las partículas que no se removieron con el hisopo.
- Se enjuaga el sustrato con agua destilada y,
- Se pone el sustrato en una parrilla durante 1 minuto a $50°C$ para secarlo.

En la Figura 2.19a se muestra un sustrato grabado antes de limpiar y en la Figura 2.19b después de limpiar.



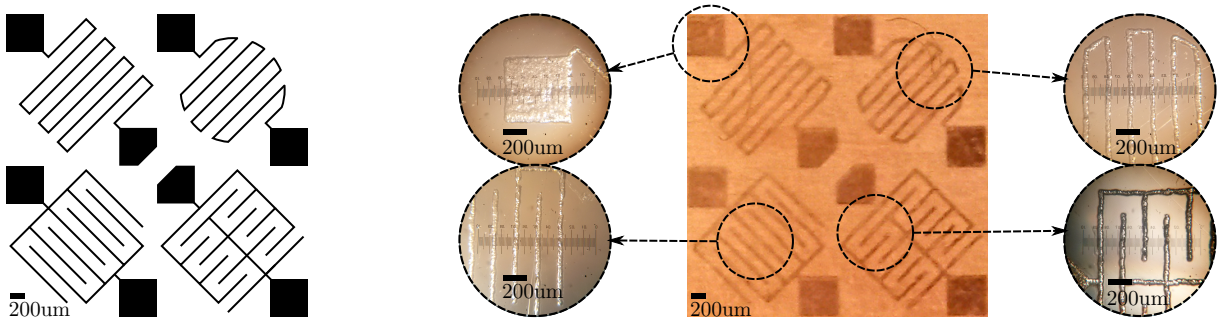
(a) (b)

Figura 2.19: Sustrato después del grabado (a) y después de limpiar (b).

2.3.3.2. Caracterización geométrica

Una vez que el sustrato se ha limpiado, se observa el grabado con un microscopio óptico (Nikon Eclipse Ci-L) para verificar que el diseño ha sido correctamente grabado y para corroborar que las dimensiones del grabado corresponden con el diseño.

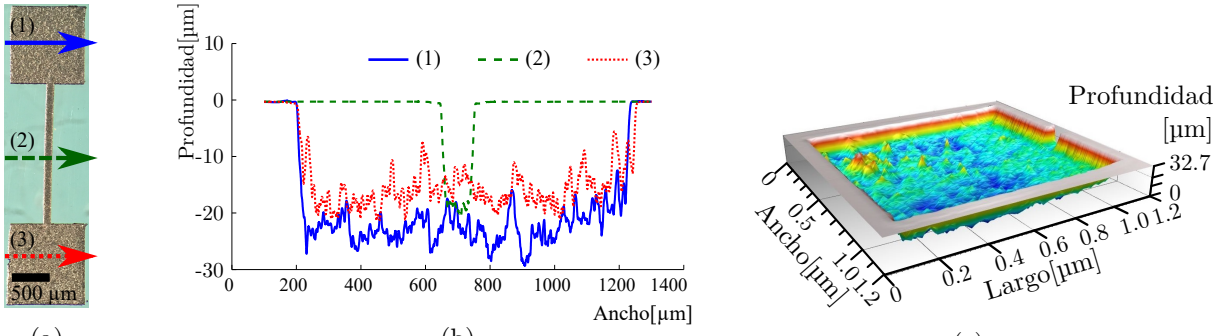
En la Figura 2.20a se muestra el diseño del grabado; en Figura 2.20b una fotografías del grabado, en donde se puede observar que el diseño ha sido transferido correctamente y que además sus dimensiones corresponden con las contempladas en el diseño. Se utilizó un microscopio con un objetivo de 10 aumentos y un ocular graduado con una regla de 0 a 1000μm.



(a) (b)

Figura 2.20: (a) Diseño y (b) grabado y verificación de dimensiones.

Para verificar la profundidad de cada grabado, se utilizó un perfilómetro. En la Figura 2.21(b-c) se muestran los perfiles de un grabado con un diseño de dos PADs unidos por una línea (Figura 2.21a). En este caso, la rugosidad tiene mayor importancia, debido a la escala, pues cambia de manera significativa el volúmen de material que puede contener el pozo grabado. El volumen del material puede cambiar de manera significativa la impedancia de la estructura.



(a) (b) (c)

Figura 2.21: Perfil del grabado pasando el haz láser solo una vez sobre el sustrato. (a) Micromolde, (b) perfil de grabado en tres líneas y (c) perfil de un pozo en 3D.

Además, la profundidad del grabado se puede controlar grabando repetidamente sobre la misma región tal como se muestra en la Figura 2.22; en dicha figura se puede observar que pasando sobre la misma región se pueden alcanzar profundidades de 10μm, 20μm, 30μm y 40μm grabando una (1x), dos (2x), tres (3x) o cuatro veces (4x) sobre la misma región.

El control de la profundidad del grabado permite producir estructuras que pueden tener aplicaciones en fluídica, aunque debe considerarse que la alineación es un factor importante en ese proceso, debido a que cada grabado requiere de un depósito de material absorbente. En

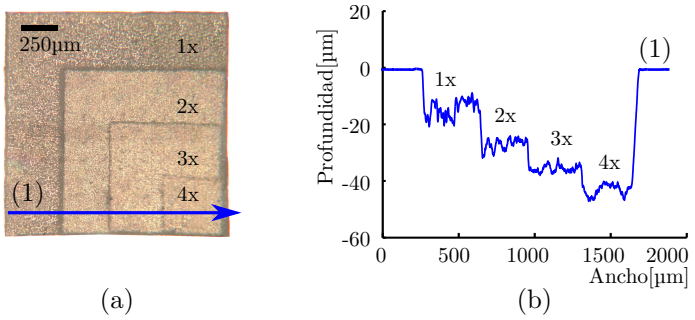


Figura 2.22: Control de profundidad del grabado sobre el sustrato. (a) Sustrato grabado y (b) perfil del grabado.

nuestro caso esto nos permitió cambiar la profundidad de los canales para el depósito de un material conductor.

Hasta este punto se han presentado tres métodos empleados para producir moldes, que por su escala podemos referirnos a ellos como micromoldes. En la siguiente sección se presenta la elaboración de electrodos; debido a que dichas estructuras se pueden elaborar a una escala alrededor de los micrómetros, nos referimos a ellas como microelectrodos.

2.4. Electrodos

La miniaturización de electrodos permite: (a) incorporar diferentes estudios en una misma plataforma de medición, es decir dispositivos tipo "lab on chip" (laboratorio en un chip) [10, 103]; (b) utilizar volúmenes analíticos bajos ($\sim \mu L$) [74, 75]; (c) reducir el volumen de reactivos requeridos para el desarrollo del sensor (d) reducir el costo total del desarrollo del sensor [104]; (e) modificar la sensibilidad, debido a la posibilidad de cambiar la geometría del área del sensor; (f) desarrollar dispositivos con aplicacion en telemedicina, empleados en puntos de atención (point of care) para ensayos rápidos; y (g) desarrollar dispositivos portátiles [105, 10].

Existen muchos métodos para generar microelectrodos reportados en la literatura; sin embargo, un método comunmente usado, es la fotolitografía convencional [92]. La fotolitografía, no es simple debido a que requiere de varios pasos, usualmente llevados a cabo en un cuarto limpio y con equipo especializado; requiere de mucho tiempo y para cada modificación en el diseño se requiere una mascara diferente para la exposición de las resinas fotosensibles. También se puede usar un láser de pulso ultracorto para crear arreglos de microelectrodos sobre substratos, mediante la remoción de una capa de metal [106]; sin embargo, este método requiere un paso de depósito por pulverización catódica (sputtering) y cualquier modificación en el diseño requiere de la modificación en el software. Otro método para producir microelectrodos es la creación de patrones directamente a través del curado selectivo de nanopartículas de una tinta organometálica [107], pero este método requiere varios pasos antes y después de la transferencia del patrón deseado, tales como pre-horneado y post-horneado para asegurar un buen comportamiento estructural.

Existen otras técnicas como la inyección de tinta, pero están limitados debido a la resolución que pueden alcanzar, especialmente, si el sustrato tiene una superficie hidrofóbica. Por esta razón, esta técnica se combina con la sinterización láser. Como alternativa, la técnica de ablación con láser pulsado ultracorto ha sido empleada para producir microelectrodos sobre polímeros y puede ser utilizado como un coloide de nanopartículas Ag [108]. Otra técnica que ha sido utilizada recientemente como método para prototipado de microelectrodos y para fabricar

estructuras microfluídicas sobre polímeros [109], es el ploteo láser directo, pero éste método está limitado por su alto costo y nivel de complejidad.

Existen algunos métodos para generar dichos electrodos reportados en la literatura [110], sin embargo en el presente trabajo empleamos molde-réplica, maquinado CNC y microfabricación por láser [111], debido a que estos métodos son compatibles con sustratos de PDMS, PMMA y nos permiten depositar el material conductor con el mismo método.

El método utilizado para depositar el material conductor, en el molde, es la técnica "*Doctor Blade*", la cual consiste en depositar un material en el molde y remover el exceso de material mediante el uso de una navaja [112]. Este método se eligió, debido a que: (a) no requiere de un depósito por pulverización catódica, (b) pre-horneado, o (c) pasos adicionales de revelado.

El número de electrodos y la selección del material del cuál están hechos, depende de la aplicación en la que se requieren utilizar. En aplicaciones de voltamperometría cíclica es común utilizar una configuración de 3 electrodos: electrodo de trabajo, contralectrodo y referencia, los cuales deben ser de distintos materiales; por ejemplo carbón, platino y plata.

Eligimos utilizar pasta de carbón y plata como materiales conductores, por ser dos materiales comunmente utilizados en sensores de glucosa. La pasta de carbón (*LaserCon*) que utilizamos está hecha a base de solventes de grupo cetónico (acetonas), solventes de grupo glicoéteres, resina acrílica y grafito; y la tinta conductora que utilizamos es de plata (*ConductivePen*).

Para cada uno de los moldes producidos, con los distintos métodos en el presente trabajo, el depósito del material conductor se realizó mediante el procedimiento que se ilustra en la Figura 2.23, en la cual se muestra: (a) el molde, (b) el depósito mediante la técnica de doctor blade y (c) el molde con la estructura del material conductor (electrodo).

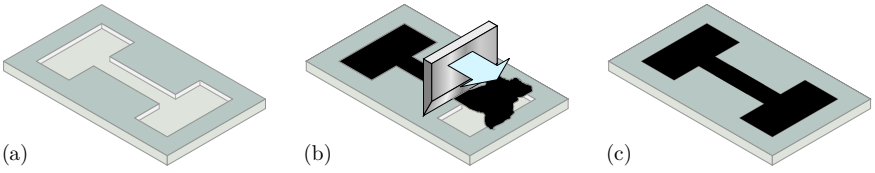
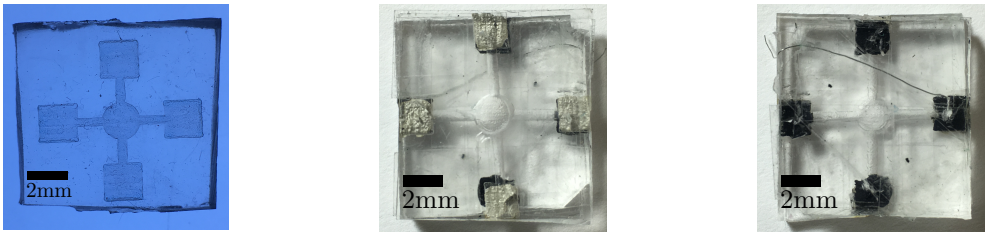


Figura 2.23: Procedimiento de depósito del material conductor. (a) Molde, (b) depósito de material conductor y (c) microelectrodo.

2.4.1. Litografía suave

El polímero PDMS es biocompatible e inocuo, lo cual permite elaborar estructuras con aplicaciones biológicas. Debido a que el interés del presente trabajo es desarrollar un biosensor, este material es un buen candidato para desarrollar las estructuras tanto para la zona de detección como para el transporte del fluído. Entonces, como primer método, elaboramos microelectrodos a partir de un molde-replica realizado en un sustrato de PDMS. Estos electrodos se muestran en la Figura 2.24. Para elaborar dicho electrodo se tomó un molde réplica (Figura 2.24a) y se llenó con plata y pasta de carbón, para obtener electrodos de plata (Figura 2.24b) y carbón (Figura 2.24c).

La ventaja que tienen las réplicas de PDMS es que la geometría de dos pozos que vienen del mismo molde maestro es la misma, por lo que al tener la misma sección transversal, la impedancia de dichas estructuras es la misma. Aunque si se requieren estructuras más elaboradas, debe considerarse el hecho de que la sección transversal puede cambiar. Por ejemplo, para cada uno de los electrodos que se muestran en la (Figura 2.24b) y (Figura 2.24c), la sección transversal no es la misma, como se mostró en la Tabla 2.1.



(a) (b) (c)

Figura 2.24: Molde (a), microelectrodos de plata (b) y de carbón (c).

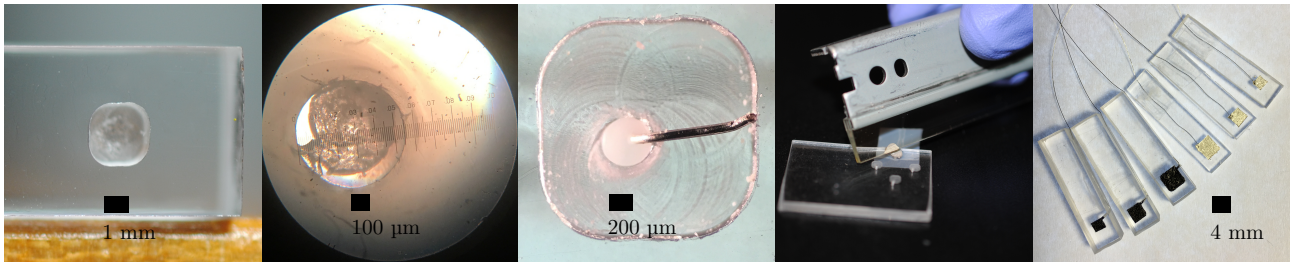
Aunque se pueden elaborar electrodos en un mismo sustrato de PDMS, debe considerarse el hecho de que si los pozos no tienen la misma profundidad, es decir una sección transversal distinta, la resistencia o impedancia de los electrodos podría cambiar. Además si se requieren ensamblar dos sustratos, debido al termoplástico utilizado como molde maestro, ensamblar las réplicas producidas no es sencillo, debido a las irregularidades en su superficie, lo que no permite un sellado hermético. Una desventaja de usar PDMS es que es un material hidrofóbico, esto dificulta el sellado con otra estructura del mismo material, lo cual nos permitió explorar con otro material como el PMMA, como se muestra a continuación.

2.4.2. Microfresado

Por otro lado, utilizando microfresado se obtienen estructuras regulares en regiones locales o adyacentes, además la profundidad de dichas estructuras permiten el depósito de material conductor para elaborar electrodos, tal como se muestra en la Figura 2.25. Para preparar electrodos de pasta de carbón y de tinta de plata se utiliza el siguiente procedimiento, que consiste en:

- Preparar un molde en sustrato de PMMA (Figura 2.25a);
- Perforar el micromolde con una broca de $550\mu m$ (Figura 2.25b), debido a la necesidad de conectar el electrodo con el exterior, para recuperar las señales con dicha estructura;
- Fijar un alambre de $120\mu m$ en la perforación (Figura 2.25c);
- Depositar el material conductor (pasta de carbón o plata) mediante la técnica de doctor blade (Figura 2.25d); y
- Secar las estructuras en una parrilla a $50°C$ durante 5 minutos, para obtener los microelectrodos de plata o carbón (Figura 2.25e).

Aunque las estructuras hechas en sustratos de PMMA se pueden llenar fácilmente con material conductor, debe considerarse el hecho de que cada pozo contiene un volumen diferente de material, debido a las diferencias de profundidad entre los pozos tal como se mostró en la Tabla 2.2. Una de las ventajas que tiene utilizar este material es que ensamblar un sustrato con otro es relativamente más sencillo porque: es rígido, es hidrofílico y su superficie no tiene irregularidades. Debido a que el maquinado es un pozo y no un relieve, no se puede utilizar directamente para hacer una réplica. Si se desea maquinar como molde maestro para hacer réplicas, es necesario desbastar el material circundante a la estructura en relieve que se desea replicar. Esto agrega como consecuencia, rugosidades en la superficie que se transfieren a la



(a) (b) (c) (d) (e)

Figura 2.25: Microelectrodos producidos con micromaquinado. (a) Sustrato micromaquinado, (b) perforación al sustrato, (c) fijación de alambre, (d) depósito de material conductor y (e) microelectrodo.

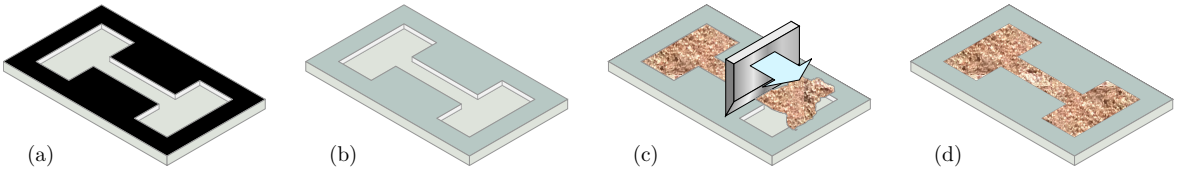
réplica y que a su vez afectan el ensamble del sustrato. Desde luego es posible si se maquina un sustrato de otro material como latón.

La caracterización eléctrica del material corresponde con la presentada en los párrafos 2.5.2.1 y 2.5.2.2.

2.4.3. Microfabricación Láser

Finalmente, nuestro método de fabricación láser nos permitió preparar moldes que se utilizaron para llenar de material conductor y elaborar nuestros electrodos, referido en este párrafo como microelectrodos.

En la Figura 2.26 se muestra el procedimiento general para el depósito de material conductor en nuestro sustrato de PMMA utilizando el método de doctor blade; en (a) se muestra el sustrato grabado; en (b), el sustrato después del procedimiento de limpieza, en (c), el procedimiento de depósito y; en (d), el electrodo.



(a) (b) (c) (d)

Figura 2.26: Procedimiento de depósito del material conductor en un micromolde preparado con microfabricación láser. (a) Micromolde grabado, (b) micromolde limpio, (c) depósito de material conductor y (d) microelectrodo.

Para llenar nuestro moldes con pasta de carbón o plata se utilizaron procedimientos similares, con algunas diferencias debido a la viscosidad de los distintos materiales.

La pasta de carbón utilizada contiene partículas de grafito dispersas en un solvente que seca rápidamente a temperatura ambiente. Esta pasta se ha utilizado para la fabricación de electrodos de carbón [113] para aplicaciones de voltametría; en el presente trabajo se aplican para amperometría.

Una vez que el molde en el sustrato de acrílico está listo, se puede utilizar para elaborar microelectrodos mediante los siguientes pasos:

- Proteger la mesa de trabajo, de residuos de pasta de carbón, con una toalla de papel ($\sim$ 20 x 20 cm);
- Colocar el sustrato sobre la toalla de papel (Figura 2.27a);

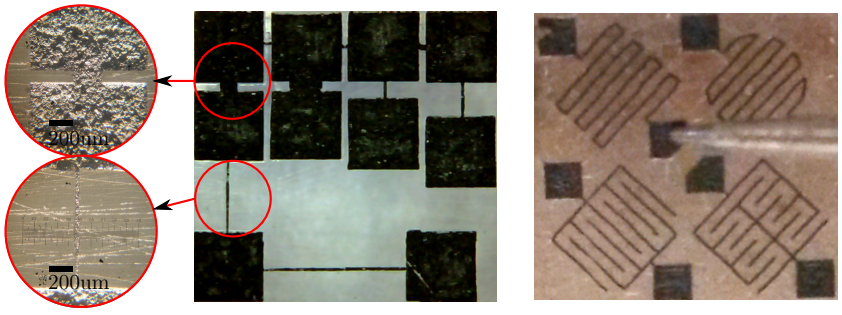
- Depositar pasta conductora sobre el molde de acrílico (Figura 2.27b);
- Realizar el barrido en el sentido que se muestra en la (Figura 2.27c) utilizando una varilla;
- Remover el exceso de material conductor mediante la técnica de *Doctor Blade*; y
- Poner el sustrato en la parrilla a 50° por 5 minutos, para secar la pasta de carbón.



(a) (b) (c)

Figura 2.27: Procedimiento de depósito de pasta de carbón en un molde de PMMA. (a) Micromolde, (b) depósito de pasta de carbón y (c) uso de varilla para limpiar el exceso de carbón.

Mediante este proceso se puede obtener un microelectrodo de carbón de manera rápida y de bajo costo, tal como se muestra en la Figura 2.28.



(a) (b)

Figura 2.28: Microelectrodos de pasta de carbón. (a) Para caracterización eléctrica y (b) para aplicación en impedancia.

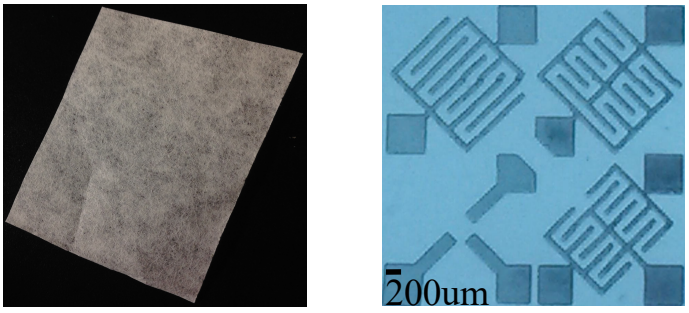
También se pueden preparar microelectrodos de plata con un procedimiento similar. El material conductor que se utilizó es una tinta de plata (CW2200MTP) de Chemtronics [114].

Para depositar la tinta de plata sobre el sustrato de PMMA se siguen los siguientes pasos:

- Proteger la mesa de trabajo, de residuos de tinta de plata, con una toalla de papel ($\sim$ 20 x 20 cm);
- Se cortan 4 o 5 piezas de papel de aproximadamente 7x7cm (Figura 2.29a);
- Colocar el sustrato sobre la toalla de papel (Figura 2.29b);
- Depositar una gota de la tinta de plata sobre el sustrato de acrílico;

- Remover el exceso de tinta mediante el uso de la toalla de papel; y
- Dejar secar el material durante 5 minutos a temperatura ambiente.

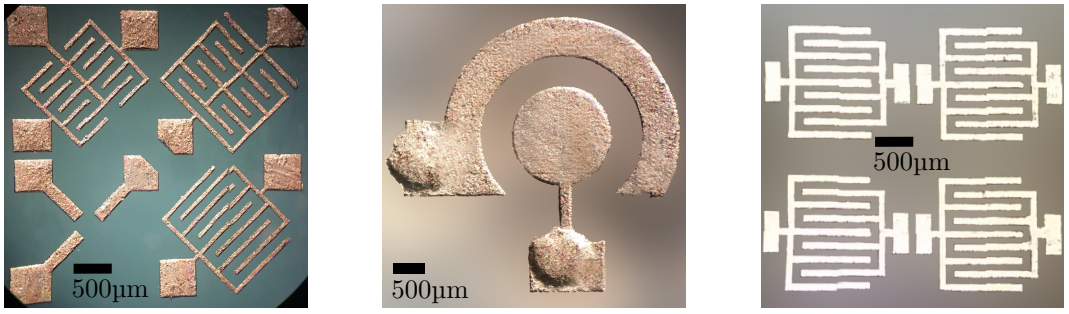
El procedimiento para el depósito mencionado se muestra en la Figura 2.29.



(a) (b)

Figura 2.29: Procedimiento de depósito de pasta de tinta de plata en un micromolde de PMMA (b), utilizando una toalla de papel (a).

Después de hacer el depósito del material conductor, se obtienen microelectrodos de plata, tal como se muestra en la Figura 2.30.



(a) (b) (c)

Figura 2.30: Electrodos de plata. (a) y (c) ejemplos de electrodos interdigitados para aplicación en impedancia y amperometría; y (b) electrodo para aplicación en impedancia.

Las estructuras que se muestran en las Figuras 2.30a y 2.30d se utilizaron para caracterizar la impedancia de los electrodos y la Figura 2.30c para una aplicación de conteo de células en un medio de cultivo.

Cada una de los electrodos obtenidos mediante las técnicas mencionadas se caracterizaron eléctricamente mediante medición de impedancia, la cuál se describe a continuación (2.5).

2.5. Caracterización eléctrica de electrodos

La amperometría y voltametría involucran mediciones de corriente en un electrodo como función del voltaje aplicado a la solución-electrodo, estos métodos utilizan señales de DC; En contraste, los biosensores de impedancia miden la impedancia de una interfaz eléctrica utilizando una señal de AC, en estado estacionario, con condiciones de polarización de DC constante, por ello es importante conocer la respuesta del electrodo, según la aplicación en la que se requieren

utilizar. Por lo anterior, los electrodos producidos en el presente trabajo, se caracterizaron eléctricamente mediante espectroscopia de impedancia (IS, *Impedance Spectroscopy*).

La espectroscopia de impedancia, es un término utilizado en la medición de señales pequeñas que son la respuesta eléctrica de un material de interés. El análisis de dicha respuesta da información sobre las propiedades fisicoquímicas del sistema y se realiza normalmente en el dominio de la frecuencia. Las mediciones de impedancia son necesarias para caracterizar la respuesta del material [115].

El procedimiento experimental para medir impedancia consiste en aplicar una pequeña señal de potencial eléctrico a un electrodo y medir su respuesta en corriente a diferentes frecuencias. A la relación de impedancia y frecuencia se denomina "espectro de impedancias", el cual se analiza utilizando circuitos eléctricos equivalentes, compuestos por resistores (R), capacitores (C) e inductores (L). Estos datos se pueden representar en una gráfica en el plano complejo, ó Z y θ en el eje Y vs f en el eje X. De esta manera se pueden caracterizar los electrodos producidos en el presente trabajo.

Los electrodos producidos fueron caracterizados eléctricamente mediante el uso de un medidor de impedancias (*Precision LCR Meter Agilent E4980A*), usando señales desde $5mV$ a $2V$ en un rango de frecuencias de $20Hz$ a $2MHz$ a $25°C$.

La impedancia es un término que describe la resistencia eléctrica de un circuito en corriente alterna y se define por la razón entre la magnitud de la señal de potencial eléctrico alterno y la magnitud de la señal de corriente alterna, y el ángulo de fase (Ecuación 2.1).

$$Z = \frac{E}{I}, \tag{2.1}$$

$$E = \Delta E sen(\omega t), \tag{2.2}$$

$$I = \Delta I sen(\omega t + \phi), \tag{2.3}$$

Donde Z, es la impedancia [Ω]; E e I, el valor instantáneo del potencial eléctrico [V] y corriente eléctrica [A]; ΔE y ΔI , son la amplitud máxima y $\omega = 2\pi f$, es la frecuencia angular. La corriente asociada a una señal de potencial sinusoidal, es también sinusoidal, de la misma frecuencia, pero con una amplitud y fase diferente. Cuando en el circuito se involucra un capacitor (C) o un inductor (L), la impedancia se puede representar como (ecuación 2.4).

$$Z = R + jX, \tag{2.4}$$

Donde, X es la reactancia inductiva ($X_L = 2\pi f L$) o capacitiva ($X_C = 1/(2\pi f C)$).

Para medir la impedancia de los electrodos, se puede utilizar un medidor de impedancias (*Precision LCR Meter Agilent E4980A*), tal como se describe a continuación.

2.5.1. Configuración de la medición

El medidor de impedancias *Precision LCR Meter Agilent E4980A* nos permite realizar mediciones de: resistencia, capacitancia, inductancia, reactancia, impedancia y admitancia, en un rango de frecuencias de $20Hz$ a $20MHz$ con una precisión de medición de 0.01 % [116]. Los parámetros Z y θ, se miden utilizando la ecuación 2.5

$$\begin{aligned} Z &= R + jX = |Z|\angle\theta, \\ |Z| &= \sqrt{R^2 + X^2}, \\ \theta &= atan\left(\frac{X}{R}\right), \end{aligned} \tag{2.5}$$

Generalmente, cualquier inductancia mutua, interferencia entre las señales de prueba, o factores no deseados debidos a la conexión tienen un efecto en la medición, especialmente a altas frecuencias. Por esta razón, el medidor de impedancias E4980A emplea una configuración de medición de cuatro terminales que permite una medición estable y precisa tanto para baja, como para alta impedancia, tal como se muestra en la Figura 2.31a.

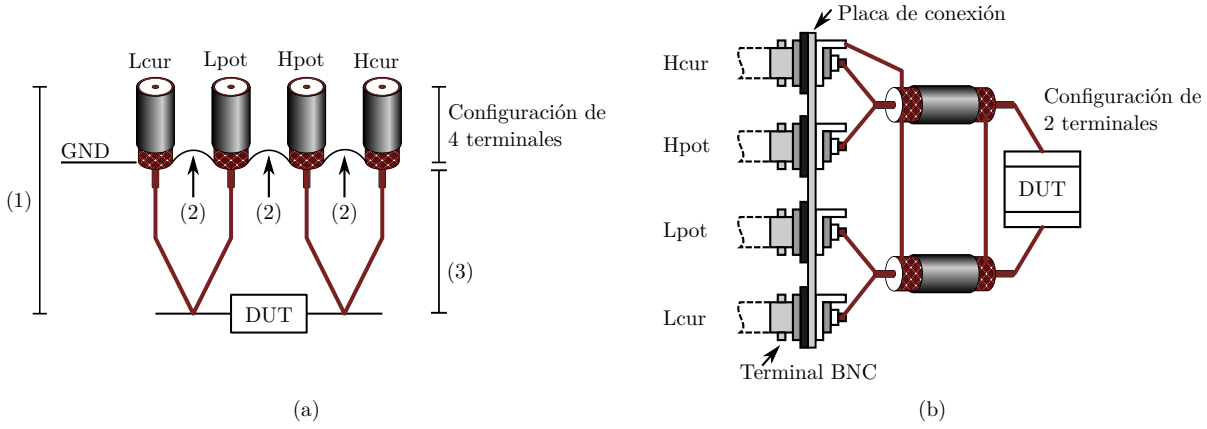


Figura 2.31: (a) Configuración de 4 terminales y (b) configuración de 2 terminales.

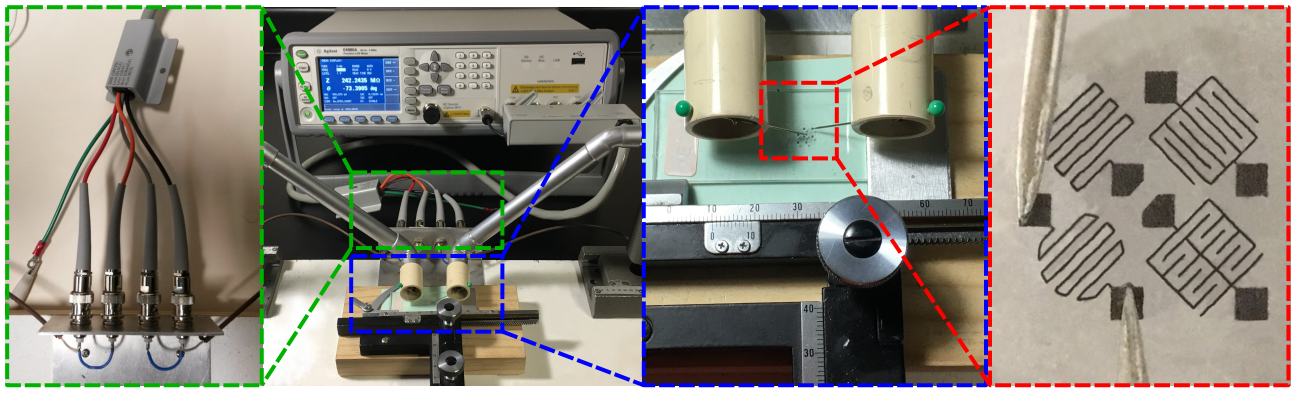
Los puntos que se deben considerar son (ver Figura 2.31a): (1) La longitud del cable entre las terminales del medidor y el dispositivo bajo prueba (DUT, *Device Under Test*) debe ser tan corto como sea posible, (2) Las terminales de GND deben estar conectadas entre si, tan cerca como sea posible y, (3) Las conexiones entre las terminales BNC y el dispositivo bajo prueba deben ser tan cortas como sea posible.

Para evitar efectos inductivos y capacitivos debidos a la conexión de las terminales, cables y puntas, se ha realizado una conexión con una configuración de 2 terminales, que se muestra en la Figura 2.31b, tal como se especifica en el manual del equipo [116].

En la Figura 2.32a se muestra una configuración de 2 terminales para utilizar el medidor de impedancias (Figura 2.32b) y mediante unas puntas (Figura 2.32c) caracterizar eléctricamente los electrodos (Figura 2.32d).

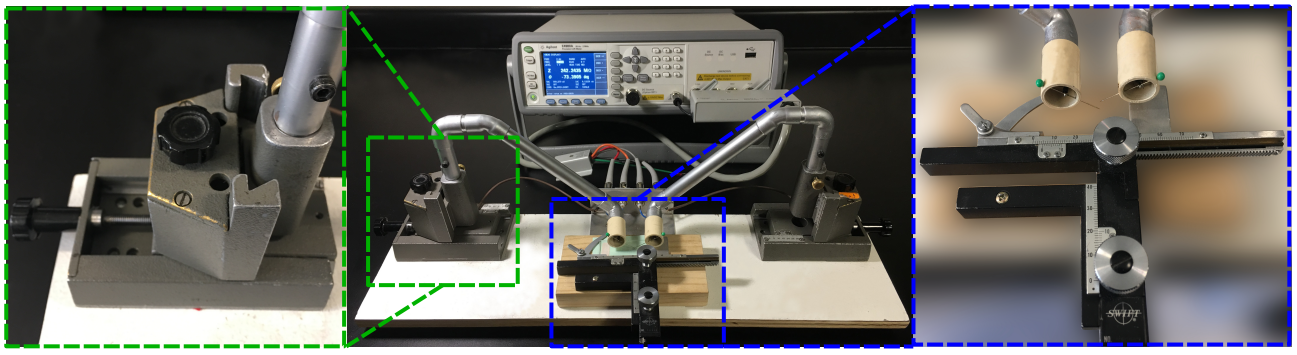
Debido a las dimensiones de los microelectrodos, ha sido necesaria la implementación de un micromanipulador (Figura 2.33b) para posicionar las puntas sobre los microelectrodos y hacer la caracterización eléctrica de dichas estructuras con el medidor de impedancias. El micromanipulador fue hecho utilizando: piezas de tubería de cobre, madera, cable coaxial, tornillos, dos plataformas micrométricas para el movimiento XZ (Figura 2.33a), y una platina para el movimientos XY(Figura 2.33c).

Para llevar a cabo las mediciones de Z y θ se requieren realizar algunos ajustes al medidor de impedancias , tales como: configurar parámetros de medición (impedancia, voltaje y frecuencia), realizar los ajustes en circuito abierto y en corto circuito y configurar el almacenamiento de los datos (ver apéndice B).



(a) (b) (c) (d)

Figura 2.32: Configuración para la medición de impedancia. (a) Configuración de 4 terminales, (b) medidor de impedancias, (c) platina para posicionar las puntas sobre microelectrodos y (d) puntas sobre microelectrodos.



(a) (b) (c)

Figura 2.33: Manipulador implementado (b) con platinas (X, Z) (a) y platinas XY con ajuste fino (c).

El Medidor de impedancia LCR Meter E4980A, se ha utilizado para realizar la caracterización de los microelectrodos elaborados sobre un sustrato de PMMA, tal como se muestra en la Figura 2.32d. Además, la impedancia de estos electrodos se ha caracterizado, para aplicarlo en un sensor de glucosa, usando un método amperométrico.

2.5.2. Impedancia de los microelectrodos

2.5.2.1. Microelectrodos de carbón

Para caracterizar los electrodos de carbón, primero se diseñó una estructura como la que se muestra en el recuadro (1) de la Figura 2.34. Para dicha estructura se aplicó una señal sinusoidal con amplitudes de $500mV$, $1V$, $1.5V$ y $2V$ @ $20Hz$ a $2MHz$. Los resultados para Z y θ se muestran en la Figura 2.34. Se observa de dichos resultados que la impedancia cambia en función del voltaje aplicado en aproximadamente $\pm 1.26\,\%$. Lo anterior se debe a que Z es directamente proporcional a E, mientras que θ depende de la reactancia (Ecuación 2.1), es decir de la naturaleza capacitiva o inductiva del material.

Basado en lo anterior, se eligió una señal sinusoidal con amplitud de $1V$ para caracterizar nuestros microelectrodos, para lo cual se diseñaron estructuras con: (a) la misma longitud y área de sección transversal distinta y, (b) la misma área de sección transversal y longitud distinta. En la Figura 2.35, se muestran las dimensiones de una estructura en forma de prisma rectangular

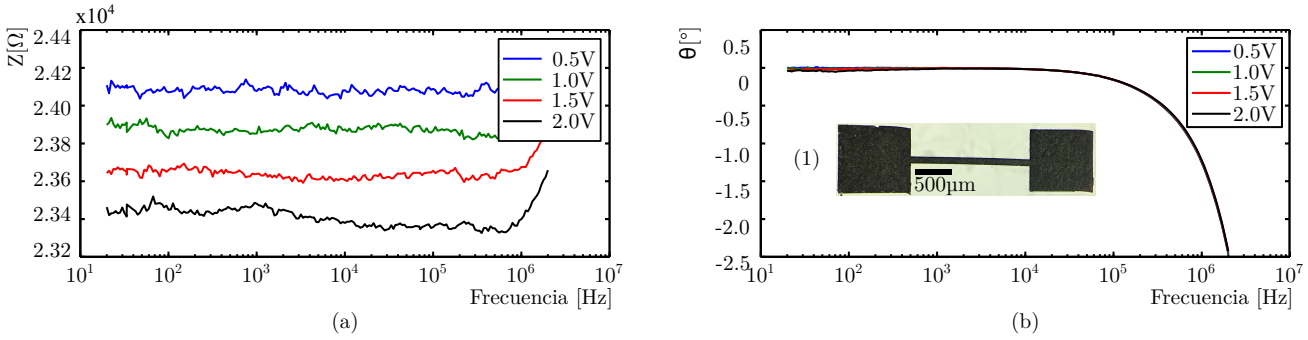


Figura 2.34: Impedancia (Z (a), θ(b)) de una estructura de carbón en función del voltaje aplicado.

en donde: a, es el ancho de la estructura; h, la altura y; l, la longitud. La resistividad en un estructura con la geometría citada se puede expresar de la forma $\rho = R\frac{S}{l}$; donde $S = ah$, es el área de la sección transversal.

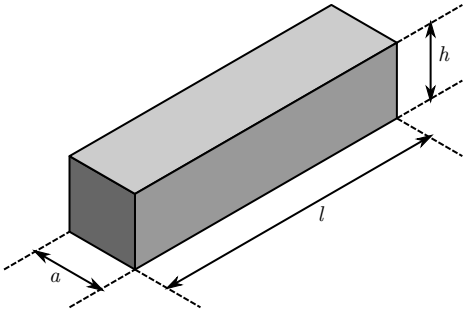


Figura 2.35: Geometría de una estructura rectangular.

En la Tabla 2.3, se muestran las dimensiones para distintas estructuras, con distintas longitudes y distintas áreas de sección transversal, que se utilizaron para caracterizar los electrodos de carbón. Estas medidas se obtuvieron con un perfilómetro.

Tabla 2.3: Altura y ancho promedio de dos estructuras.

Estructura	**Sección transversal distinta**			**Estructura**	**Longitud distinta**		
	h $[\mu m]$	l $[\mu m]$	S $[\mu m^2]$		h $[\mu m]$	l $[\mu m]$	S $[\mu m^2]$
R_1	26	100	1933	R_1	26	100	1933
R_2	26	100	2666	R_6	26	224	1933
R_3	26	100	2979	R_7	26	466	1933
R_4	26	100	6105	R_9	26	1940	1933
R_5	26	100	7239	-	-	-	-

Los resultados para Z y θ vs $Frecuencia$, para cinco estructuras con una longitud de $\sim 100\mu m$ y área transversal distinta se muestran en la gráfica de la Figura 2.36. De dicha Figura se puede observar que la Z es inversamente proporcional al área de la sección transversal. Aunque θ, solo se ve afectado para frecuencias mayores a $100kHz$, el efecto capacitivo es directamente proporcional al área de la sección transversal.

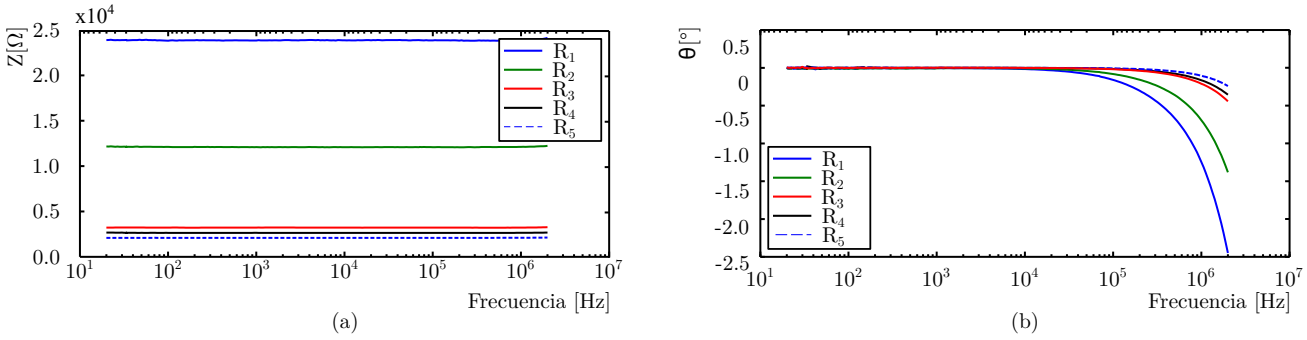


Figura 2.36: Impedancia (Z (a), θ(b)) de distintas estructuras con la misma longitud y diferente área de sección transversal.

Los resultados para Z y θ vs *Frecuencia*, para estructuras con la misma área de sección transversal y cambiando la longitud se muestran en la gráfica de la Figura 2.37. De ésta gráfica se puede observar que Z es directamente proporcional a la longitud de la estructura. En este caso, aunque θ, solo se ve afectado para frecuencias mayores a $100kHz$, el efecto capacitivo es inversamente proporcional a la longitud de la estructura.

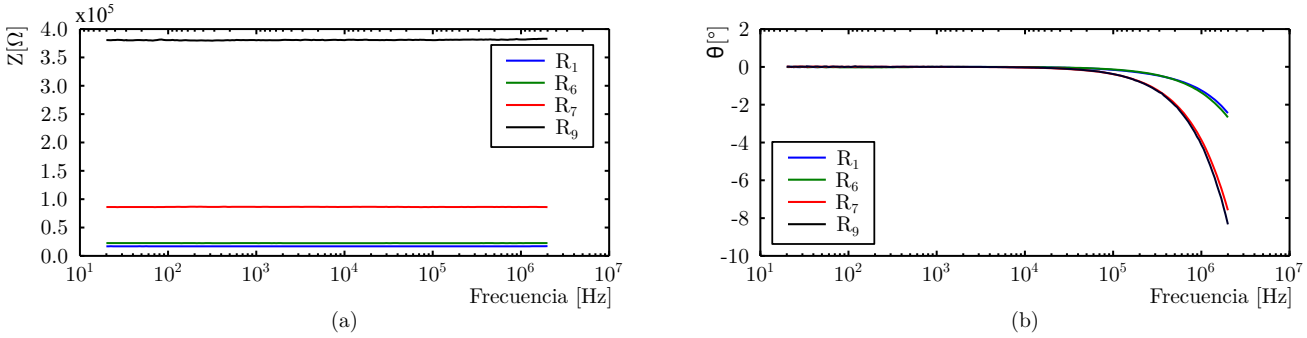


Figura 2.37: Impedancia (Z (a), θ(b)) de una estructura con la misma área de sección transversal y distinta longitud.

Por lo tanto, para las estructuras de carbón, si se requiere cambiar la impedancia de la estructura se puede modificar el ancho o bien el largo, según sea el caso deseado para la aplicación requerida.

2.5.2.2. Microelectrodos de plata

Para caracterizar los microelectrodos de plata, se aplicó una señal sinusoidal de $0.5V$ a $2V$ en un rango de $20Hz$ a $2MHz$. Los resultados para Z y θ vs *Frecuencia*, para dicha prueba, se muestran en la Figura 2.38. Se puede observar que Z es similar para las distintas amplitudes de la señal aplicada. θ se ve afectado para frecuencias mayores a $100kHz$, en este caso se puede observar que θ es positivo por lo que el efecto es inductivo.

En la Figura 2.39 se muestra el comportamiento para Z y θ para microelectrodos de carbon y plata respectivamente (Ver recuadros de la Figura 2.39a). Se observa que en el caso del microelectrodo de carbón, el comportamiento se puede ajustar a un modelo eléctrico de un circuito RC en paralelo; mientras que para los microelectrodos de plata, a un modelo R-L en serie, tal como se muestra en la Figura 2.39b

La frecuencia de las señales que se aplican a los microelectrodos, afecta su impedancia, por lo tanto esto debe considerarse según la aplicación para la cual se diseñan.

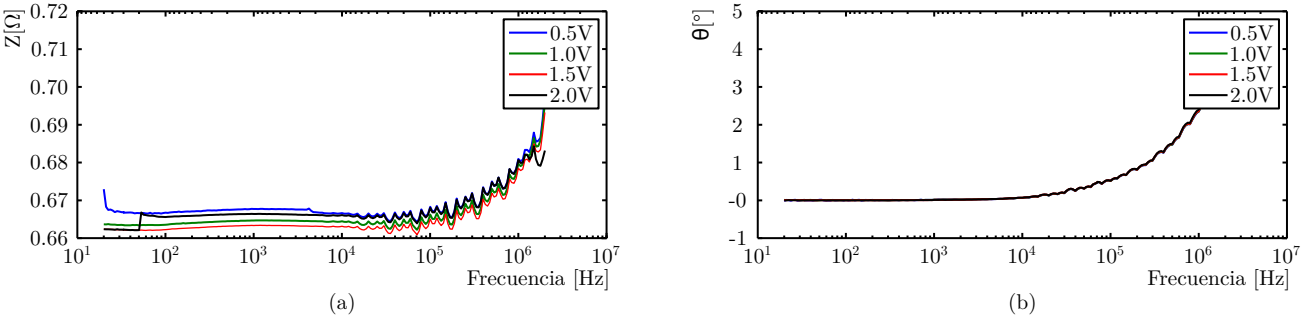


Figura 2.38: Impedancia (Z (a), θ(b)) de un microelectrodo de plata en función del voltaje aplicado.

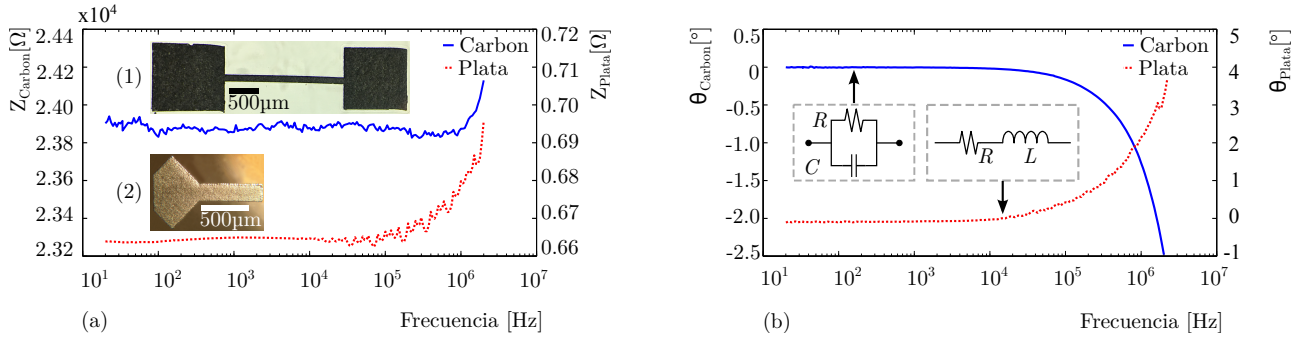


Figura 2.39: Modelo eléctrico para microelectrodos de carbón y plata. (Z (a), θ(b))

2.5.2.3. Microelectrodos de oro

En algunas tiras reactivas para medir glucosa emplean electrodos que están en distintos sustratos y se unen con un cinta para mantener la distancia entre ellos; sin embargo, existen diseños en los que dichos electrodos se integran en un mismo sustrato (ver Figura 3.17a). Debido a las dimensiones del molde (en algunos casos $< 500\mu m$) y al método utilizado para depositar el material conductor, el depósito de distintos materiales en el mismo sustrato es difícil.

Por lo anterior, se diseñaron electrodos de oro y se enviaron a fabricar utilizando un proceso de fotolitografía, para ser empleados con un método amperométrico. La respuesta en impedancia de estos electrodos, es similar a los de plata, tal como se observa en la Figura 2.40. El comportamiento de Z y θ es similar al comportamiento de los electrodos de plata, es decir para frecuencias mayores a $100kHz$ muestran un efecto inductivo, debido a que ambos materiales son buenos conductores, no así el caso del carbón, que es más resistivo. Además, debido a su baja impedancia, estos electrodos son ideales para aplicaciones como amperometría y voltamperometría.

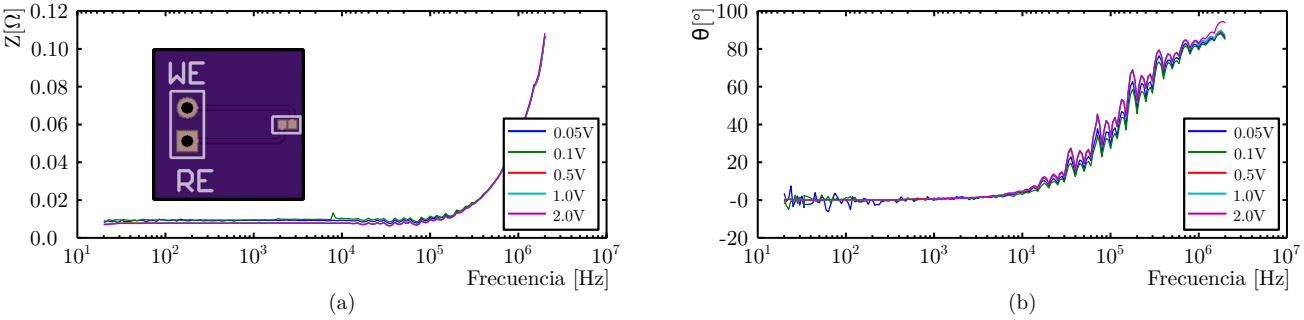


Figura 2.40: Impedancia (Z (a), θ(b)) de un microelectrodo de oro en función del voltaje aplicado.

Además, es importante conocer cual es el comportamiento de éstas estructuras en distintas condiciones, como humedad y temperatura, entre otras cosas, debido a que muchas aplicaciones requieren que estos microelectrodos se expongan a estas condiciones, por lo tanto se probaron como se describe a continuación.

2.5.3. Respuesta en condiciones de humedad

Los microelectrodos de carbón son sensibles a la humedad, por lo que la impedancia total del sistema se puede afectar a través del tiempo. Por esta razón, se hicieron una serie de mediciones para observar la impedancia. Se depositó una gota de agua destilada de $1\mu L$ sobre el electrodo de carbon (Figura 2.39a-1) y luego se realizó una serie de mediciones de impedancia. El microelectrodo utilizado (Figura 2.39a-1), consiste en una línea de $2mm$ de longitud y $100\mu m$ de ancho, unido por dos puntos de contacto cuadrados de $1mm$ x $1mm$. Se observó que la mayor diferencia de $\Delta\theta$ esta entre 80 y $300Hz$, mientras que la mayor diferencia ΔZ es para frecuencias mayores que $10kHz$. Z se decrementa debido a la resistencia (R_w) y a la capacitancia (C_w) causada por la gota de agua, y retorna a su valor inicial (R_e) cuando la gota de agua se evapora (Figura 2.41a).

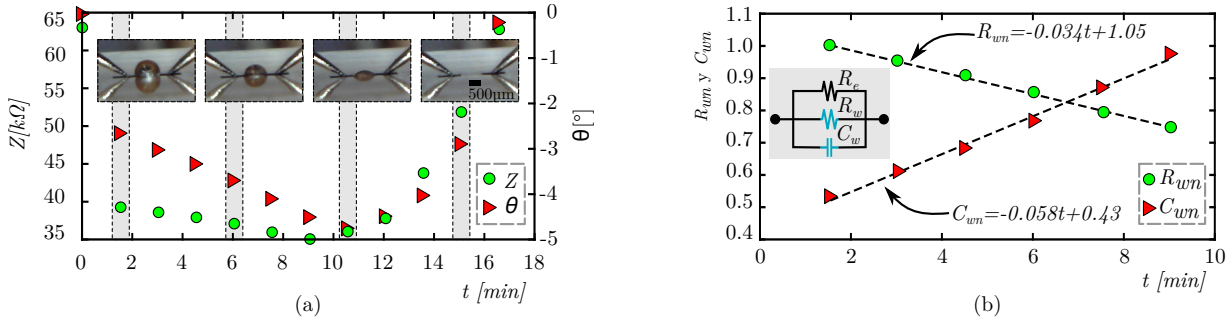


Figura 2.41: (a) Impedancia del microelectrodo de carbón (Figura 2.39a-1) a través del tiempo cuando una gota de agua se deposita sobre el microelectrodo y (b) R_w y C_w normalizados.

En la Figura 2.41b se muestra en el modelo eléctrico cuando la gota se deposita sobre el microelectrodo; R_w y C_w se calcularon de las mediciones (Figura 2.41a) y normalizaron como: $R_{wn} = \frac{R_w - R_0}{R_0}$ and $\theta_{wn} = \frac{\theta_w - \theta_0}{\theta_0}$. Se observa que en los primeros 9 minutos C_{wn} se incrementa 2.8 % cada minuto, mientras que R_{wn} 1.7 %. Por lo tanto, este comportamiento en la impedancia debe considerarse en un proceso de medición que toma más de un minuto y menos de nueve.

En la Tabla 2.4, se resume el comportamiento eléctrico (Z, θ) de los electrodos de carbón, plata y oro en función del voltaje o frecuencia de operación. Entonces, dicha tabla se puede usar para elegir el material del electrodo según la aplicación para la cual se diseña.

Aplicaciones como amperometría y voltamperometría cíclica realizan la medición de una corriente en función del voltaje aplicado a una muestra, empleando una señal de voltaje de corriente directa; por lo tanto, para estas aplicaciones, es importante considerar que la impedancia es afectada por los niveles de voltaje aplicado a los electrodos, sobre todo si se emplean electrodos de carbón. Para aplicaciones que emplean medición de impedancia es importante considerar los niveles de la amplitud y el rango de frecuencias de las señales empleadas en las mediciones. Haciendo las consideraciones previas se podría elegir el material del electrodo.

Tabla 2.4: Comportamiento eléctrico de los electrodos.

		Carbón	**Plata**	**Oro**
Z	V	1.26 % @ $0.5V$	0.4 % @ $0.5V$	0.5 % @ $0.5V$
	$20Hz$ a $100kHz$	Constante $\sim k\Omega$	Constante $\sim m\Omega$	Constante $\sim m\Omega$
	$100kHz$ a $2MHz$	Incrementa 1.8 %	Incrementa 5 %($100m\Omega$)	Incrementa 90 %($100m\Omega$)
θ	V	No afecta	No afecta	No afecta
	$20Hz$ a $100kHz$	Constante $\sim 0°C$	Constante $\sim 0°C$	Constante $\sim 0°C$
	$100kHz$ a $2MHz$	Incrementa hasta $\sim 2°C$	Incrementa hasta $\sim 4°C$	Incrementa hasta $\sim 80°C$
Permeable		Si	No	No
Modelo eléctrico		RC en Serie	RL en Paralelo	RL en Paralelo

En el apéndice F, se describen algunas aplicaciones adicionales utilizando electrodos de carbón y plata producidos en el presente trabajo.

2.6. Discusión

En este capítulo se han presentado tres métodos para producir electrodos en sustratos de PMMA y PDMS.

El método de molde replica, no resultó conveniente, principalmente por el termoplástico que nosotros usamos para hacer el molde maestro; además, depositar material conductor en un molde de PDMS presenta dificultades por ser hidrofóbico. Llenar un canal en PDMS con material conductor, usando la técnica de doctor blade, presenta dificultades y la limpieza de las muestras también se dificulta; por lo que no es ideal para propósitos del presente trabajo.

El PDMS tiene la ventaja de replicar siempre de manera similar las estructuras del molde maestro, pero debe elegirse apropiadamente el material del molde maestro; tal material puede ser de latón, aluminio u otro material que no se deforme a temperaturas cercanas a $100°C$, debido a que para polimerizar el PDMS se emplean temperaturas $\sim 70°C$. Además, debe cuidarse la rugosidad de dicho molde, si se desean ensamblar posteriormente las estructuras hechas a partir de él.

El método de microfresado sobre sustratos de PMMA resultó un método rápido pero no repetible, debido a que evitamos hacer un maquinado inicial sobre toda la superficie para establecer una coordenada inicial en Z (Z_0); esto principalmente por la rugosidad que deja el cortador y debido a la necesidad de tener un sustrato libre de rugosidad para ensamblar con otro sustrato. Sin embargo resultó un método útil para producir un prototipo rápido.

El método para producir electrodos sobre un sustrato de PMMA, utilizando microfabricación láser, ha resultado una técnica que nos permite producir estructuras con geometría controlada; sin embargo, para producir estructuras con éste método, se requiere tiempo de grabado, además de que las estructuras en diferentes sustratos, no tienen el mismo perfil, haciendo que el volumen del material depositado cambie y finalmente modifique la impedancia de la estructura.

Por otro lado, los electrodos producidos con fotolitografía en una tarjeta PCB, son una buena alternativa, sin embargo están limitados para integrarlos con un canal para el transporte

de fluidos, debido la rugosidad en la superficie, a la tinta que el fabricante utiliza como aislante y al relieve mismo del conductor sobre el sustrato.

La elección del método que debe usarse para producir un molde depende de la aplicación que se quiere implementar, del nivel de integración al que se requiere llevar la microestructura producida, el costo, la velocidad a la cual se tiene el dispositivo terminado, material y equipo disponible. Cuando se requiere crear una estructura tridimensional en un sustrato de PDMS, de manera rápida y a bajo costo, elegir el método de molde réplica mediante un molde maestro hecho con el termoplástico shrinky dinks, es una muy buena alternativa, sobre todo si la repetibilidad es más importante que la exactitud de patrón transferido, en base al diseño. Además, debido a la gran capacidad de replicar un molde maestro, el PDMS es una excelente elección como material de sustrato. Por otro lado, si se prefiere el control de profundidad y una resolución en el orden de los micrómetros, la microfabricación láser es una excelente alternativa; sin embargo, esta técnica se realiza en sustratos de PMMA y el tiempo del proceso es mayor. Finalmente, si se prefiere una estructura hecha en un molde de PMMA, latón, aluminio u otro sustrato, el microfresado es la opción más conveniente.

Cuando se elige el material con el cual deberá estar hecho el electrodo, se debe considerar el método de depósito de dicho material, el sustrato, el material y equipo disponible. Por ejemplo, para depositar una pasta de carbón, es más fácil hacerlo en un molde de PMMA preparado mediante microfresado y usando la técnica de doctor blade, debido a la viscosidad del material; Para depositar tinta de plata, es mejor hacerlo en un molde preparado mediante microfabricación láser, debido a la profundidad del pozo y a que los solventes de la tinta se evaporan, lo que permite depositar una película en pocos minutos.

Aunque la técnica doctor blade no requiere de una máscara para hacer el depósito del material conductor, es un método accesible y rápido, existen otros métodos, como la pulverización catódica; este método requiere del uso de una máscara para depositar de manera selectiva una película del material conductor sobre el sustrato de interés. Este método no es de bajo costo, aunque es compatible con otros sustratos y el espesor de la película que se deposita es controlable; por lo tanto, los electrodos son repetibles.

En el capítulo siguiente se presenta la aplicación de estas estructuras en el diseño y construcción de un sensor de glucosa.

3 — Aplicación - Glucosa

3.1. Transducción electroquímica

Los biosensores amperométricos funcionan debido a la producción de una corriente cuando un potencial es aplicado entre los electrodos. Una de las aplicaciones de este tipo de biosensor es la determinación de las concentraciones de glucosa, mediante el uso de una membrana de glucosa oxidasa inmovilizada. La reacción resulta en una reducción de la concentración de oxígeno (3.2) mientras éste se difunde a través de la membrana biocatalítica al cátodo, siendo esto detectado por una reducción de la corriente entre los electrodos.

Existen tres tipos de transductores que pueden ser empleados para medir glucosa: (a) los sensores de oxigeno, miden la concentración de oxigeno y la convierten en una corriente.; (b) los sensores de pH, miden la producción de ácido glucónico y convierten este cambio de pH en una diferencia de potencial; y (c) sensores de peróxido, los cuales miden la concentración de peróxido y la convierten en una corriente.

En el primer electrodo de enzimas de Clark, la enzima glucosa oxidasa, era mantenida junto a un electrodo de platino entre membranas de teflón; la glucosa oxidasa se encarga de catalizar la reacción (ecuación 3.1), lo que produce ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (H_2O_2); el peróxido de hidrógeno es oxidado a $700mV$ (versus a un electrodo de referencia de calomel saturado) sobre la superficie del electrodo de platino, produciendo una corriente eléctrica que es directamente proporcional a la cantidad de glucosa en la muestra. Muchos sensores comerciales aún utilizan este principio. La membrana permite eliminar la interferencia debida a otras sustancias electroactivas; el criterio que se debe mantener es que la membrana, permita el paso del peróxido de hidrógeno, pero no de otras sustancias. Además, debe permitir entrar al analito en la capa de enzima.

$$Glucosa + O_2 \quad \underrightarrow{glucosaoxidasa} \quad \text{ácido glucónico} + H_2O_2 \tag{3.1}$$

$$O_2 + 4H^+ + 4e^- \quad \rightarrow \quad 2H_2O \tag{3.2}$$

En 1973, Guilbault y Lubrano describieron un electrodo para medir glucosa en sangre basado en un método amperométrico para medir el producto de peróxido de hidrogeno (ecuación 3.3) en lugar del decaimiento de oxígeno 3.2. Ellos pudieron con este sensor obtener buena precisión y exactitud.

$$H_2O_2 \quad \rightarrow \quad O_2 + 2H^+2e^- \tag{3.3}$$

Se han diseñado sensores de glucosa implantables que realizan una medición de manera periódica. El problema que presentan estos sensores es la saturación de u obstrucción de la membrana entre los electrodos; además, los niveles del oxigeno en los tejidos subcutáneos es

inestable y por ello se deben recalibrar. Así, los sensores de oxígeno son utilizados para medir la disminución de oxígeno, en proporción a la oxidación de glucosa.

Se ha trabajado también con el objetivo de minimizar la dependencia del oxígeno y el nivel de ruido de los electrodos de enzimas, reemplazando el oxígeno en la reacción con electrones (aceptores / donadores), también conocidos como mediadores. Uno de los mediadores mas utilizados es el ferroceno.

Los mediadores tienen un potencial de oxidación mas bajo que el peróxido de hidrógeno, por lo que pueden ser operados a potenciales mas bajos ($200mV$ - $500mV$ versus calomel saturado). Por lo tanto, son menos susceptibles a componentes que producen interferencias electroacivas, como el ácido úrico o el ácido ascórbico, que están presentes en los fluidos corporales.

En el caso del uso de mediadores, la reacción corresponde con la ecuación 3.4

$$Glucosa + 2M^o \quad \xrightarrow{glucosaoxidasa} \quad \text{ácido glucónico} + 2M^r + 2H^+ \tag{3.4}$$

donde: M^o, es la forma oxidada del mediador y M^r es la forma reducida. En la Figura 3.1, se muestra el esquema de la reacción oxidación-reducción.

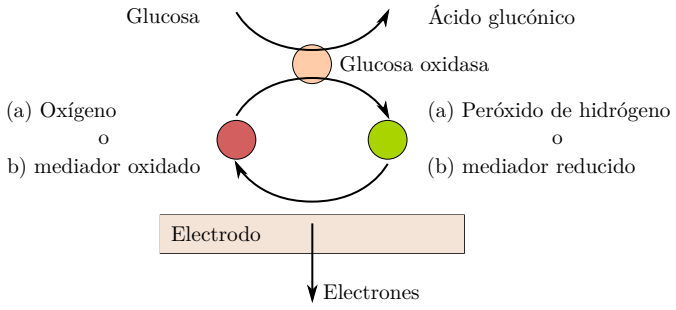


Figura 3.1: Esquema de la reacción oxidación-reducción.

Existen tres generaciones de sensores de glucosa que han sido utilizados a través de los años.

(a) En la primera generación, se utiliza al oxigeno como mediador entre el electrodo y la Glucosa oxidasa. En esta generación se mide el consumo de oxigeno o el aumento del peróxido de hidrogeno. La principal desventaja de esta estrategia es mantener constante la concentracion de oxigeno es difícil.(b) En la segunda generación, se utilizan mediadores artificiales para transportar electrones del centro redox de la enzima a la superficie del electrodo; dichos mediadores son comunmente de hierro derivados de ferricianuro, ferroceno y quinonas.(c) En la tercera generación, se elimina el uso de mediadores, debido a que la enzima se inmoviliza directamente sobre los electrodos. Los métodos de inmovilización de la enzima sobre el electrodo son muy importantes, debido a la distancia entre la capa de enzima y la superficie del electrodo.

3.1.1. Inmovilización de enzima

Como se mencionó, una de las partes más importantes en el diseño y construcción de un sensor enzimático es la inmovilización de la enzima sobre el electrodo; para ello existen distintos métodos. La inmovilización consiste en fijar la enzima sobre el sustrato de interés mediante retención física o mediante una unión química.

3.1.1.1. Retención física

La enzima puede inmovilizarse mediante su retención física en cavidades de una matriz solida porosa, dicha matriz puede ser un prepolímero, como: poliacrilamida, colágeno, alginato, entre otros. Para inmovilizar la enzima, ésta se coloca en una solución de algún monómero, al cual le sigue un proceso de polimerización mediante el uso de temperatura o debida a una reacción química.

También puede inmovilizarse por inclusión en membranas permeables que permiten el paso de moléculas y producto, pero no de la enzima; o mediante atrapamiento en geles o en fibras. Como sea, siempre debe observarse las condiciones en las cuales la enzima se atrapa, para no degradarla.

La enzima también puede unirse a un sustrato mediante adsorción, que permite la inmovilización a un soporte debido a interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno. Sin embargo, existen factores que influyen en este proceso como el pH del medio, la fuerza iónica, el diámetro del poro en el que se fija, o la presencia de iones.

3.1.1.2. Unión química

La unión química consiste en unir la enzima a soportes inorgánicos u orgánicos, procurando que la inmovilización incremente la afinidad por el sustrato, disminuya la inhibición, amplíe el intervalo de pH y reduzca las posibles contaminaciones microbianas. Las enzimas pueden unirse a estos soportes mediante adsorción iónica o mediante unión covalente.

La unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas. Algunos de los aminoácidos, que se encuentran en la estructura de las enzimas, más empleados para la formación de enlaces con el soporte son, principalmente: la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina. Algunas ventajas que ofrece este método son que: la carga de la enzima permanece constante después de la inmovilización y existe mayor resistencia a la desactivación por efecto de la temperatura, disolventes orgánico o del pH; sin embargo, se debe conocer la densidad de grupos activos por unidad de superficie, pues esto condiciona el numero de uniones enzima-soporte; además, el proceso de inmovilización puede alterar la estructura del centro activo. Por ello esta técnica no es aconsejable a enzimas sensibles a cambios de pH o fuerza iónica.

También existe un método conocido como entrecruzamiento (cross-linking), que consiste en el uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima. Los reactivos bifuncionales que se pueden emplear son: dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos y sales de bisdiazonio, entre otros. El resultado de este método son enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura. Esto se debe a que con este método se obtiene un entramado cristalino, donde las moléculas de enzima están rodeadas exclusivamente por otras moléculas de proteína.

Para inmovilizar la enzima en nuestros electrodos, empleamos retención física, aprovechando el hecho de que preparamos el material conductor para nuestros electrodos, el cual consiste en una pasta hecha a base de grafito. También empleamos la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa mediante atrapamiento en gel.

Muchos métodos electroquímicos han sido publicados para medir glucosa, con diferencias en las técnicas para elaborar electrodos, en los materiales con los cuales se elaboran los electrodos, y en los métodos para inmovilizar la enzima; sin embargo debido a la especificidad, dicha enzima sigue siendo utilizada en la mayoría de los casos.

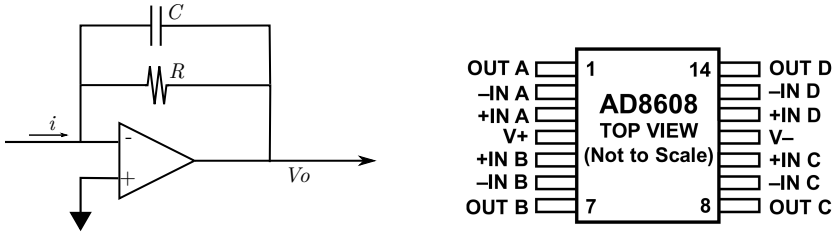
Además, existen diferentes técnicas que pueden ser utilizadas para cuantificar la señal que se obtiene de los electrodos utilizados para medir glucosa. Una de las técnicas más utilizadas es la amperometría, aunque la voltamperometría también puede ser utilizada. El presentado en este trabajo emplea la amperometría; por ello, se presenta a continuación el circuito diseñado para tal propósito.

3.2. Obtención de señales

Existen instrumentos comerciales que se pueden utilizar para medir o registrar una pequeña señal de corriente eléctrica producida por un sensor electroquímico, tal como una tira reactiva de un glucómetro comercial. Los sensores amperométricos producen una señal de corriente eléctrica pequeña, en el orden de los pA o μA. Estas corrientes pueden ser medidas con: (a) un amperímetro, (b) por una unidad de medición de (SMU, *source measure unit*) de Keithley, (c) o por un circuito que sea capaz de convertir una señal de corriente a voltaje y luego utilizar un voltímetro u osciloscopio. En el presente trabajo utilizamos una unidad SMU 2450 de Keithley para medir y registrar dichas corrientes, además implementamos un circuito electrónico capaz de convertir las señales de corriente de un sensor de glucosa a una señal de voltaje, que pudo ser registrado con un osciloscopio. Además, se implementó un circuito para procesar estas señales utilizando un microcontrolador y comunicado mediante una interfaz de bus serial a la computadora, la cual procesó dicha información.

En electrónica existen distintos circuitos y configuraciones que pueden ser utilizados para registrar la corriente producida por un sensor. Uno de los principales circuitos integrados utilizados es el Amplificador Operacional (OpAmp). Los amplificadores operacionales pueden ser operados en distintas configuraciones, según la aplicación deseada; por ejemplo, pueden ser usados, entre otras funciones, para: sumar, restar, integrar o amplificar señales de voltaje. En el caso de los sensores que entregan corriente, la configuración que se emplea es conocida como transimpedancia, la cual se utiliza para convertir una señal de corriente a voltaje.

En la Figura 3.2 se muestra el diagrama electrónico de un circuito amplificador en una configuración de transimpedancia, utilizada en el presente trabajo. El circuito integrado que se utilizó es el AD8608; con 4 amplificadores operacionales internos.



(a) (b)

Figura 3.2: Circuito de transimpedancia (a) y amplificador operacional (b).

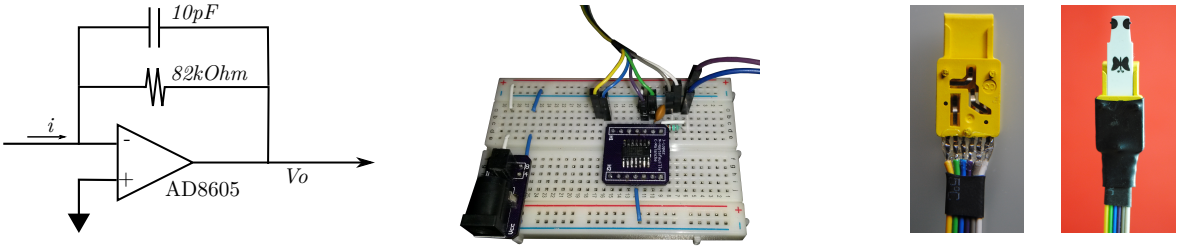
Para hacer el análisis de circuitos con amplificadores operacionales, se hacen dos consideraciones: (a) la impedancia de entrada de dicho circuito es muy alta y, (b) que el potencial en las terminales inversora y no inversora es similar, por lo tanto, el único lazo por el cual circula corriente es por la resistencia; entonces, el voltaje de salida se puede calcular como se muestra en la ecuación 3.5.

$$V_o = Ri \tag{3.5}$$

donde: V_o, es el voltaje de salida; R, es la resistencia de ganancia del circuito; C, un capacitor para estabilidad del circuito e; i, la corriente proveniente del sensor.

La mayoría de los glucómetros comerciales, por ejemplo FreeStyle InsuLinx, miden la concentración de glucosa de una muestra sanguínea utilizando un sensor enzimático y empleando un método amperométrico. Este tipo de sensores emplean un circuito similar al que se muestra en la Figura 3.2.

Para mostrar la forma de estas señales, (a) se utilizó un circuito de transimpedancia con ganancia de $82k\Omega$ (Figura 3.3a); (b) se usó un OpAmp AD8608, montado en una tarjeta de circuito impreso (PCB, *Printed Circuit Board*) (Figura 3.3b); (c) el circuito se conectó a una tira reactiva comercial mediante un conector recuperado de un glucométro (Figura 3.3c) y, (d) mediante un osciloscopio se registró una serie de señales de voltaje para distintas concentraciones de una muestra de agua con glucosa ($60 - 220mg/dL$) (Figura 3.4).



(a) (b) (c)

Figura 3.3: Circuito de transimpedancia (a) montado en una tablilla de prueba (b) y conector para una tira reactiva (c).

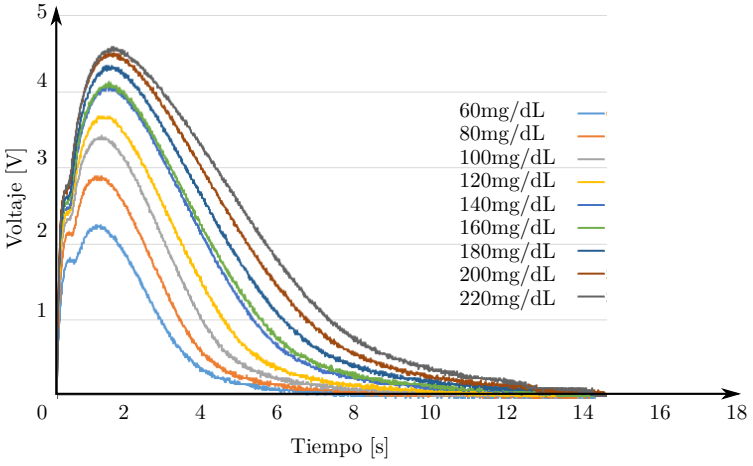


Figura 3.4: Voltaje vs Glucosa.

Las muestras de agua con glucosa se prepararon mediante el procedimiento que se muestra en el apéndice D.

De la Figura 3.4 se observa que cada curva tiene un valor máximo diferente en función de la concentración de glucosa. Para ver con mayor claridad dichos cambios se puede hacer un cálculo del área bajo cada curva y comparar dichos valores. Cada curva consta de una serie de valores tomados con el osciloscopio de manera regular, con una separación de $10ms$ entre cada medición.

Para cada una de las curvas de la Figura 3.4, se realizó una suma de todos los valores comprendidos entre 0 y 18 segundos mediante la Ecuación 3.6, para calcular un valor de voltaje que corresponde con cada concentración de glucosa en la muestra utilizada.

$$V_{total} = \sum_{i=0}^{1800} V_i \tag{3.6}$$

donde: V_i, es el voltaje correspondiente a cada punto.

Debido a la ganancia del circuito, dada por la resistencia de retroalimentación, las concentraciones altas producen una señal de salida que puede saturar el circuito y las concentraciones muy bajas pueden producir señales con una amplitud en el orden de los mV; por lo tanto, en el diseño del circuito debe elegirse apropiadamente el OpAmp que debe utilizarse, considerando la ganancia del circuito y los niveles de voltaje de alimentación del circuito.

Realizando la suma de todos los valores comprendidos entre los límites definidos en la ecuación 3.6 se obtiene la gráfica que se muestra en la Figura 3.5, a la cual se le puede ajustar una curva que puede ser usada para interpolar un valor de voltaje para conocer una concentración dada. A ésta curva de ajuste se le conoce como curva de calibración del sensor y de ella se pueden conocer los límites de detección del sensor.

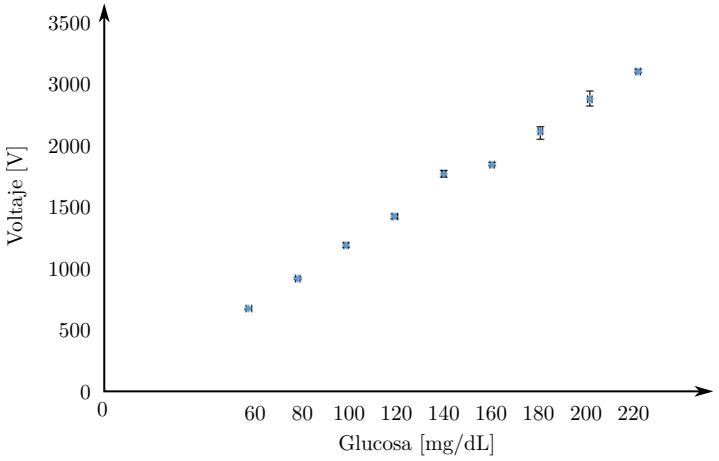


Figura 3.5: Voltaje total vs Glucosa.

El circuito presentado en la Figura 3.3 se puede utilizar con un osciloscopio, sin embargo para no depender de dicho instrumento se requiere de un circuito que sea capaz de procesar dicha señal. Si bien es cierto que la señal entregada por el circuito es medible, es una señal analógica, por lo tanto hacen falta algunas etapas adicionales tales como:

- Convertir la señal de voltaje a una señal digital mediante un convertidor analógico-digital (ADC, *Analog to digital converter*);
- Leer y procesar la señal digital mediante un microcontrolador;
- Comunicar el dato a una computadora o dispositivo móvil de manera cableada o inalámbrica y;
- Procesar la información mediante un software, lo cual implica, leerla, procesarla, almacenarla, desplegarla y comunicarla;

De esta manera, el sistema electrónico quedaría representado como en el diagrama de la Figura 3.6.

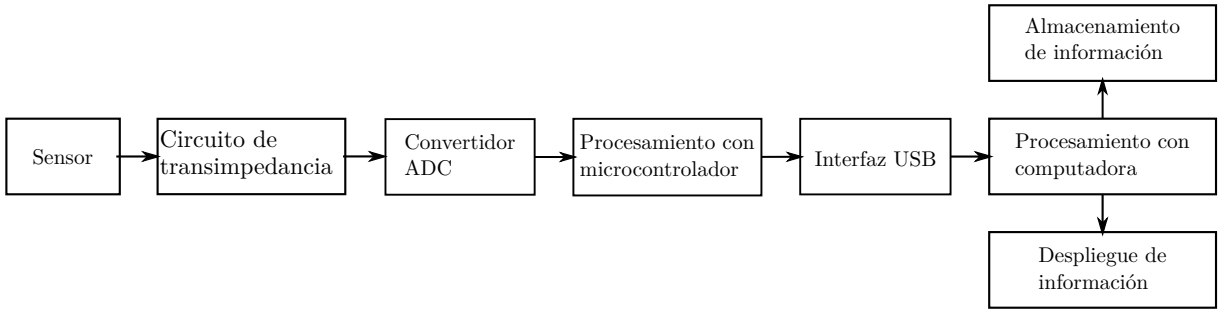
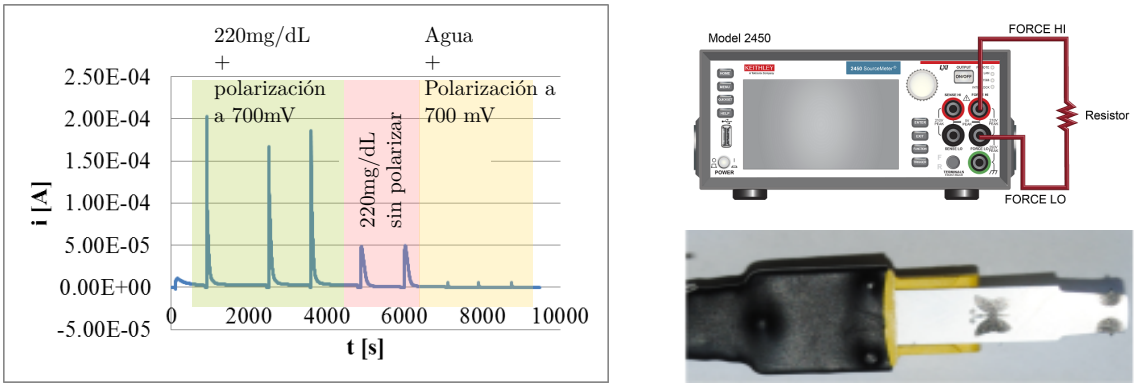


Figura 3.6: Diagrama a bloques del sistema electrónico para procesar las señales de un sensor de glucosa.

3.2.1. Polarización de electrodos

Como se mencionó, la enzima glucosa oxidasa tiene un potencial de oxidación alrededor de $700mV$. Para observar el comportamiento de la corriente de salida del sensor se conectó una tira comercial al equipo SMU 2450 (Figura 3.7b). Con dicho equipo se pueden medir corrientes en un rango de pA a A. Mientras este equipo mide la corriente resultante del sensor, puede suministrar simultáneamente una señal de voltaje entre las terminales de los electrodos; además permite hacer un registro de hasta 100,000 datos.



(a) (b)

Figura 3.7: Respuesta de un sensor comercial cuando se polariza el electrodo. (a) Corriente de producida por una tira reactiva medida con equipo comercial SMU (b).

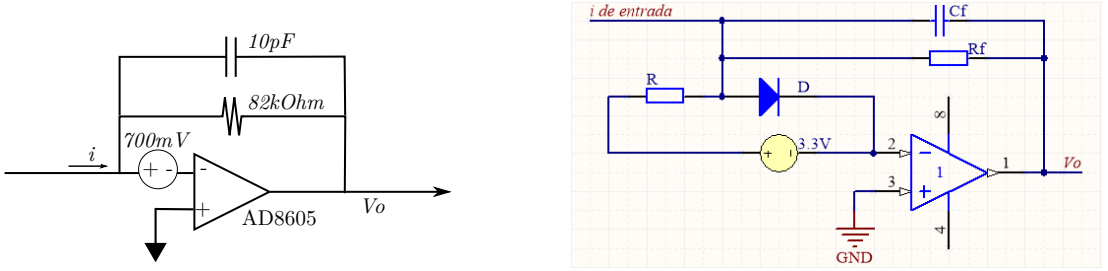
Conocer el efecto que tiene el voltaje de polarización sobre la magnitud de corriente que entrega el sensor, nos permite calcular la ganancia requerida por el circuito electrónico de transimpedancia (subsección 3.2.2), para convertir la señal de corriente a una señal de voltaje de salida en un rango que pueda ser leída y procesada por un microcontrolador. Para estudiar el efecto de la polarización, se utilizó el equipo SMU para aplicar el voltaje de polarización al sensor y medir corriente simultáneamente, tal como se muestra en la Figura 3.7. Para ello, se realizaron las siguientes pruebas.

- Se midió la corriente del sensor para una muestra de glucosa con $220mg/dL$ usando una tira reactiva comercial y polarizando los electrodos a $700mV$.
- Se midió la corriente del sensor para la misma muestra, pero sin polarizar.
- Finalmente, polarizando los electrodos se midió una muestra de agua.

En la gráfica de Figura 3.7a, se puede observar que el nivel de corriente producido por el sensor se incrementa de manera considerable (4 veces más la magnitud que cuando no se polariza) cuando se polariza; además, se puede observar que aún en presencia de dicho potencial en los electrodos, cuando se mide una muestra sin glucosa, esta no tiene efecto sobre la señal de salida del sensor.

3.2.2. Medición con un sensor

Como se mencionó previamente, la enzima glucosa oxidasa tiene un potencial de oxidación, alrededor de $700mV$, entonces este voltaje debe ser suministrado por el circuito; por tal motivo, en el diagrama de Figura 3.8a se muestra una fuente de $700mv$.



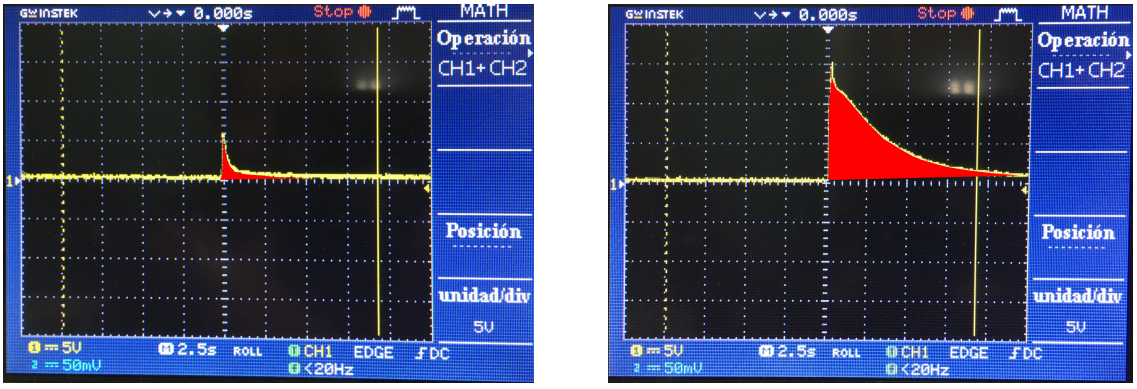
(a) (b)

Figura 3.8: Circuito utilizado para polarizar un electrodo de trabajo. (a) circuito de transimpedancia y (b) polarización con una fuente de 700 V.

En la Figura 3.8b, se muestra un circuito en el que se observa un diodo conectado entre la terminal inversora del OpAmp y el lazo de retroalimentación. El propósito de tal configuración es utilizar dicho componente (1N4728A) como un regulador de voltaje de $700mv$. La ventaja que ofrece esta configuración es que el voltaje se mantiene fijo, aún si la batería se descarga hasta un valor cercano al voltaje de polarización del diodo.

Uno de los efectos que tiene el voltaje de polarización mencionado, es que la magnitud de la corriente es mayor; por lo tanto la magnitud de la corriente para concentraciones menores es más fácil de leer. Lo anterior hace que la señal de salida del circuito se sature para concentraciones altas. Para resolver este inconveniente, sobre todo si se quiere medir concentraciones en un rango entre $5mg/dL$ y $300mg/dL$ (Figura 3.9), se debe aumentar el voltaje de alimentación de los circuitos integrados. Sin embargo, esto también presenta otro inconveniente, y es que la mayoría de los microcontroladores que tienen un ADC interno, solo toleran voltajes hasta de $5V$. Por lo tanto, es necesario el uso de ADCs que toleren señales de voltaje con amplitudes hasta de $20V$, tal como el AD574AJN, el cual es un ADC de 12 bits con un bus de interfaz paralelo compatible con microcontroladores. Considerando lo anterior, en el presente trabajo se ha implementado el uso de un circuito ADC acoplado con el circuito de transimpedancia mencionado previamente.

De la Figura 3.9, se puede observar que la amplitud máxima para la muestra con $2.5mg/dL$ es de $\sim 5V$, mientras que para la de $300mg/dL$, de $\sim 16V$; por lo que el circuito ADC usado puede procesar dichas señales sin perder información.



(a) (b)

Figura 3.9: Señal de salida para dos muestras de agua con glucosa de (a) $2.5mg/dL$ y (b) $300mg/dL$.

3.2.3. Medición múltiple

Por otro lado, planteamos reducir el error en las mediciones a través de la implementación de 4 electrodos en un mismo sustrato, mediante una medición simultánea y obteniendo la media aritmética (3.7) de las cuatro mediciones.

La media aritmética de una muestra de n valores, $x_1, x_2, \ldots, x_n$, se define como:

$$\overline{x} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} x_i \tag{3.7}$$

donde: n, es el número de valores; y x_i, el *i-esimo* elemento. La media aritmética, es una variable que depende de la muestra y tiene generalmente una varianza (3.8) menor que las variables usadas para su cálculo. Cuanto mayor es la muestra, su valor se aproxima con precisión al valor de la media poblacional.

La varianza, es una medida de dispersión que indica que tan alejada o cercana están los valores de una variable con respecto a la media y se define como:

$$s^2 = \frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n}(x_i - \overline{x})^2 \tag{3.8}$$

donde: n, es el número de valores; x_i, el *i-esimo* elemento; y $\overline{x}$, es la media aritmética. De la ecuación (3.8) se puede calcular otra medida de dispersión, la desviación estándar, que es la raíz cuadrada positiva de la varianza y se denota por s. Es usual emplear estas medidas de dispersión para conocer la desviación que tienen los datos con respecto a la tendencia central. Así, si los datos son cercanos entre ellos, la desviación respecto a la media es menor y entre mayor número de datos, la desviación es menor.

Lo anterior implica que el circuito emplee 4 configuraciones idénticas para procesar las señales y enviarlas mediante una interfaz USB a una computadora, tal como se muestra en el diagrama de la Figura 3.6.

Considerando que el ADC utilizado tiene una interfaz paralela de 12 bits de datos y 2 bits de control, es necesario contemplar que se necesitan al menos 56 líneas de conexión disponibles en el microcontrolador. Para resolver el planteamiento anterior, en el presente trabajo se utilizaron dos microcontroladores ATMEGA2560 (Arduino Mega), uno de los cuales funciona como un nodo maestro y el otro como esclavo. La comunicación entre ambos se hizo con el protocolo de

comunicación serial I2C. El módulo maestro comunica los datos a una computadora portátil mediante el puerto USB.

En la Figura 3.10, se muestra el circuito utilizado para procesar la señal de 4 sensores de glucosa de manera simultánea y comunicar los datos a la computadora, la cual los procesa mediante un software implementado con Python. La interfaz gráfica de usuario de esta aplicación se muestra en la Figura 3.11.

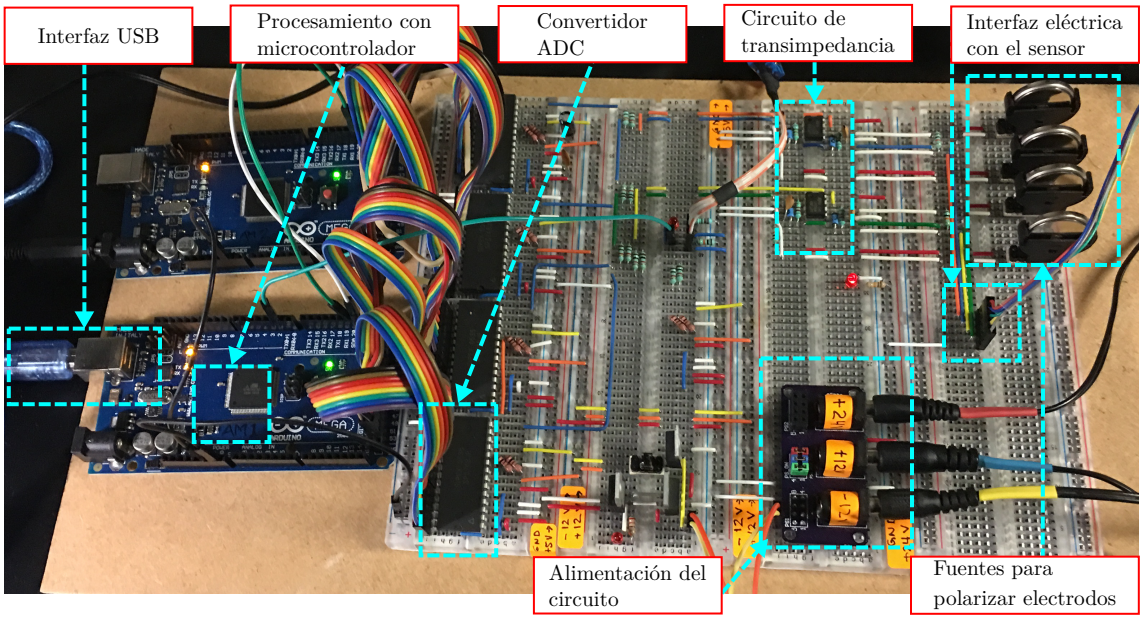


Figura 3.10: Circuito utilizado para procesar la señal de 4 sensores de glucosa de manera simultánea.

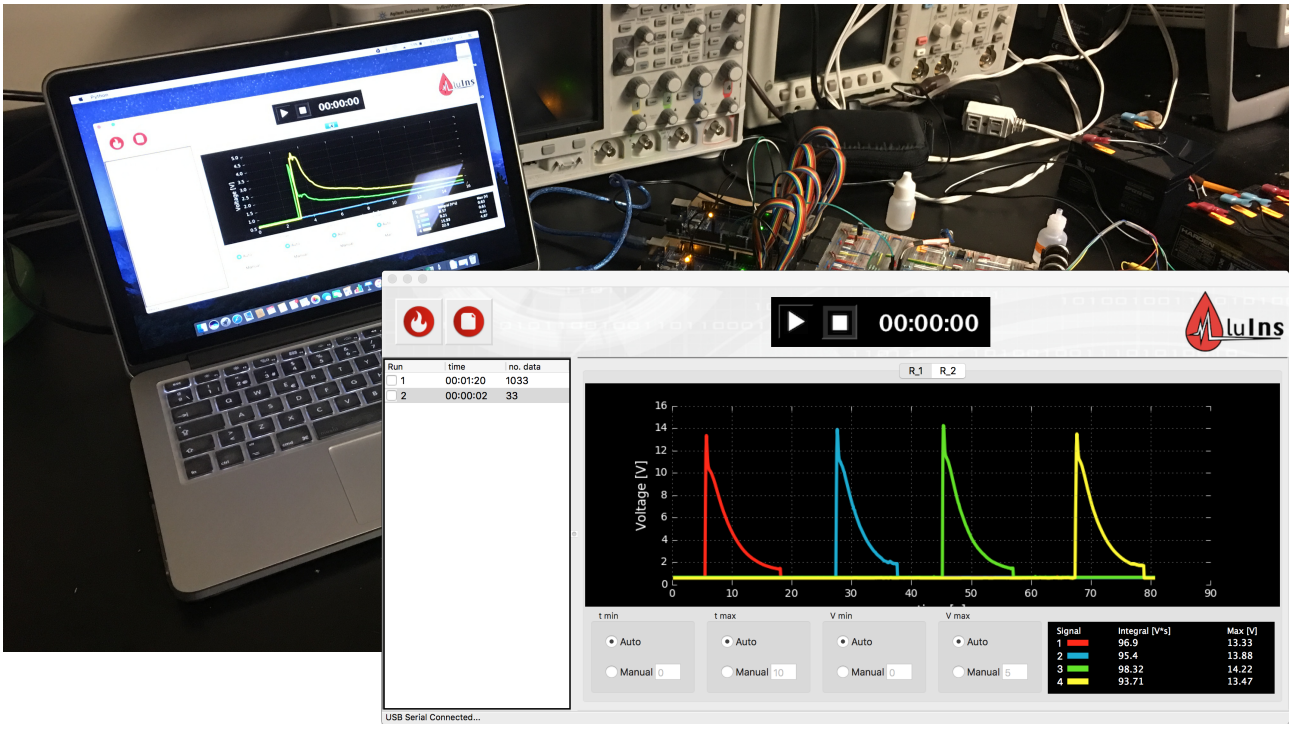


Figura 3.11: Aplicación para procesar la señal de cuatro sensores de glucosa de manera simultánea.

En la Figura 3.11, se muestra una interfaz en la que los datos obtenidos a través del puerto

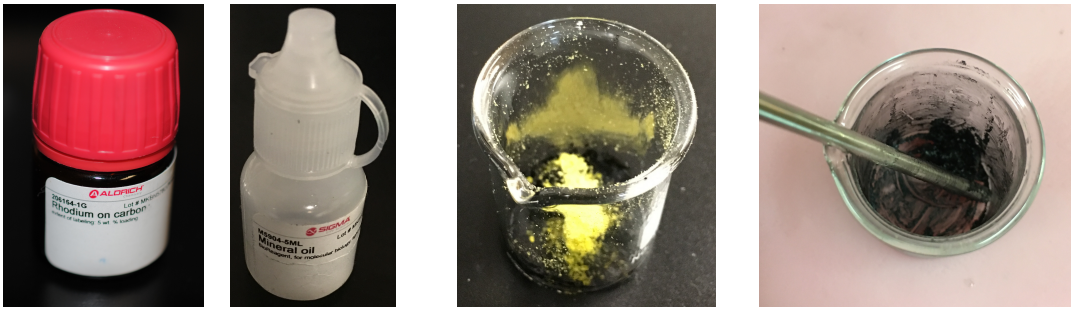
USB son graficados y procesados con la ecuación 3.6. Los datos además se pueden: almacenar en un archivo con formato **.csv*, leer de un archivo y graficar.

3.3. Electrodos

El método amperométrico utiliza un electrodo de trabajo y uno de referencia. En el presente trabajo se prepararon electrodos de trabajo de pasta de carbón y electrodos de referencia de plata. Para ello, se utilizaron tres métodos presentados en el Capítulo 2. Para los electrodos de carbón, se utilizó un procedimiento para sensibilizar la pasta de carbón antes de ser utilizada para llenar los moldes respectivos.

3.3.1. Sensibilización de electrodos

Primero se preparó una pasta hecha a base de rodio en carbón (parte No. 266164), glucosa oxidasa tipo VII (parte No. G2133) y aceite mineral (parte No. M5904), tal como se describe en [88]. Se pesó rodio en carbón y aceite mineral en una proporción (40:60 w/w), tal como se indica en [88], sin embargo, utilizando tales proporciones no es posible elaborar una pasta homogénea. Entonces se pesó en una báscula analítica $40mg$ de rodio en carbón, $88mg$ de aceite mineral y $9.8mg$ de glucosa oxidasa. Todo se juntó en un vaso de precipitado y se mezcló utilizando una varilla durante 20 minutos, hasta lograr una pasta uniforme, tal como se muestra en la Figura 3.12d.



(a) (b) (c) (d)

Figura 3.12: Elaboración de pasta (d) hecha con (a) rodio en carbón, (b) aceite mineral y sensibilizada con glucosa oxidasa (c).

También se preparó un pasta hecha a base de la pasta conductora de LaserCon, utilizando un procedimiento similar al mencionado previamente. Sin embargo, debido a que este material está hecho a base de resina acrílica y solventes, el tiempo para preparar la mezcla es menor ($\sim 5min$).

También se sensibilizaron los electrodos mediante atrapamiento en gel siguiendo el procedimiento que se describe a continuación:

- Preparar una solución gelatinosa Agua- grenetina (10:1 w/w).
- La temperatura de la solución se ajusta de $35°C$ a $40°C$ para evitar que la enzima se desnaturalice.
- 10 mg de glucosa oxidasa en $100ml$ de la solución acuosa.

- Poner una cantidad de la solución gelatinosa en un vaso de precipitado.
- Sumergir el electrodo de carbón en la solución gelatinosa y dejar reposar por algunas horas (toda la noche).
- Retirar los electrodos y dejar secar.
- Si los electrodos no se van a utilizar, se deben almacenar a $4°C$ en el refrigerador.

Con el procedimiento mencionado previamente, se puede preparar de manera sencilla el material sensibilizado para elaborar el electrodo de trabajo.

3.3.2. Preparación de muestras de solución con glucosa

Las muestras de glucosa se prepararon utilizando diferentes cantidades de glucosa liofilizada (Glucosa-D) (mg/dL) en agua destilada, preparado previamente con buffer salino de fosfatos (PBS, *Phosphate buffered saline*), hidróxido de sodio (NaOH) y ácido clorhídrico para garantizar un $pH = 7.4$, sabiendo que el pH biológico está entre 7.35 y 7.45.

Primero (a) se prepararon disoluciones de agua desionizada con PBS (10:1) ($1000ml$ de agua desionizada : $100ml$ de PBS); (b) se colocaron en una parrilla magnética y se mezclaron con un agitador magnético a $500rpm$ @ $3min$. (c) Se midió el pH de la disolución y se agregaron algunas gotas de HCl a la solución para alcanzar un $pH = 7.4$ (el uso de NaOH, no fue necesario).

Luego de asegurar que la solución de agua desionizada + PBS tiene $pH \sim 7.4$: (a) se pesaron pequeñas cantidades de glucosa-D (2.5, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280 y 300 mg), (b) cada porción se agregó a $100ml$ de la solución preparada previamente, (c) se colocó en una parrilla magnética y se mezcló con un agitador magnético a $500rpm$ @ $3min$, (d) cada muestra se depositó en frascos ambar de $30ml$ y, (e) todas las muestras se almacenaron en un refrigerador a $4°C$.

Finalmente, las muestras fueron medidas con un glucómetro comercial. Es interesante ver que los glucómetros comerciales, tienen discrepancias de hasta 25 % con las soluciones calibradas.

3.3.3. Ensamble de electrodos

Como se mencionó antes, los sensores de glucosa utilizan un par de electrodos, que pueden estar integrados en el mismo o en diferentes sustratos. La dificultad en la preparación de los electrodos depende en gran medida del material del que esta hecho el molde y de las dimensiones de éste. Depositar la pasta de carbón en un molde hecho de PDMS resulta más complicado que llenar un molde hecho en un sustrato de PMMA, debido a la hidrofobicidad del PDMS. Por lo tanto, los moldes que se probaron en PDMS son de mayor dimensión ($\sim 4mm$), que los hechos en moldes de PMMA($< 500\mu m$).

Algunos electrodos comerciales integran dichos electrodos en distintos sustratos y los ensamblan mediante una cinta plástica que se usa para unir y al mismo separar dichos electrodos, para evitar contacto entre los conductores de plata y carbón. Además, dicho separador entre los electrodos sirve para formar un canal fluídico, en el cual se hace llegar la muestra por capilaridad. En la Figura 3.13 se muestra un ejemplo del ensamble de un electrodo comercial de FreeStyle InsuLinx.

Como se muestra en la Figura 3.13a, la muestra sanguínea llega por si misma sobre los electrodos a través de un canal que se forma con el adhesivo. La separación entre ambos



(a) (b) (c)

Figura 3.13: Ensamble de una tira reactiva FreeStyle InsuLinx (a) con electrodos de Ag/AgCl - carbón (b) y dimensiones del área sensibilizada del electrodo de trabajo (c).

electrodos es de $\sim 60\mu m$ y el ancho de canal en particular es de aproximadamente $1.7mm$; en este caso particular, los electrodos son $\geq 4mm^2$, sin embargo hay sensores que emplean dimensiones menores en sus electrodos, además de integrarlos en un mismo sustrato. Como sea, utilizan un principio similar para hacer llegar la muestra sanguínea al área de sensado.

Sabemos que la relación superficie - volumen de los cuerpos, al aumentar su tamaño, disminuye; y del ejemplo previo se puede ver que, cuando las dimensiones de los canales se reducen la relación área superficial - volumen, aumenta; esta relación hace que los efectos superficiales dominen sobre los volumétricos, en un microflujo. En la mecánica de un microflujo dominan otros fenómenos como el flujo laminar, la tensión superficial, la difusión y la capilaridad. En este tipo de sensores se emplea la capilaridad para hacer entrar la muestra hasta el área de monitoreo. La capilaridad le permite al líquido deslizarse en estos microcanales por si mismo, debido a la adhesión con la superficie del canal; por lo tanto, los materiales con los que se forma el microcanal deben permitir tal fenómeno.

De la Figura 3.13 se puede ver que la unión del electrodo de Ag/AgCl y de carbón (Figura 3.13b), se hace de manera indirecta mediante el uso de un adhesivo (Figura 3.13); sin embargo, esta unión podría hacerse directamente entre sustrato y sustrato siempre y cuando: (a) se evite el contacto entre los electrodos, pues esto ocasionaría que la corriente que se mide sea debido a la impedancia del material y al potencial de polarización aplicado entre los electrodos y; (b) exista un canal que haga llegar la muestra hasta los electrodos.

3.3.3.1. Sustratos con un solo electrodo

En el presente trabajo se utilizó una separador adhesivo para unir los electrodos hechos en sustratos de PDMS y PMMA, tal como se muestra en la Figura 3.14. Primero se preparan los electrodos como se muestra en la Figura 2.25, luego el electrodo de plata (Figura 3.14a) se une al electrodo de carbón mediante el uso de cintas adhesivas (Figura 3.14b) para formar un canal de $100\mu m$ x $\sim 2mm$ (Figura 3.14d), el cual sirve como punto de acceso para la muestra. Se logró hacer una separación de 100μ y 200μ entre los electrodos, utilizando una o dos cintas adhesivas para separar los electrodos.

Además, se prepararon micromoldes con microfabricación láser, el cual fue utilizado para preparar microelectrodos para medir glucosa, tal como se muestra en la Figura 3.15. Primero se preparó el micromolde (Figura 3.15a), luego se le hizo una perforación de $550\mu m$ de diámetro (Figura 3.15b), para insertar un alambre de $110\mu m$ (Figura 3.15c), y luego llenar de pasta conductora para tener un microelectrodo con un alambre (Figura 3.15d).

En la Figura 3.16c, se muestran electrodos hechos en sustrato de PDMS, utilizando la pasta

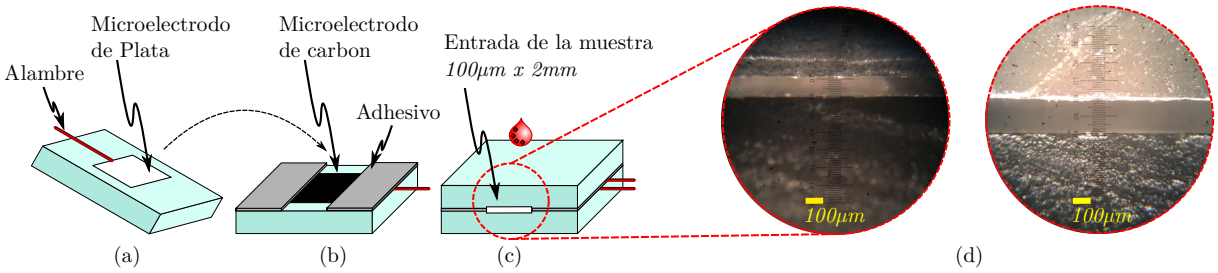


Figura 3.14: Procedimiento de ensamble de un electrodo de plata (a), con un electrodo de carbón utilizando un adhesivo (b) para formar un canal de acceso para la muestra (c-d).

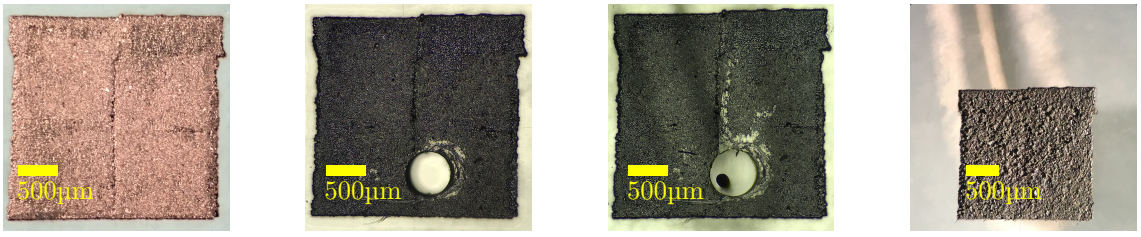


Figura 3.15: Microelectrodos de carbón preparados con la pasta de Lasercon. (a) Sustrato de PMMA grabado, (b) Perforación de 550μm, (c) alambre de 110μm y (d) microelectrodo.

conductora hecha con rodio en carbón, aceite mineral y glucosa oxidasa, en este caso, el aceite mineral por ser hidrofóbico no permite una buena adherencia con el sustrato, además no permite la entrada de la muestra hecha a base de agua y glucosa. Por ello se utilizó un papel como medio para hacer llegar la muestra hasta los electrodos Figura 3.16b. El papel se colocó sobre el electrodo de carbón (Figura 3.16a) y luego sobre el papel se colocó el electrodo de plata. A pesar de los inconvenientes que presenta el uso de esta pasta conductora se puede probar que es posible elaborar electrodos en dicho sustrato.

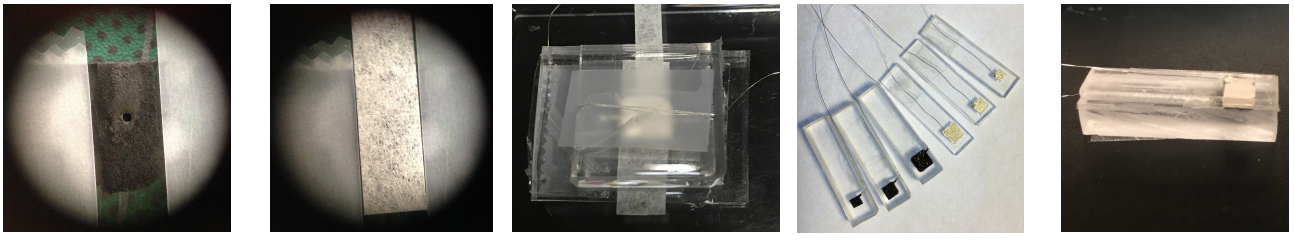


Figura 3.16: Procedimiento para ensamblar electrodos. (a, b) Electrodos en sustrato de PDMS, (d) electrodos en sustratos de PMMA, ensamble de electrodos en sustratos de PDMS (c) y PMMA (d).

Ensamblar electrodos en PMMA (Figura 3.16d) es mas sencillo por ser un sustrato rígido y porque no es hidrofobico como el PDMS. El resultado se puede ver en (Figura 3.16e). Además los electrodos mostrados en la (Figura 3.16e) están hechos con la pasta conductora de Lasercon.

3.3.3.2. Sustrato con dos electrodos

Existen tiras reactivas que integran los electrodos en el mismo sustrato y utilizan un par de cintas adhesivas para formar el canal fluídico por donde entra la muestra, tal como se observa en la Figura 3.17a; en este diseño la distancia entre electrodos no depende del grosor de la cinta,

sin embargo, debido al método utilizado para depositar el material conductor, es muy difícil depositar distintos materiales en el mismo sustrato debido a las dimensiones del grabado con el método de microfabricación láser ($< 500\mu m$).

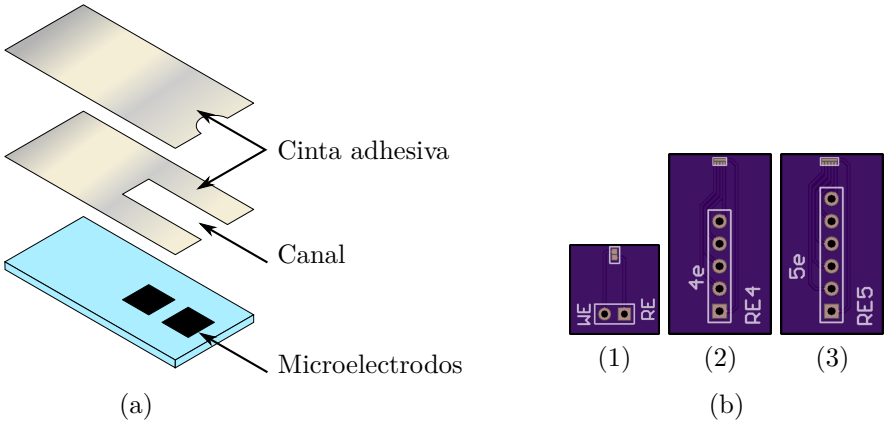


Figura 3.17: Electrodos en una tarjeta de circuito impreso. (a) Ensamble de los electrodos y (b) diseño con 2, 4 y 5 electrodos.

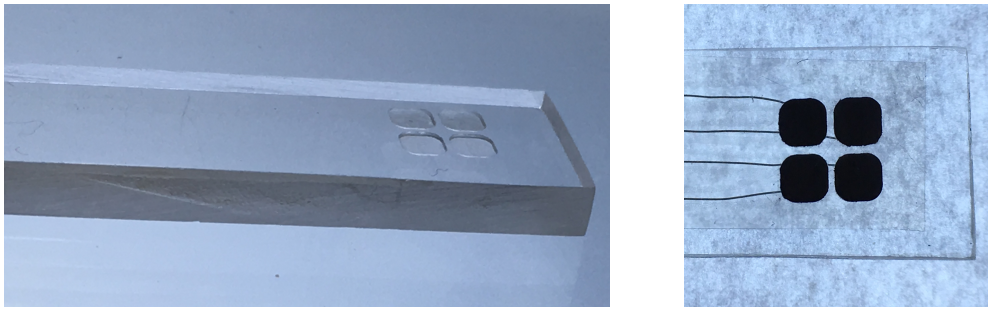
Existen técnicas no enzimáticas, que se pueden utilizar para determinar la concentración de glucosa en muestras, tal como la voltametría cíclica [117], en la que se aplica un barrido de potencial eléctrico entre los electrodos, mientras se mide la corriente resultante del sensor. Esta técnica es muy utilizada para determinar el potencial de oxidación de moléculas, por lo que también puede utilizarse para determinar la concentración de glucosa en una muestra sin utilizar una enzima; sin embargo, esta técnica no es específica, debido a que podrían haber otras moléculas que puedan oxidarse a un potencial similar que la glucosa. Sin embargo, la ventaja que tienen es que pueden utilizarse electrodos del mismo material, por ejemplo plata-plata, como electrodos de trabajo y contraelectrodo. Por tal motivo, se prepararon algunos diseños y se enviaron a fabricar en una tarjeta de circuito impreso (Figura 3.17b). En este caso los electrodos son de oro-oro, tanto los de trabajo como los de referencia. En el diseño que se muestra en la Figura 3.17b se muestra un configuración de dos, cuatro y cinco electrodos. El propósito de integrar más de dos electrodos, es para realizar una medición múltiple.

3.3.3.3. Sustratos con 4 electrodos

En la Figura 2.24, se muestran electrodos hechos en sustrato de PDMS con el método de molde-replica; en dicho sustrato se muestra un arreglo de 4 electrodos, y un canal que los comunica, el cual es utilizado para llevar la muestra a los cuatro electrodos de manera simultánea. El propósito de esta geometría es el de realizar una medición múltiple con la idea de reducir el error.

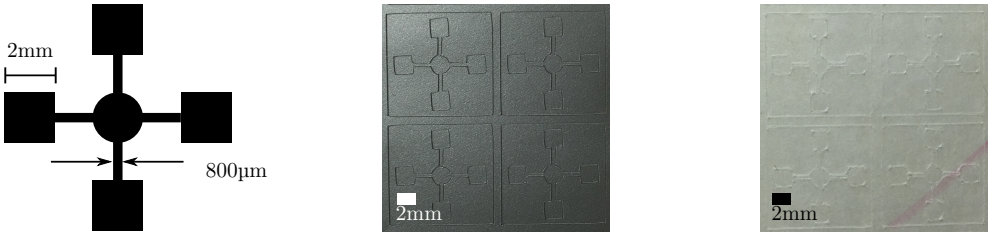
En la Figura 3.18 se muestra un arreglo de cuatro electrodos, hechos en sustratos de PMMA para una medición múltiple, los cuales fueron maquinados con CNC. En este caso, debido a la necesidad de llevar la muestra a los 4 electrodos, se diseñó y se cortó un separador con la geometría deseada para tal propósito y luego se unieron los electrodos. El diseño y corte del material separador se muestra en la Figura 3.19.

Una vez que los electrodos están ensamblados, se midió la impedancia entre ambos electrodos y se verificó que el medidor de impedancias indicara una impedancia de $\sim G\Omega$; además, con el el medidor SMU de Fuentes SMU Keithley, se verificó que entre las terminales no se registrara corriente.



(a) (b)

Figura 3.18: Sustrato con cuatro pozos (a) y cuatro electrodos de carbón para (b).



(a) (b) (c)

Figura 3.19: Diseño (a) y corte de separadores en vinilo (b) y cinta doble cara (c).

3.4. Pruebas funcionales

Para cada prueba, se prepararon muestras de agua destilada con glucosa y PBS; el procedimiento detallado puede consultarse en el apéndice D.

3.4.1. Sustratos con un electrodo

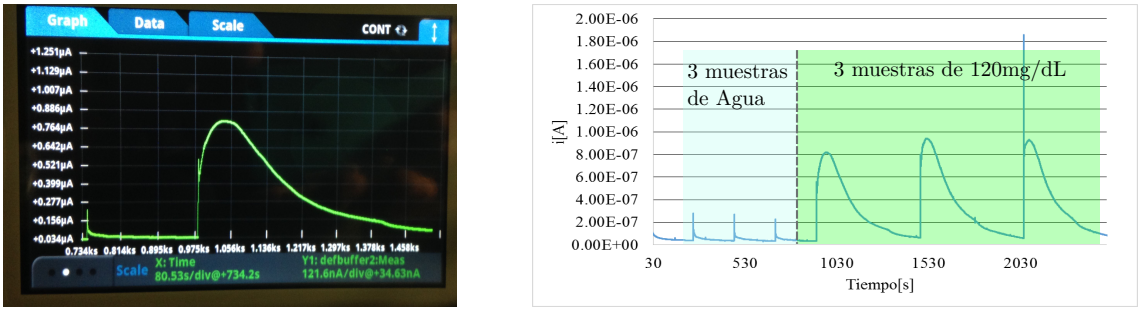
3.4.1.1. Molde réplica

En primer lugar se probó un electrodo en sustrato de acrílico. En dicho electrodo se depositaron tres muestras de agua sin glucosa y luego tres muestras de agua con glucosa con una concentración de $120 mg/dL$. En la Figura 3.20a, se muestra la forma de la señal obtenida con el instrumento de medición SMU. Se observa en la Figura 3.20b, que para las tres muestras de agua sin glucosa, el sensor no produce una corriente, sin embargo, cuando tres muestras de glucosa se depositan en el sensor, se puede observar una curva semejante a la que se muestra en la Figura 3.20a; por lo tanto, podemos validar de esta manera que el sensor trabaja adecuadamente.

Mediante el cálculo del área debajo de cada una de las curvas que se muestran en la Figura 3.20b, se puede obtener un promedio del valor de la corriente que corresponde a una concentración conocida. De esta manera se puede iterar para cada concentración conocida y luego obtener la curva de calibración del sensor.

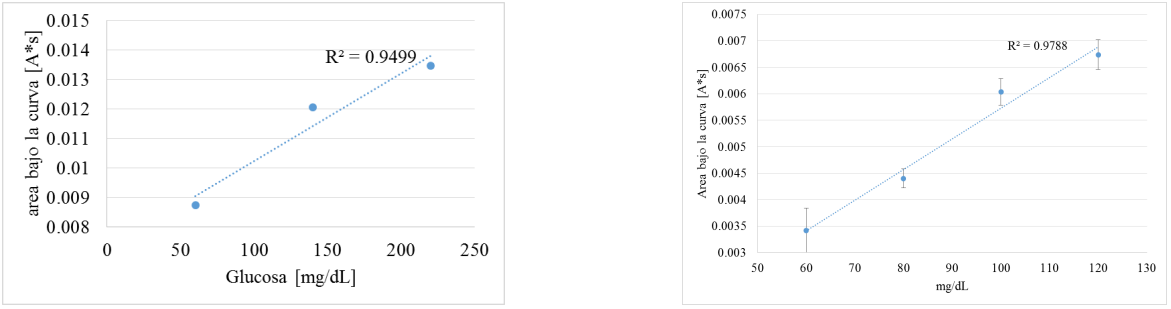
En la Figura 3.21a se muestra una curva de respuesta para un sensor de glucosa elaborado en un sustrato de PDMS, mediante molde réplica; y en la Figura 3.21b, la de un sensor en un sustrato de PMMA. En estos electrodos se utilizó como material conductor una pasta hecha a base de rodio en carbón.

Debido a que la pasta conductora utilizada para los sensores de la gráfica en la Figura 3.21 es hidrofóbica, fue complicado realizar más mediciones con otras concentraciones. Aunque esta



(a) (b)

Figura 3.20: Respuesta del sensor en sustrato de acrílico (a) para muestras de agua y agua con glucosa (b).



(a) (b)

Figura 3.21: Respuesta del sensor de glucosa en sustratos de PDMS (a) y PMMA(b).

pasta conductora es fácil de preparar, presenta el inconveniente de ser hidrofóbica, por lo que hacer llegar la muestra entre el electrodo de trabajo y de referencia también es complicado; para resolver esto se utilizó un papel como medio para transportar la muestra, sin embargo este método no garantiza el control de volumen sobre el sensor, a pesar de que el volumen para cada medición fue de $4\mu l$, dosificado con una micropipeta(LabNet).

Se observa entonces que elaborar electrodos de pasta conductora hecha a base de aceite mineral no es ideal, por (a) el método que utilizamos para preparar el molde maestro no es repetible, (b) la dificultad de depositar la pasta de carbón en el sustrato, (c) la pasta usada fue hecha a base de aceite mineral.

3.4.1.2. Microfabricación láser

Debido al inconveniente mencionado previamente, se preparó una pasta conductora sensibilizada con la pasta de LaserCon, la cual fue utilizada con un sustrato de PMMA, en la cual se preparó un micromolde tal como se muestra en la Figura 3.15.

Los electrodos preparados, tanto el de pasta de carbón como el de plata, son cuadros de $2x2mm$ para implementar el sensor de glucosa, tal como se utiliza en uno comercial.

Después de preparar el micromolde, Figura 3.15a, se perforó $(550\mu m)$(Figura 3.15b), se colocó un alambre en la perforación (Figura 3.15c) y se depositó el material conductor (Pasta de carbón o plata). Luego, ambos electrodos se unieron con una cinta doble cara para formar el canal para hacer entrar la muestra. Se eligieron microelectrodos cuadrados de $2mm$ x $2mm$, debido a que es el tamaño mínimo con el que se logró una medición mínima de $10mg/dL$ en muestras de $1\mu L$. La caracterización de este sensor se muestra en la gráfica de la Figura 3.22.

Para obtener la gráfica que se muestra en la Figura 3.22 se midió la corriente que es

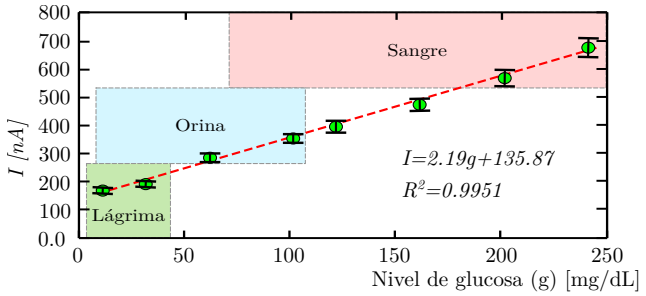


Figura 3.22: Medición de glucosa con electrodos de plata y pasta de carbón y niveles típicos de glucosa en lágrimas, orina y sangre.

proporcional a la cantidad de glucosa en la muestra. El sensor se conectó a una unidad de medición SMU Meter para suministrar $700mV$ a los electrodos (el microelectrodo de carbón se conectó a V_{cc} y el electrodo de plata a GND) y medir al mismo tiempo la corriente producida por el sensor.

Para esta prueba se utilizaron muestras de $1\mu L$ con diferentes concentraciones de glucosa. Las muestras se prepararon como se indica en la subsección 3.3.2.

De la Figura 3.22, se puede observar que el electrodo elaborado por este método de fabricación es capaz de medir concentraciones de glucosa en un rango de $10mg/dL$ a $240mg/dL$. Además, como se muestra en las gráficas de la Figura 3.9, el circuito electrónico diseñado es capaz de medir tales concentraciones. Por lo tanto, éste método de fabricación de microelectrodos en conjunto con el sistema electrónico, es viable para producir microelectrodos para aplicaciones amperométricas.

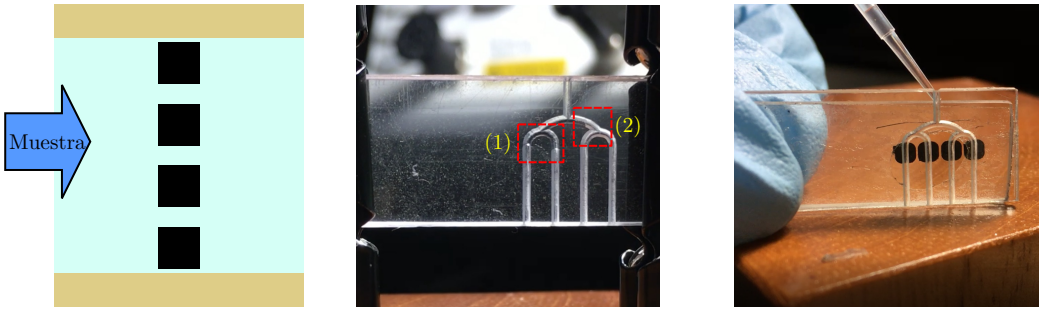
3.4.2. Medición múltiple

3.4.2.1. Microfresado

Se prepararon tres diseños para integrar cuatro electrodos en un sustrato de PMMA. El primero consiste en cuatro electrodos en un arreglo lineal, tal como se muestra en la Figura 3.23a. Debido a las dimensiones de éste arreglo de electrodos, se propuso integrar canales en un sustrato de PMMA, tal como se muestra en la Figura 3.23b; la desventaja con este diseño es que, no se pudo garantizar que la muestra llegara a todos los electrodos (Figura 3.23c) de manera simultánea (Figura 3.23(b-1, b-2)), atribuimos esto a las irregularidades en los canales debido al proceso de microfresado. Por ello, no se presentan las gráficas de la respuesta de dichos sensores. Sin embargo, es importante considerar que a futuro la geometría de dichos canales se puede mejorar mediante otro método de fabricación.

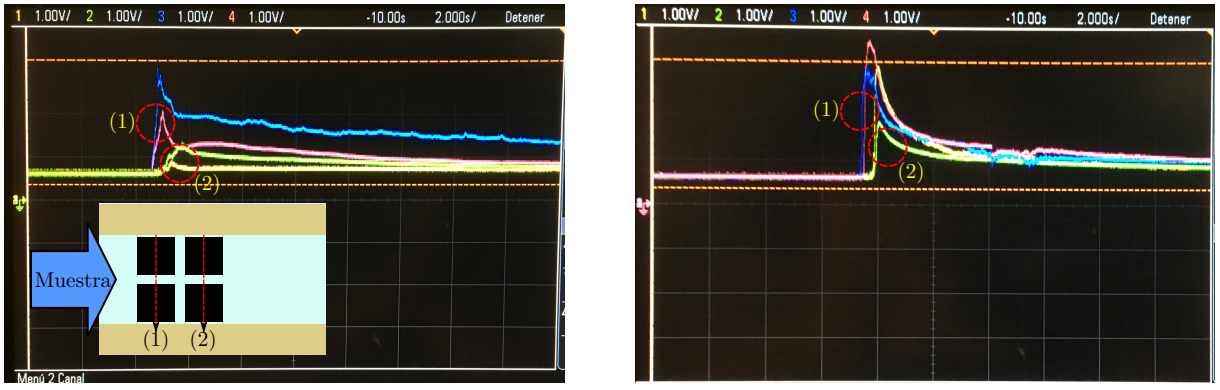
Otra geometría que se probó, es un arreglo de cuatro electrodos maquinados en un sustrato de PMMA; para ello se maquinaron mediante microfresado, cuatro pozos en la geometría que se muestra en la Figura 3.18 y en la Figura 3.24a. Para los electrodos de la Figura 3.18, se hicieron una serie de mediciones, sin embargo como se muestra en la Tabla 2.2, los pozos no son repetibles entre diferentes sustratos, por ello no se logró obtener una curva de calibración. Sin embargo, se realizaron algunas mediciones para los electrodos que se muestran en la Figura 3.18a. Los resultados se muestran en la Figura 3.24.

Como se observa en las gráficas del Figura 3.24, la muestra entra en un canal y al pasar por los dos primeros electrodos (Figura 3.24a-1) produce dos señales indicadas con (1) en la Figura



(a) (b) (c)

Figura 3.23: (a) Diseño de cuatro electrodos en un arreglo lineal, (b) canal hecho en sustrato de PMMA y (c) ensamble de electrodos y canal.



(a) (b)

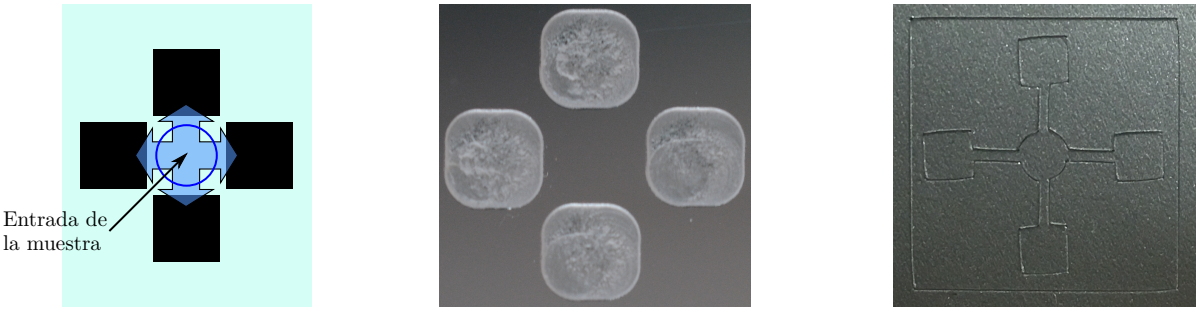
Figura 3.24: Medición múltiple (a, b) con cuatro electrodos del diseño Figura 3.18.

3.24a-1; luego, la muestra avanza por el canal y produce un par de señales adicionales indicadas con (2) en la Figura 3.24a-1; por lo tanto se puede observar que las señales no se generan de manera simultánea; este comportamiento se puede corroborar en la Figura 3.24b-(1-2). Por lo tanto el uso de esta geometría no es ideal si se requiere hacer una medición múltiple de manera simultánea.

Por otro lado, también se hicieron mediciones utilizando electrodos de trabajo de plata, sensibilizados con glucosa oxidasa atrapada en gel, tal como se describe en la sección 3.3.1 y electrodos de referencia de plata.

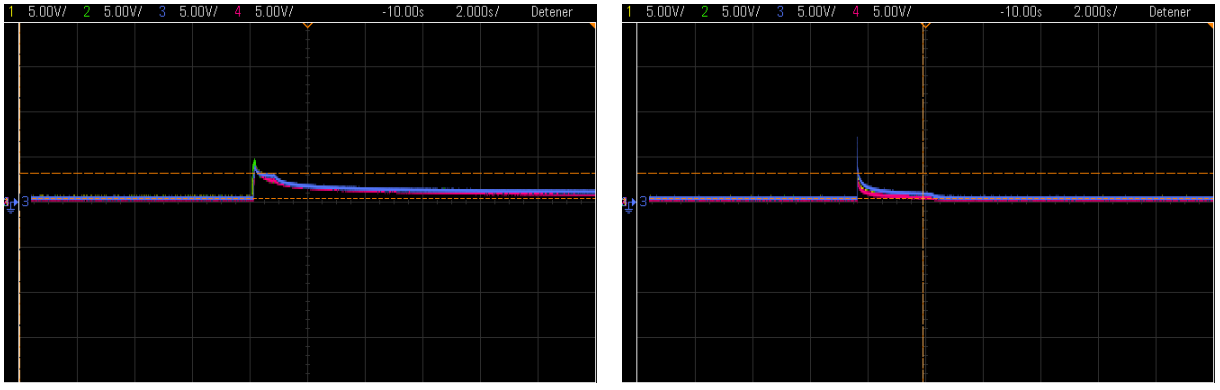
Se maquinaron pozos adyacentes (Figura 3.25a) con la geometría que se muestra en la Figura 2.9d. Con ésta geometría, la muestra entra en la parte superior, para lo cual se cortaron piezas de cinta adhesiva de vinilo (Figura 3.25c) con el propósito de unir los sustratos y ensamblar los electrodos. En esta geometría, la muestra, al entrar en la parte central de los electrodos, tiene un camino menor que recorrer hasta llegar a los electrodos, además, puede llegar de manera simultánea.

La gráfica de la Figura 3.26 muestra dos mediciones múltiples realizada con electrodos con la geometría que se muestra en la Figura 3.25a. En esta gráfica se presentan mediciones para muestras de $100mg/dL$. Aunque las muestras son de la misma concentración, se puede observar que las gráficas son distintas. Este comportamiento se debe a que los moldes maquinados en distintos sustratos no son repetibles, tal como se muestra en la Tabla 2.2, por to tanto, los electrodos en cada sustrato tampoco. Entonces, si se requieren electrodos similares, es necesario encontrar un método que nos permita elaborar electrodos de una manera repetible.



(a) (b) (c)

Figura 3.25: Moldes para microelectrodos para medición múltiple. (a) diseño, (b) maquinado en sustrato de PMMA y (c) cinta adhesiva de vinilo.



(a) (b)

Figura 3.26: Medición múltiple con electrodos cuatro electrodos (a, b) del diseño Figura 3.25.

Con el propósito de realizar mediciones múltiples se implementó el hardware que se muestra en la Figura 3.10 y la interfaz gráfica del software que se muestra en la Figura 3.11. En la Figura 3.11, se muestra un conjunto de cuatro señales correspondientes a cuatro sensores. Debido a las dificultades citadas en el párrafos previos, es primordial primero producir moldes repetibles, antes que realizar las mediciones con el circuito y el software diseñado para tal propósito.

3.5. Discusión

En este capítulo se ha presentado la aplicación de los microelectrodos, fabricados en el capítulo 2, al desarrollo de un sensor de glucosa.

Se utilizó un sensor de glucosa comercial para estudiar la señal que produce, mediante el uso del equipo comercial SMU; con ello, se midió la corriente producida por el sensor, estudiar el efecto que tiene la polarización de los electrodos y utilizar esta información para diseñar un circuito electrónico que pueda entregar una señal de voltaje. Con éste equipo se observó que el efecto que tiene la polarización de los electrodos, es el incremento de la magnitud de corriente. La ventaja de este equipo es el rango de corriente que puede medir (pA a A), mientras puede suministrar una señal de voltaje para polarizar el electrodo de manera simultánea. Las desventajas son que solo puede medir la señal de un solo sensor y su costo elevado (miles de pesos).

Se utilizó el circuito diseñado previamente para observar la señal del sensor mediante el uso

de un osciloscopio. La ventaja de este equipo es el rango de voltaje que puede medir (mV a $\sim 100V$); sin embargo, las desventajas son: el número canales disponibles (usualmente 2 o 4) y solo puede medir voltaje (depende de un circuito adicional para medir corriente).

Se utilizó el circuito diseñado y se proceso la señal mediante un microcontrolador. El rango que puede medir está entre $5mV$ a $20V$, el cual se ajustó en función al rango de concentración de glucosa de interés ($2.5mg/dL$ a $300mg/dL$). Las desventaja de hacer un diseño propio es el tiempo requerido para el desarrollo, pruebas y validación. Este circuito tiene las siguientes ventajas: puede medir y procesar la señal de un sensor de glucosa mediante un microcontrolador, no depende de equipo comercial para funcionar (SMU o un osciloscopio), es su bajo costo y tiene la capacidad de procesar múltiples sensores de manera simultánea.

Se elaboraron sensores mediante molde réplica, microfresado y microfabricación láser. La principal desventaja de los métodos de molde réplica y microfresado es que el molde producido no era repetible. Por ello, el sensor que se logró calibrar, en un rango de $10mg/dL$ a $240mg/dL$, fue aquel hecho con microfabricación láser. Para validar el circuito electrónico diseñado, se empleo el equipo comercial SMU y el osciloscopio.

Existen técnicas que permiten el desarrollo de sensores no enzimáticos, las cuales utilizan voltamperometría cíclica para lograr medir la concentración de glucosa, sin embargo, debido a que existen distintas moléculas que podrían oxidarse al mismo potencial, este tipo de sensores no son específicos; por ello la enzima glucosa oxidasa, ha sido empleada por los sensores de glucosa comerciales para hacerlos específicos.

La elección del material del sustrato es importante debido a que afecta al sensor de la siguiente manera. Si se elige un material hidrofóbico, como el PDMS, la muestra entra con mayor dificultad debido a la tensión superficial de la muestra; si por el contrario se elige un material hidrofílico, la muestra se transporta fácilmente a la zona de detección y esto favorece al proceso de medición, sobre todo si se diseña una plataforma con más de una zona de detección, tal como un sensor múltiple. Por ello el PMMA ha favorecido el diseño del sensor de glucosa.

Se hicieron diseños con arreglos geométricos distintos para un integrar cuatro sensores de glucosa en una misma plataforma de medición. El primer diseño consiste en un arreglo lineal, a través del cual se hacer llegar la muestra mediante un canal o mediante canales distintos; este diseño no es ideal debido a que la muestra no llega de manera simultánea a los sensores, lo cual se debe al tamaño de los canales ($\sim 1cm$ de longitud) y a la limitación en el método de fabricación del canal (microfresado).

Luego se diseño un arreglo de sensores, en forma de una matriz (2 columnas x 2 renglones); este diseño tampoco es ideal, debido a que la muestra llega primero a dos electrodos y luego a los otros dos, es decir, no de manera simultánea.

Finalmente, distribuir los sensores alrededor de un punto central a través del cual entra la muestra, es la mejor opción. La distancia entre el punto de entrada y los sensores debe ser tan pequeña como sea posible; en caso de tener sensores con un tamaño aproximado de $2x2mm$ una distancia entre el sensor y el punto de entrada de $\sim 100\mu m$ es preferible. En caso de tener sensores con tamaño aproximado de $\sim 200um$, la distribución del arreglo puede cambiar; esto se debe principalmente a que el tamaño del canal de transporte de la muestra es menor, lo cual hace que el tiempo en que la muestra llega a todos los sensores es casi simultánea.

El objetivo del presente trabajo es integrar los electrodos para medir glucosa en una plataforma de medición dual glucosa-insulina, por lo tanto, se ha buscado que los materiales utilizados en los sustratos sean compatibles con el método de medición insulina, que se describe en el siguiente capítulo, por ello los sustratos utilizados hasta este punto han sido PDMS y PMMA.

4 — Aplicación Insulina

4.1. Introducción

Actualmente múltiples afecciones fisiológicas requieren del monitoreo constante de analitos a partir de muestras biológicas (sangre, biopsias, exudados, etc). Las pruebas para tal monitoreo se realizan en laboratorios de análisis clínicos y, debido a la frecuencia con que deberían realizarse, no permiten un buen seguimiento y control de la condición de un paciente.

Algunas pruebas de análisis clínico incluyen: (a) el perfil hormonal (prolactina, gonadotropinas, estradiol, progesterona, testosterona), que deben realizarse 80 millones de parejas que padecen infertilidad y el 8 % de las mujeres que padecen Ovario Poliquístico y cuya prognosis y mal seguimiento propician el desarrollo de diabetes en un 30 % de los casos; (b) la insulina; (c) TSH (hormona reguladora de la tiroides), (d) glucosa; (e) hemoglobina glucosilada, que 10 % de hombres y mujeres con diabetes deben hacerse; y (f) hormonas tiroideas (T3 y T4); y

Una de las técnicas más utilizadas para estos análisis es la técnica de ELISA (ELISA, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) ó ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, la cual es una técnica en la que un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un cambio detectable, como un cambio de color u otro tipo. Usualmente, para reducir costos del ensayo, se utiliza un anticuerpo primario que reconoce al antígeno y que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario que lleva enlazado la enzima anteriormente mencionada. La aparición de colorantes permite medir indirectamente, mediante espectrofotometría, el antígeno en la muestra.

Debido al interés de disponer de plataformas de medición portátiles interconectadas con otros dispositivos y con capacidad de integrar plataformas minuaturizadas, hemos propuesto integrar dos sensores, glucosa-e insulina en una plataforma tipo Lab on a chip. La plataforma que se describe en el presente trabajo propone entregar una señal medible por un sistema optoelectrónico, que puede enviarse a una computadora o dispositivo móvil y a través de ello, mejorar el proceso de diagnóstico, seguimiento y terapia de una condición patofisiológica.

La plataforma tipo "Lab on a chip", que se describe a continuación, permite el análisis de uno o varios analitos, a partir de una muestra biológica. Esta plataforma o dispositivo emplea tres elementos: (a) un equivalente al analito a medir, (b) un anticuerpo marcado fluorescente o enzimáticamente y, (c) micropartículas magnéticas que permitirán la detección.

En esta plataforma se emplea o aplica un campo magnético externo para manipular las micropartículas magnéticas en los canales fluídicos. Las partículas magnéticas permiten la adhesión a su superficie de proteínas, antígenos, anticuerpos o cualquier agente que forme un enlace covalente con ella; es decir, permiten ser funcionalizados o sensibilizados. La inmovilización de biomoléculas en la superficie de la micropartícula es tan estable, que permite su transporte a una región específica y su separación del resto de la muestra, mediante su manipulación con un campo magnético.

El empleo de la microfluídica, permite la elaboración a baja escala de varias zonas de reacción

y detección, por lo que posibilita que esta plataforma sea escalable a la detección de una o más moléculas. La idea es hacer posible la medición de paquetes de analitos relacionados con una misma afección o con padecimientos relacionados cuya correlación o interdependencia sea de interés. Por ejemplo, proporcionar un diagnóstico apropiado, darle seguimiento y una terapia apropiada a una persona diabética.

La plataforma que se describe en este trabajo permite la detección de una o varias biomoléculas en muestras de sangre a partir de un método de ELISA de competencia con partículas magnéticas, las cuales son funcionalizadas con antígenos similares a los que se quiere detectar.

El método de ELISA ha demostrado su potencial para la detección de analitos [120, 122] y muchas variantes de esta técnica se han desarrollado en el sector privado y público. Recientemente se han publicado y empleado ELISAs ultrasensibles para analitos como la insulina (ELISAs comerciales como Mercodia) y hormonas como la de crecimiento (GH, *Growth Hormone*) [118] y prolactina [119]. Sin embargo, en todos estos casos, la necesidad de múltiples pasos y reactivos, el tamaño de las placas y los lectores ópticos no permiten su empleo de forma fácil y económica. Otros métodos de detección múltiple empleados, especialmente en el área de investigación, han sido desarrollados por Merck y Biorad. Sin embargo, estos métodos tienen los mismos inconvenientes que los descritos para el ELISA convencional, con el agravante de que el lector es un aparato de muy alto costo (se debe mencionar que en todo el país la compañía solo ha podido vender uno).

A la fecha, no se ha reportado el uso de un ELISA de competencia (tal y como está descrito más adelante en la exposición del método) para biomoléculas o cualquier analito, sin necesidad de anticuerpo secundario, con pocos elementos de reacción, empleando poca muestra y en un tamaño portátil.

Existen métodos de detección con partículas magnéticas en un sólo paso que ya están publicados [120]. Sin embargo, éstos usan un método de medición basado en una propiedad magnética de las partículas que se ve alterada por la unión con el bioanalito (super-paramagnética o de magnetorresistencia). Su realización y medición requiere de tecnología avanzada y sensores de alto costo, muy diferente de lo que se propone aquí.

Se ha reportando el uso de la técnica de ELISA para la detección de patógenos empleando nanopartículas de oro (AuNPs) y su separación usando esferas magnéticas (MBs). El método descrito se reduce a la separación y concentración de bacterias o toxinas para su posterior detección con un método de ELISA, lo que difiere de la técnica descrita en el presente trabajo [121].

Las técnicas mencionadas son alternativas de métodos como el ELISA. Además, en todos los casos, se emplean múltiples pasos, reactivos y reacciones que hacen poco factible su empleo casero o a gran escala.

Específicamente, sobre el biosensor biomolecular de insulina/glucosa, podemos decir que comercialmente existen varios inventos para la medición de glucosa que, al determinar el nivel de este analito, posibilitan el control más preciso y adecuado de la inyección de insulina al paciente. Algunas variantes de estos glucómetros, incluyen la comunicación remota o por computadora (US 2012/0022497), pero tienen un error de medición que va del 25 al 30 %.

Además, existe un antecedente de dispositivo de medición dual glucosa-insulina con dos documentos del mismo solicitante en dos años consecutivos (US 2014/0377789 y US 2015/0031053) de tipo "point-of-care" y portátil (que el paciente se pueda medir sólo), que aspira a calcular el estado de avance y progresión de la diabetes para adaptar el tratamiento de forma individual. Este documento de patente concedida es el más cercano a esta variante del

biosensor biomolecular propuesto en el presente trabajo.

4.2. Sensor de biomoléculas

La plataforma descrita en el presente trabajo tiene la posibilidad de realizar dos tipos de mediciones:

- Detección de una molécula (MDU) Figura 4.1, cuyo propósito es realizar la detección y medición de un solo tipo de biomolécula, y
- Detección de múltiples moléculas (MDM) Figura 4.2, con el cual se podrán detectar y medir dos o más biomoléculas en la misma plataforma, dependiendo de los marcadores (fluoróforos convencionales, qdots, etc) que se utilicen para su detección.

4.2.1. Detección de una molécula

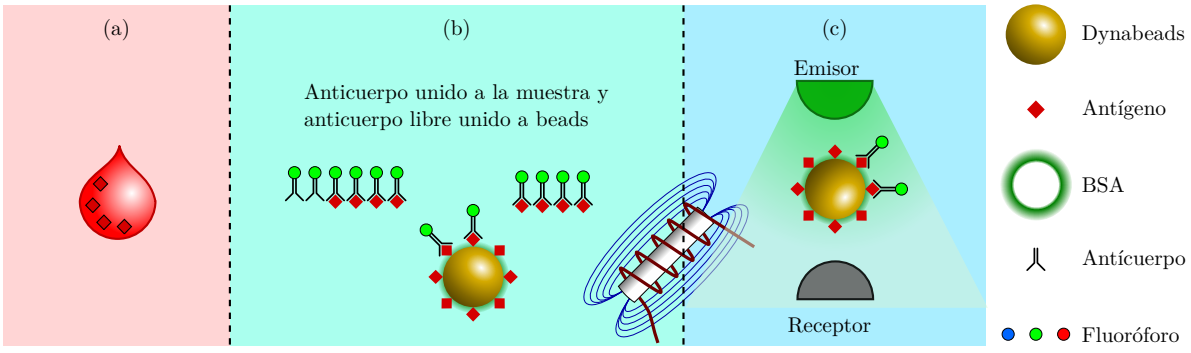


Figura 4.1: Método de detección de una molécula. (a) Zona de entrada del antígeno, (b) zona de reacción y (c) zona de detección óptica.

En la Figura 4.1 se observan los componentes de la plataforma del método de medición unico.

La detección de las moléculas se lleva a cabo mediante el siguiente procedimiento:

- La muestra (sangre o saliva), que contiene los antígenos que son las biomoléculas que se desean medir, se deposita en la zona de entrada del antígeno (Figura 4.1a). que contiene los antígenos que son las biomoléculas que se desean medir.
- La muestra pasará a través de un microcanal a una zona de reacción (Figura 4.1b), en la cual, la muestra se mezclará con el anticuerpo específico de reconocimiento de la biomolécula de interés, y que está marcado para su posible detección. En este caso se ilustra el ejemplo de marcaje fluorescente, aunque podrían ser marcados con enzimas que generen una reacción de color o con otros detectores químicos. Dependiendo de la concentración de las biomoléculas de interés en la sangre o saliva, éstas se unirán a cierta cantidad de anticuerpos, dejando libre el resto.
- Las nanopartículas magnéticas, previamente funcionalizadas (proceso en el cual la nanopartícula se cubre con la misma biomolécula que se quiere medir y se bloquean los espacios libres con albúmina sérica bovina (BSA)) y ubicadas en la zona de detección

(Figura 4.1c), son movilizadas, empleando un imán que es movido mecánicamente por una plataforma, a través de un canal de microfluídica hacia la zona de reacción (Figura 4.1b).

- En la zona de reacción (Figura 4.1b), los anticuerpos marcados libres (aquellos que no reaccionaron, con las biomoléculas de la muestra), se unirán a las nanopartículas.

- Las nanopartículas se desplazan con ayuda de un campo magnético aplicado con un imán, de regreso, a la zona de detección óptica (Figura 4.1c). En la zona de detección óptica, se utiliza una fuente de luz blanca o específico para cierta longitud de onda ($488nm$, $510nm$ ó $590nm$, pero no exclusivamente) y un detector óptico.

- En la zona de detección (Figura 4.1c), el emisor irradia la luz que excitará los fluoróforos que se encuentran en los anticuerpos unidos a la partícula y, en respuesta, éstos emitirán una luz en otra longitud de onda, que es captada por el detector óptico. En este caso, se ha utilizado un microscopio, sin embargo se esta buscando que el detector sea una cámara, un teléfono celular con cámara, una cámara CCD, un fotodiodo o cualquier detector que permita obtener luz y/o una imagen. Es decir, la luz detectada es proporcional a los anticuerpos que quedaron en la nanopartículas magnéticas, por tanto no reaccionaron con la muestra. Mientras más intensa es la luz detectada, mayor es el número de anticuerpos unidos a las nanopartículas, y menor la cantidad de biomoléculas en la muestra.

4.2.2. Detección de múltiples moléculas

El método de detección de múltiple moléculas, emplea las mismas zonas que el método de detección de una sola molécula, tal como se muestra en la Figura 4.2.

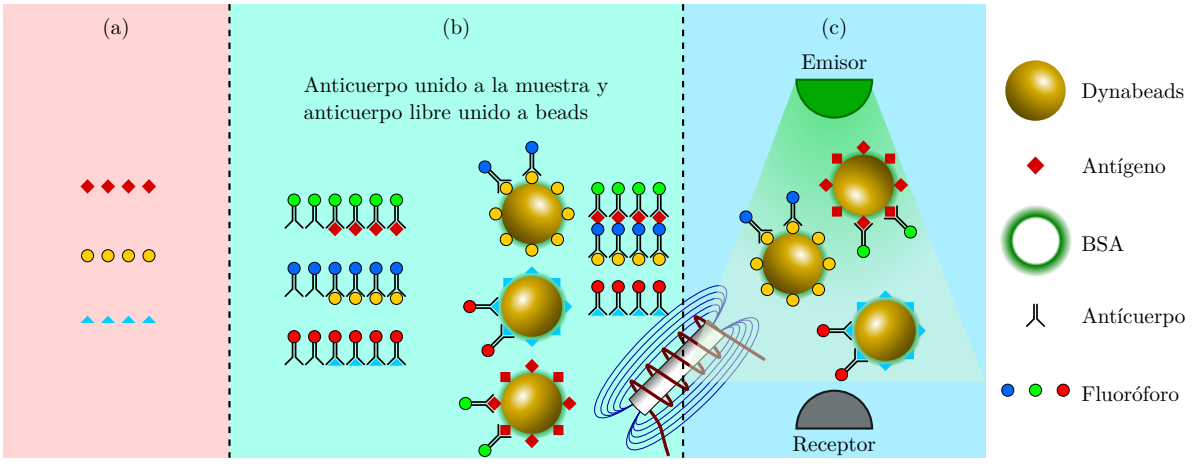


Figura 4.2: Método para la detección de múltiples moléculas. (a) Zona de entrada del antígeno, (b) zona de reacción y (c) zona de detección óptica.

El procedimiento para realizar la detección es similar al método de detección de una sola molécula. Por ejemplo, para detectar tres biomoléculas, el procedimiento es el siguiente:

- Las tres biomoléculas que se quieren detectar son tomadas de la misma muestra (sangre, saliva o lágrimas), la cual se deposita en la zona de entrada (Figura 4.2a), luego esta muestra pasa a la zona de reacción (Figura 4.2b).

- En la zona de reacción, las biomoléculas se ponen en contacto con tres anticuerpos específicos marcados previamente con tres fluoróforos específicos (Figura 4.2b), según los marcadores que se quieran detectar. En este caso, las nanopartículas magnéticas estarían previamente funcionalizadas con los 3 antígenos específicos.

- El imán desplaza las nanopartículas, de la zona de detección óptica (Figura 4.2c) a la zona de reacción de anticuerpos antígenos (Figura 4.2b), para unir los anticuerpos libres que no reaccionaron con las biomoléculas y que se pegarán solamente a las nanopartículas que les corresponden (con la biomolécula específica que reconoce cada anticuerpo),

- las nanopartículas son trasladadas posteriormente, a la zona de detección óptica como se explicó para el método de detección única (Figura 4.2c).

En el caso de la detección múltiple de moléculas, las longitudes de onda de los fluoróforos o reacciones de color empleadas se encuentran con una separación tal que permiten detectar tres, cuatro o cinco biomoléculas diferentes, dado que las propiedades de la luz permiten que estos fluoróforos sean excitados en una longitud de onda específica y emitan en otra longitud de onda (corrimiento de Stokes), por lo que no hay un sobrelapamiento de la señal a detectar. Como ejemplo, un fluoróforo que se excita en $488nm$ emite en $510nm$; otro fluoróforo se excita en $510nm$ emite en $560nm$; y un tercero más se excita en $590nm$ emite en $640nm$. Estas características de los fluoróforos permiten realizar una medición múltiple con el mismo método, utilizando el mismo dispositivo, con los mismos emisores y detectores.

El chip utilizado es del tamaño de un portaobjetos (1" x 3"): En la Figura 4.3, se representa el canal y las zonas de: (1) entrada del antígeno, (2) reacción y (3) detección.

En la Figura 4.3 se representa el método de detección de biomoléculas paso a paso.

- La muestra que se deposita en la zona de entrada, (Figura 4.3a-1), pasa a través del canal microfluídico hacia la zona de reacción (Figura 4.3a-2).

- Los anticuerpos marcados con el fluoróforo específico que se desee medir reaccionan con la biomolécula de la muestra (Figura 4.3b-2).

- Las nanopartículas magnéticas funcionalizadas, que se encuentran depositadas en la zona de detección (Figura 4.3b-3) , se desplazadan mediante la aplicación de un campo magnético con un imán hacia la zona de reacción (Figura 4.3c-2) a través de un canal microfluídico.

- Después de que las nanopartículas magnéticas funcionalizadas reaccionan con los anticuerpos libres (Figura 4.3c-2) se regresan a la zona de detección (Figura 4.3d-3).

- En la zona de detección (Figura 4.3d-3), las nanopartículas magnéticas funcionalizadas se excitan con las longitudes de onda requeridas para recuperar la señal luminosa de fluorescencia, que es inversamente proporcional a la concentración del analito a cuantificar, mediante un sensor de luz que convierte la intensidad de la luz en señal eléctrica.

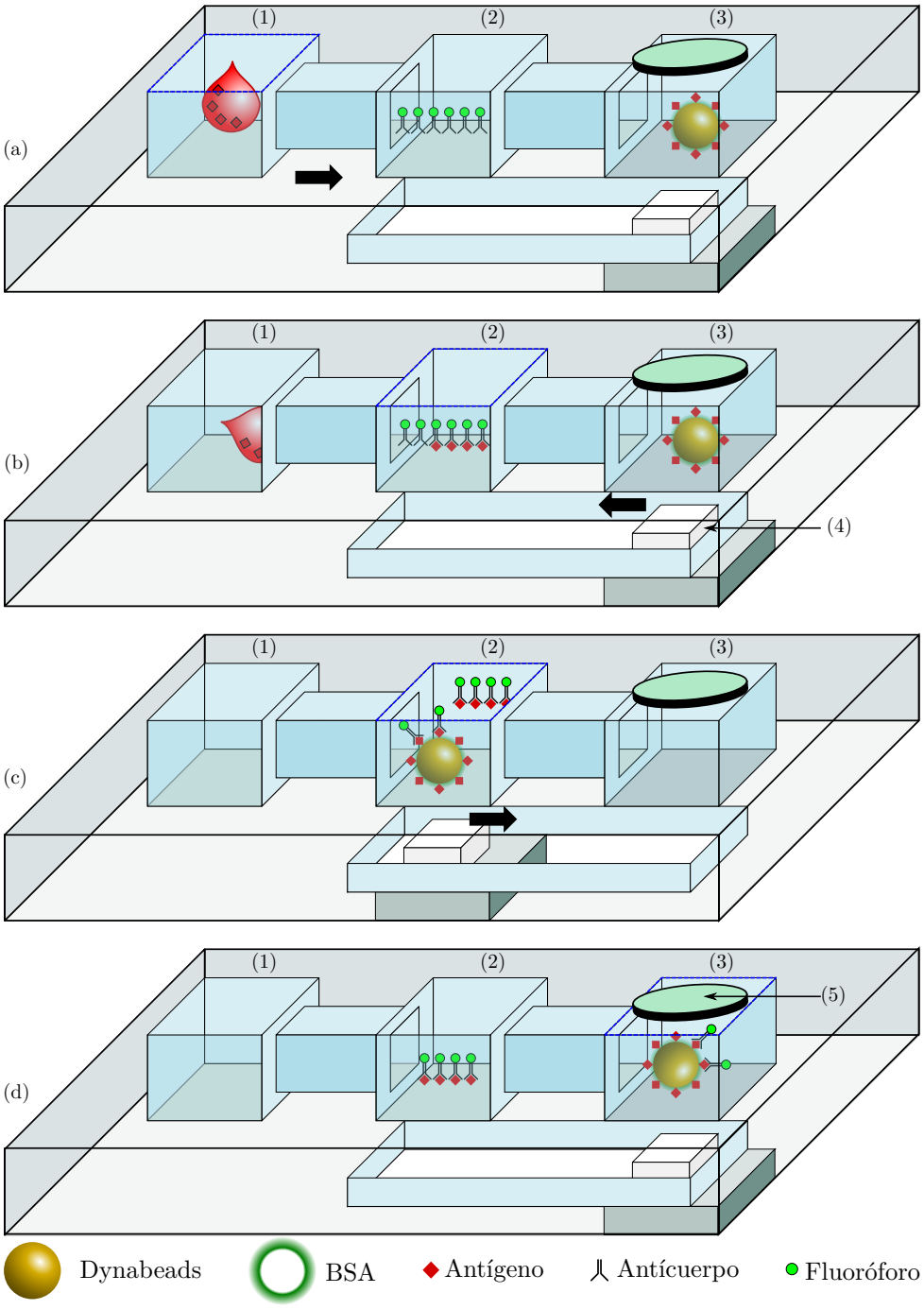


Figura 4.3: Método de detección paso a paso. (a) Entrada del antígeno, (b) zona de reacción, (c) el imán desplaza a las nanopartículas a la zona de reacción y (d) el imán desplaza a las nanopartículas a la zona de detección óptica.

4.2.3. Desplazamiento de las partículas

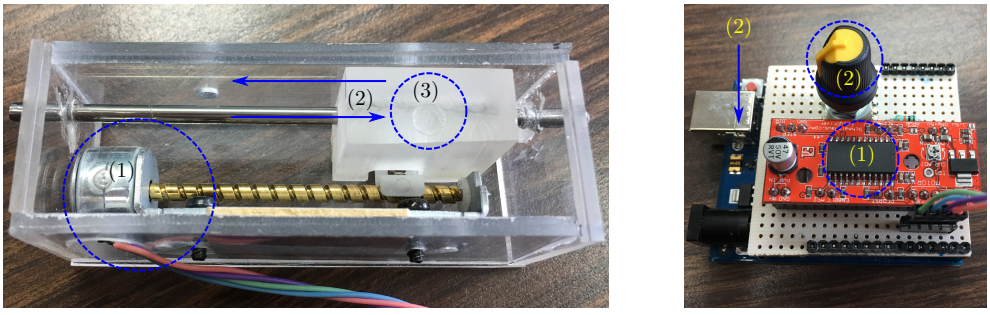
En párrafos anteriores se ha indicado que las nanopartículas magnéticas son movidas mediante la aplicación de un campo magnético con un imán, de la zona de detección (Figura 4.3d-3) a la zona de reacción (Figura 4.3c-2) o viceversa, utilizando una plataforma mecánica que permite un movimiento controlado. Para ello la plataforma mecánica debe cumplir con lo siguiente:

- Tener una dimensión de 85mm (largo) x 30mm (ancho) x 20 mm (alto).
- Un dezplazamiento horizontal máximo de 3.5cm;
- La plataforma debe tener un manera de acoplarse con un imán de 5mm de diámetro;
- Permitir el paso de luz a través de él;
- Tener un espacio para montar un portaobjetos, en donde se coloca la plataforma de medición y;
- Ser controlado por una computadora o de manera manual.

Con las especificaciones anteriores, se alaboró una plataforma con material de PMMA (Figura 4.4a). En ésta estructura, se montó un motor a pasos con un tornillo sinfin (Figura 4.4a-1), el cual dezplaza (hasta 3.5cm) un soporte (Figura 4.4a-2) que lleva montado un imán de 5mm de diámetro (Figura 4.4a-3).

El motor del tornillo sin fin, (Figura 4.4a-1), está conectado a una plataforma electrónica que permite controlar el movimiento del imán de manera manual, mediante una perilla (Figura 4.4b-2). Además, se pueden enviar instrucciones a dicha plataforma con una computadora a través de la interfaz USB (Figura 4.4b-2). La plataforma electrónica consiste en una tarjeta de desarrollo arduino UNO conectada a un controlador de motor a pasos (Figura 4.4b-1).

La plataforma electrónica descrita en esta sección es independiente de la plataforma electrónica para el procesamiento de señales de los sensores de glucosa, sin embargo, todo esto se integrará en una tarjeta de circuito impreso para tener una plataforma de medición dual glucosa-insulina.



(a) (b)

Figura 4.4: Plataforma mecánica para el control de movimiento del imán (a) y circuito electrónico de control (b).

En la Figura 4.5, se pueden observar imágenes consecutivas, que provienen de la toma de una película, en las cuales se muestra el desplazamiento de las nanopartículas magnéticas de un extremo a otro de un microcanal.

La misma cantidad de partículas se deposita en cada chip, por lo que se sabe cuál es la concentración final. Además, como característica adicional, debe referirse que todas las partículas pueden moverse en grupo a voluntad.

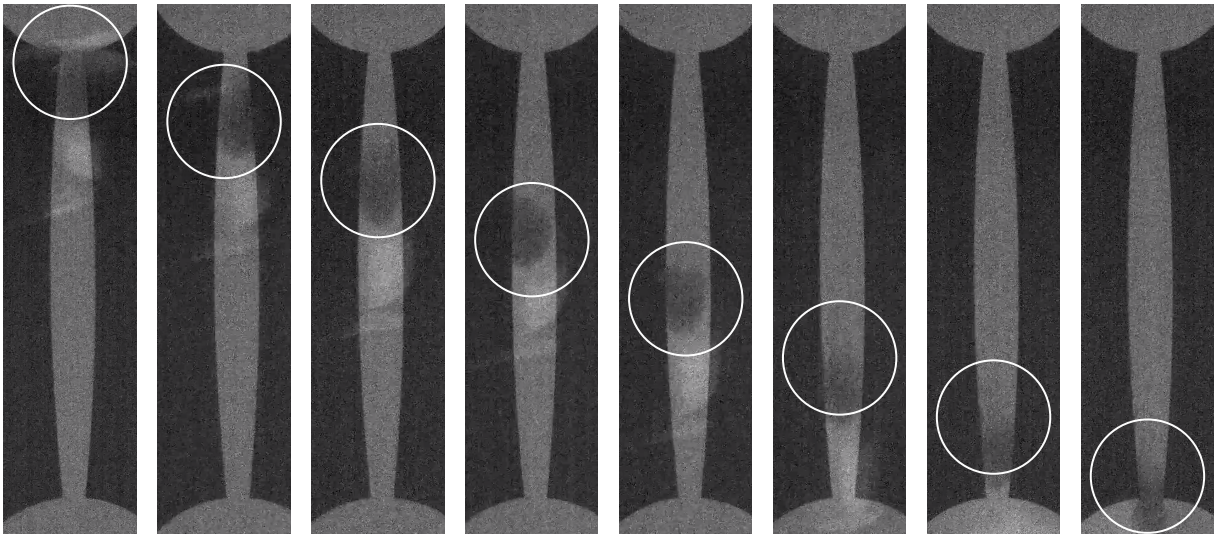


Figura 4.5: Demostración de la manipulación de las partículas magnéticas en microcanales de poli-dimetilsiloxano (PDMS).

4.3. Materiales y métodos

Como se mencionó previamente, la plataforma fluídica, utilizada en el presente trabajo, tiene las dimensiones de un portaobjetos. En la Figura 4.6 se muestra la geometría y las dimensiones de dicha plataforma. en este caso se muestra la zona de entrada del antígeno (Figura 4.6a), la zona de reacción (Figura 4.6b) y la zona de detección (Figura 4.6c). Este diseño consta de tres pozos de $5mm$ de diámetro, unidos por canales de $10mm$ de longitud. Los canales tienen $500\mu m$ de ancho en la unión con los pozos y $100\mu m$ en la parte central, de esta manera se permite el paso de las nanopartículas, que son funcionalizadas con el procedimiento que se muestra en el apéndice E.

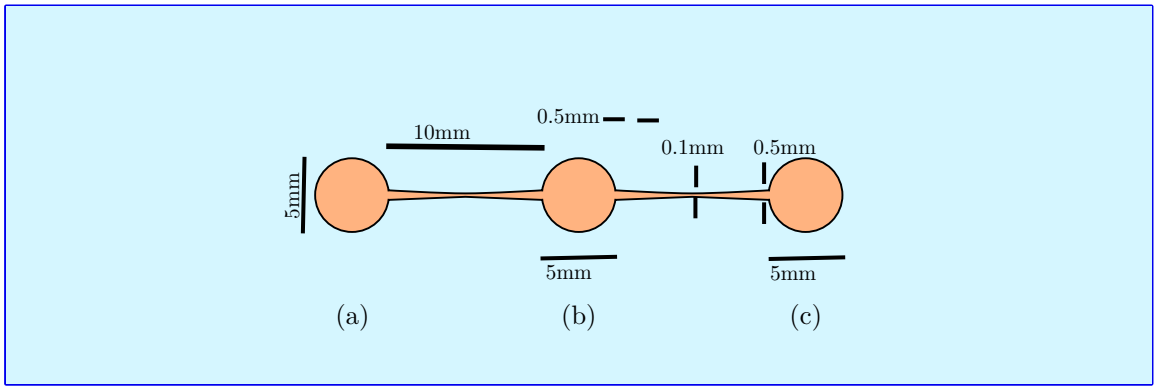


Figura 4.6: Geometría de la plataforma fluídica utilizada para el MDU.

Se utilizaron tres fluoróforos distintos para que se unieran con los anticuerpos, con las siguientes longitudes de onda de exitación y de emision (Tabla 4.1):

La plataforma mostrada en la Figura 4.6, está hecha de PDMS y unida a un sustrato de vidrio. Esto permite tener acceso a a la plataforma fluídica para obtener imágenes en la zona de

Tabla 4.1: Longitudes de onda de excitación y emisión de los fluoróforos utilizados.

Fluoróforo	**Excitación [nm]**	**Emisión [nm]**
Alexa 488	488	519
Alexa 555	555	570
Cy5	647	670

detección. Las imágenes que se muestran en la sección 4.4 se procesan mediante un programa hecho en python y el procedimiento general para obtener una medición de la concentración de una muestra es:

- Leer la fotografía monocromática de 8 bits, el cual contiene valores de 0 a 256.
- Calcular la moda de la imagen; lo cual se hace con la finalidad de eliminar los valores mas repetitivos, que en este caso es el fondo (valores cercanos a 0).
- Calcular el promedio de los valores mayores a la moda.
- Dicho promedio corresponde al valor de concentración de una medición en particular.

4.4. Resultados

Como se refirió anteriormente, con la plataforma de medición propuesta en el presente trabajo se han detectado biomoléculas como insulina y prolactina.

4.4.1. Detección de una molécula

La insulina se midió con el método de detección que detallamos anteriormente. Para ello, las nanopartículas magnéticas fueron funcionalizadas con insulina y mezcladas con diferentes concentraciones conocidas de la misma biomolécula (curva estándar), con las que se calculó un ajuste numérico dado por la ecuación 4.1:

$$f(x) = 20.08x^{-0.1796} \tag{4.1}$$

En la Figura 4.7, se pueden observar los resultados obtenidos con el método de medición único para insulina, en donde:

- En la Figura 4.7A se observa una imágen de luz transmitida, en donde lo negro son las nanopartícluas magnéticas empleadas.
- En la Figura 4.7B se observa el control negativo de fluorescencia, en el cual no hay un anticuerpo que detecte el antígeno y por tanto no hay señal de fluorescencia;
- En la Figura 4.7C se muestra el control positivo, cuando todas las partículas están cubiertas por anticuerpo y la emisión de fluorescencia es la máxima.
- En la Figura 4.7(D,E,F) se muestra como se observa la fluorescencia de las nanopartículas al reaccionar con diferentes concentraciones de la biomolécula a medir (PRL).

- En la Figura 4.7D se observa que cuando la concentración de la biomolécula es muy baja, y por lo tanto queda mucho anticuerpo marcado libre, un mayor número de ellos se pega a las nanopartículas. Esto produce una señal de fluorescencia elevada.

- En la Figura 4.7E se muestra una imágen de la reacción a una concentración intermedia de PRL; menos anticuerpos que en el caso anterior quedan libres y esos son los que van a reaccionar con la nanopartícula. Por lo tanto, la fluorescencia es menor que para la concentración baja. Finalmente, a una concentración alta de PRL (Figura 4.7F), la mayoría de los anticuerpos quedan atrapados en la muestra, porque reaccionan con las biomoléculas, y muy pocos se pegan a las nanopartículas, por lo tanto la fluorescencia medida es menor.

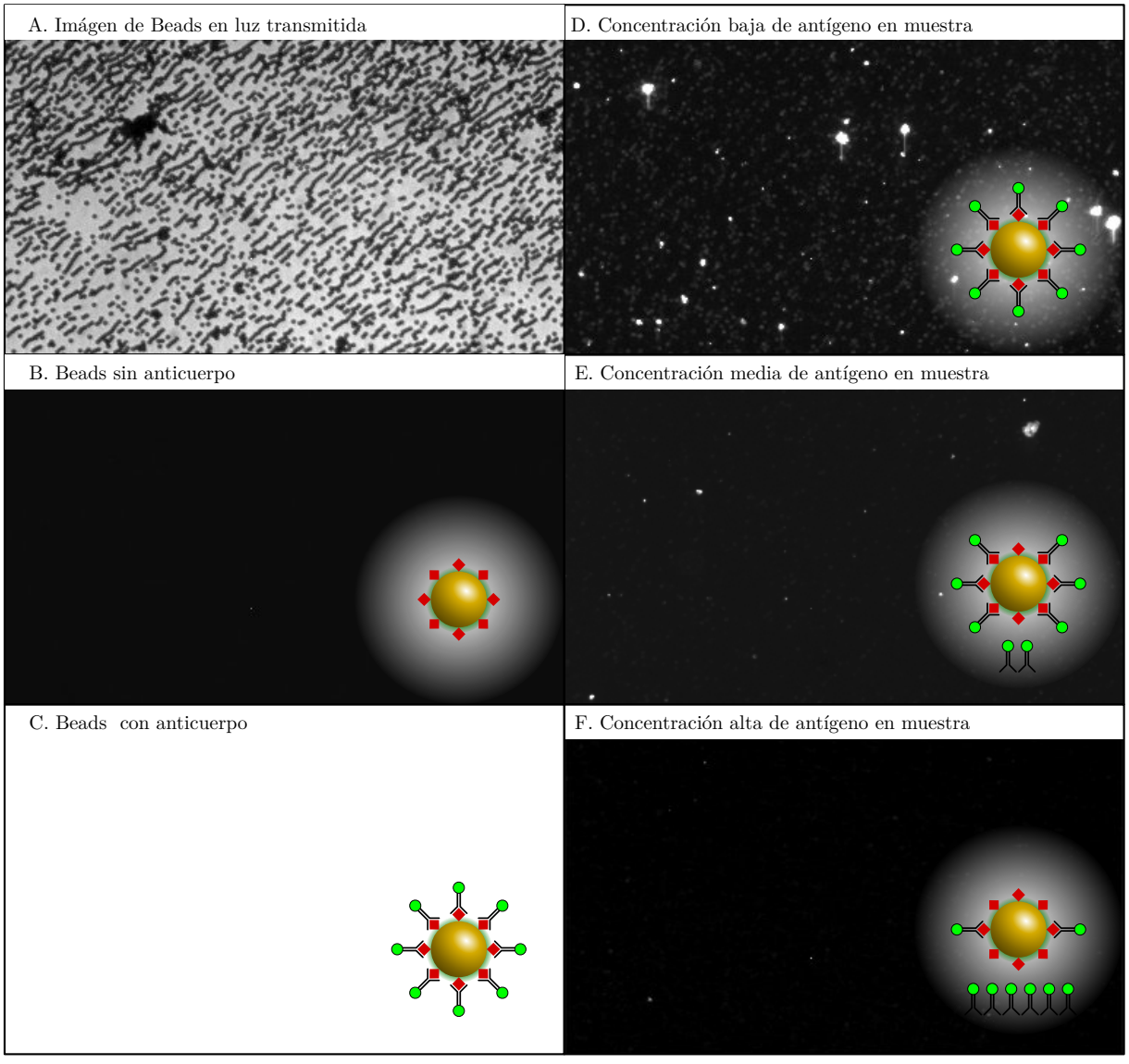


Figura 4.7: Medición de insulina utilizando el MDU.

En la Figura 4.8, se muestra la cantidad de insulina en muestras de sangre de humano en ayuno (círculos amarillos) y la medición de insulina en la muestra de saliva de estos mismos individuos (rombos pequeños rojos), la medición de muestras de sangre en individuos

postprandial (rombos azul claro) y de una muestra de sangre de una persona diabética en ayuno (rombo azul oscuro). Como puede observarse en la comparación de sangre y saliva, la medición de insulina se corresponde a como ha sido descrita en [122]. En los individuos en ayuno la insulina es baja en comparación con aquellos que sí recibieron alimento (postprandial). Finalmente, en esta figura se muestra la importancia que para un paciente diabético tiene el poder realizarse una medición de insulina, dado que como se puede observar este individuo a pesar de estar en ayuno, tiene niveles muy elevados de insulina, lo cual puede determinar su tipo de diabetes o su tratamiento.

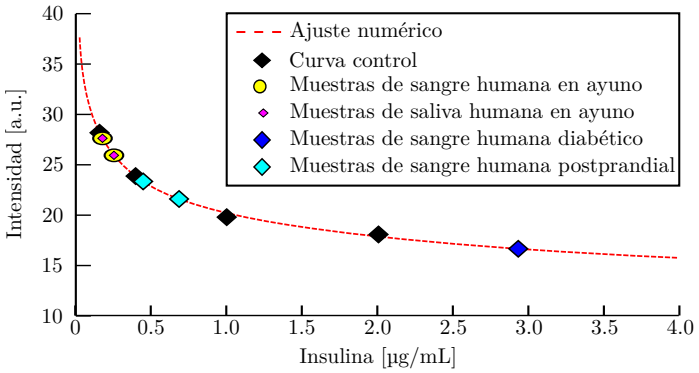


Figura 4.8: Resultados obtenidos con el MDU para insulina en muestra de sangre de humano.

Hasta este punto se han mostrado imágenes y resultados que competen a la medición de una sola biomolécula, en este caso, insulina. Sin embargo, es posible medir dos biomoléculas con la misma plataforma.

4.4.2. Detección de múltiples moléculas

En la Figura 4.9, se puede observar en rojo las nanopartículas que fueron marcadas para la medición de insulina y en verde para la medición de GH. Ninguna de ellas reconoce inespecíficamente a la otra biomolécula, por lo que no se observa una mezcla en la misma partícula de rojo y verde (amarillo), dado que como explicamos con anterioridad se utilizan dos longitudes de onda diferentes para excitar y observar la reacción de cada una de las nanopartículas.

Finalmente, en la Figura 4.10, se puede observar una imagen de MDM para tres biomoléculas: prolactina en azul, GH en verde e insulina en rojo.

Con esto se demuestra que con el dispositivo presentado en este documento se puede medir dos o más moléculas en el mismo sistema sin que haya interferencia.

4.5. Integración sensor glucosa-insulina

Como se ha mencionado a lo largo del presente trabajo, la intención de este proyecto es integrar dos sensores en una plataforma de medición. En este caso se han trabajado dos métodos de manera separada y recientemente se ha iniciado el proceso de integración, empezando por unificar las zonas de detección para ambos sensores. Para medir glucosa, se utiliza un método eléctrico (amperometría). Y para medir insulina, un método ELISA por competencia, a través del cual se obtienen imágenes que son procesadas para obtener la concentración. El sustrato a utilizar debe ser compatible con ambos métodos y mientras un sustrato de PDMS ha funcionado

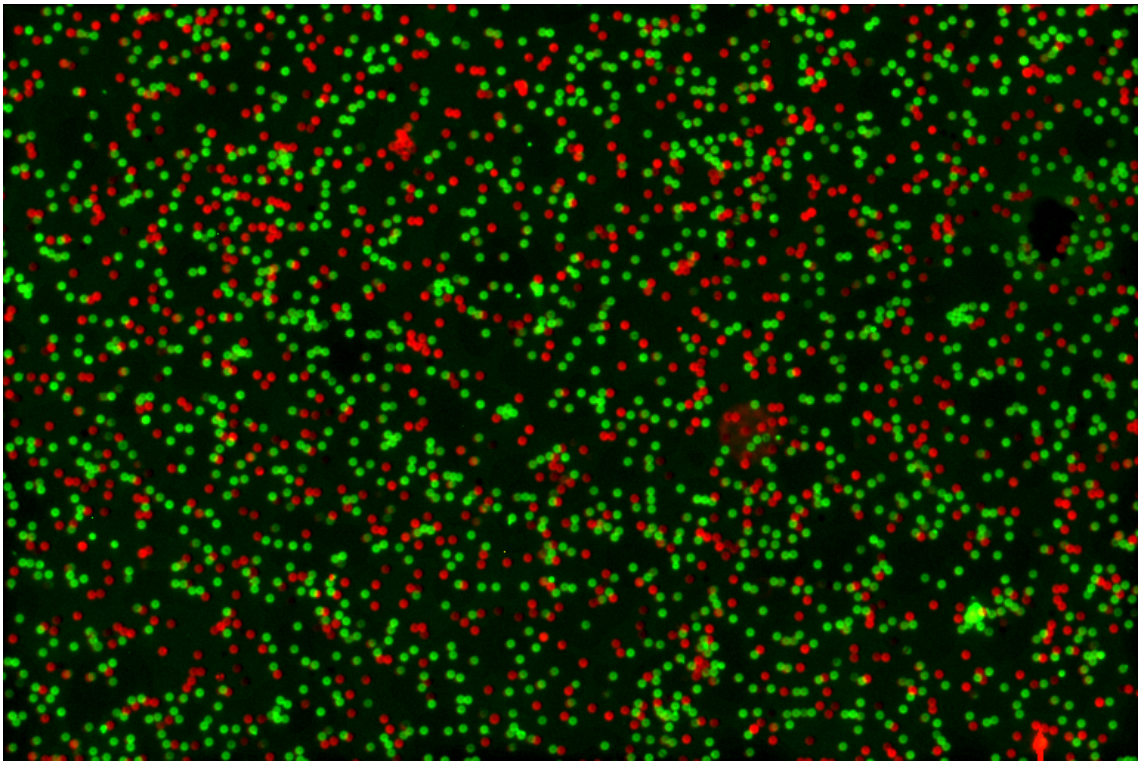


Figura 4.9: Resultados obtenidos en el MDM descrito para la medición de GH e insulina.

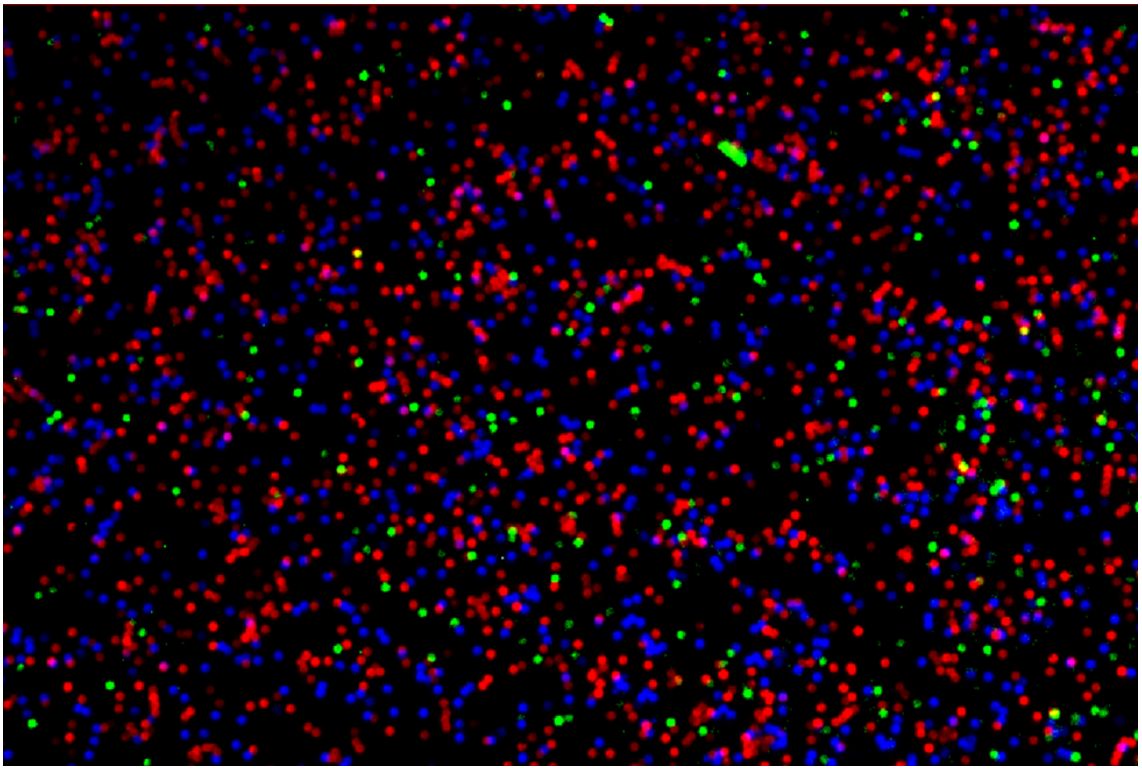


Figura 4.10: Resultados obtenidos en el MDM descrito para la medición de GH (verde), insulina (rojo) y PRL (azul) simultáneamente.

para la detección de insulina, no ha sido óptimo para integrar electrodos sensibilizados con la enzima glucosa oxidasa; por lo tanto se busca integrar ambos métodos en otros sustratos como

acrílico, sin embargo, la desventaja principal en el caso del método de medición de una molécula, es que la rugosidad es un factor que impacta en la movilidad de las microesferas magnéticas. Por ello, el proceso de integración de ambos sensores en la misma plataforma es un trabajo que esta en proceso.

Como sea, se ha preparado un diseño maquinado con microfabricación láser de una plataforma con Blu-ray, que ha probado ser viable para producir estructuras en un sustrato de acrílico de las dimensiones de un portaobjetos. El diseño que se ha maquinado tiene las especificaciones que se describen en la Figura 4.11.

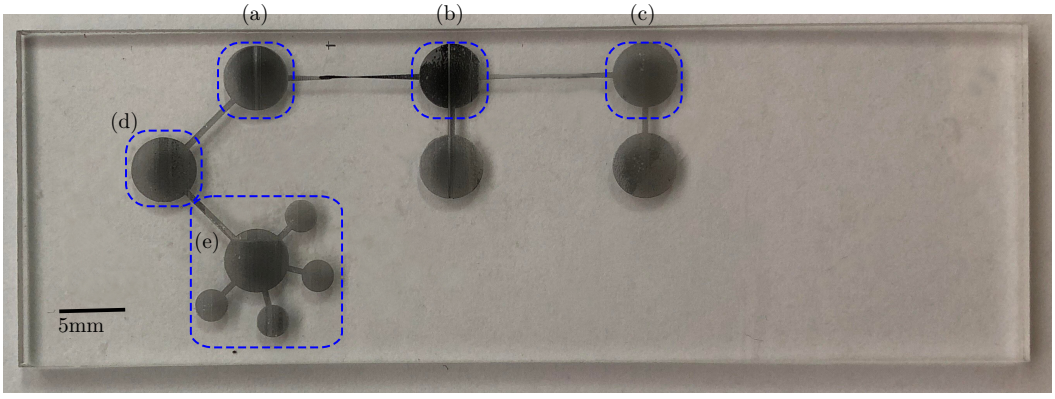


Figura 4.11: Diseño del chip dual. (d) es la zona de entrada de la muestra, (a) es la zona de entrada del antígeno, (b) la zona de reacción, (c) es la zona de detección de biomoléculas y (e) zona de medición de glucosa.

Este diseño esta basado en el diseño de la plataforma de medición de una sola molécula, que se ha probado y funcionado, el cual se muestra en la Figura 4.6.

5 — Conclusiones y trabajo futuro

Conclusiones

Existe una gran variedad de biosensores empleados en la industria de alimentos, inspección sanitaria, aplicaciones veterinarias y agrícola, monitoreo ambiental y análisis clínico; siendo éste último de interés en este trabajo. Los biosensores, empleados en el área de la salud, utilizan distintas técnicas para la detección del analito de interés. En el caso del presente trabajo, buscamos un método que nos permitiera la detección de glucosa e insulina y encontramos que existen una gran variedad de métodos reportados en la literatura; algunos son libre de marcadores, otros son específicos, unos mas fáciles de implementar que otros; sin embargo, se debió encontrar un método que nos permitiera medir ambos parámetros o bien, facilitar la intergración de ambos en una misma plataforma y que, además, nos permitiera realizar la medición integrando una plataforma electrónica. Por ello se eligió la amperometría como una excelente alternativa para este propósito.

Usualmente la glucosa se mide empleando un método eléctrico, amperometría, el cual es capaz de entregar una señal que puede procesarse para registrar el nivel de glucosa en una muestra. La amperometría utiliza un electrodo de trabajo y otro de referencia. En la literatura, se han reportado métodos amperométricos para medir insulina y glucosa-insulina de manera dual. Por ello, se ha propuesto un método de fabricación de microelectrodos, para aplicarlos en amperometría.

En el presente trabajo, se emplearon tres técnicas distintas de fabricación de estructuras para elaborar electrodos o microelectrodos, cada una de las cuales, presentó ventajas y/o desventajas frente a otros métodos. Además, se trabajó en la búsqueda de un material conductor que nos permitiera elaborar dichas estructuras con la ayuda de un molde. Se propuso en este trabajo un método para producir electrodos de manera rápida y de bajo costo.

En la literatura se han reportado distintos métodos para producir electrodos o microlectrodos con aplicaciones en amperometría; muchos de los cuales requieren: un gran número de pasos, de equipo especializado, uso de químicos tóxicos y equipos con costo elevado. Por ello, en el presente trabajo se emplearon tres métrodos de fabricación, que permitieron crear estucturas que pueden ser utilizadas como moldes. Luego se utilizó el método de doctor blading para depositar material conductor en dichos moldes, de esta manera, se obtuvieron electrodos para aplicarlos como sensores de glucosa.

En primer lugar, se empleo la técnica de molde-replica utilizando polidimetilsiloxano, para preparar un molde en escala milimétrica. Debido a la gran capacidad de réplica de este polímero, es posible obtener estructuras bien definidas a partir del molde maestro. Sin embargo, la principal desventaja de este método es que, el molde debe ser lo mál fiel posible a la estructura que se requiere reproducir. Debido a que el molde maestro en este trabajo se produjo, utilizando un termoplástico, no se pudo controlar la geometría ni las dimensiones, y por lo tanto la replica tampoco lo hizo, de manera que los electrodos producidos con éste método no fueron repetibles.

Aunque, la principal ventaja de este método es que se pueden producir estructuras de manera fácil, rápida y a muy bajo costo.

El segundo método utilizado para la elaboración de moldes, en un sustrato de polimetilmetacrilato, fue el método de maquinado CNC. Con éste método se pueden preparar estructuras de manera rápida, sin embargo la desventaja de este método es la presencia de rugosidad en la zona en donde se lleva a cabo el corte. Debido a que las dimensiones de la estructura requerida son menores, en comparación con las dimensiones del cortador, es dificil crear estructuras repetibles. Una de las formas de eliminar la rugosidad en un corte con herramienta giratoria es incrementar la velocidad del cortador o pasar varias veces en la misma region, sin embargo hay que considerar que el polimetilmetacrilato tiene una temperatura de transición vítrea baja, por lo que en lugar de cortar el material, se puede fundir, lo que hace colapsar una estructura de tales dimensiones ($< 1000\mu m$). La ventaja de utilizar este método es que permite, al igual que al anterior, preparar estructuras de manera rápida; aunque no ha sido un método repetible, debido a que el equipo utilizado es viejo, el cortador utilizado es de $\sim 800\mu m$ de diámetro, y el corte inicial sobre el sustrato, para establecer la coordenada inicial Z_0, no se realizó para evitar la rugosidad $\sim 5\mu m$.

Una mejora que se puede proponer en este punto es el uso de maquinado CNC para producir moldes en un sustrato de material como latón y entonces utilizar molde-replica para producir los moldes requeridos.

El tercer método utilizado, es el de microfabricación láser, el cual permitió crear estucturas con escalas micrométricas que pudieron ser utilizadas como micromoldes. Los moldes producidos con este método tampoco son repetibles, aunque debido a las dimensiones del spot del láser ($\sim 4\mu m$), el error asociado a la geometría de los moldes es menor.

Los electrodos fabricados con los tres métodos se caracterizaron eléctricamente con espectroscopia de impedancia y de dicha caracterización, se observó que el material de pasta de carbón utilizado es permeable. Por ello, el cambio de impedancia que los electrodos hechos de este material presentan en condiciones de humedad, debe considerarse cuando son empleados en aplicaciones biologicas.

Para probar la factibilidad de los electrodos en aplicaciones biológicas se prepararon sensores de glucosa con cada método y tres sensores con el método de microfabricación láser; el primero para medir temperatura; el segundo, para concentración celular en un medio de cultivo, y finalmente, uno para medir glucosa.

Los sensores de glucosa emplean un electrodo de referencia de plata y otro de trabajo hecho de pasta de carbón. La muestra debe llegar por capilaridad a la zona de detección mediante un canal fluídico hasta los electrodos, por ello el ensamble de los electrodos es muy importante en el diseño de los sensores de glucosa. En el mejor caso, el sensor acá presentado, fue ensamblado con un separador entre los electrodos para formar el canal requerido.

Los sensores de glucosa elaborados utilizando moldes hechos con el método molde-replica y el método de CNC, no son repetibles. Con maquinado CNC se pudieron elaborar electrodos para una medición múltiple, los resultados muestran que este método no es repetible; sin embargo fue útil para determinar la geometría optima para la integreación de un arreglo de cuatro sensores para una medición múltiple.

En el caso del sensor de temperatura, se probaron distintos materiales conductores hechos a base de pasta de carbón y se encontró que es posible producir termistores NTC y PTC, con cambiar el material con el que se elaboran los electrodos. El parámetro que se midió en este sensor, fue el cambio en la impedancia del electrodo. Se midió en un rango de 25 a $44°C$, la cuál es útil para aplicaciones fisiológicas.

Para medir concentración celular se eligieron electrodos de plata, por sus propiedades antibacterianas y se midieron cambios de impedancia para observar dichos cambios como función de las distintas concentraciones de células en un medio de cultivo. Cada una de las muestras empleadas fue de $7\mu L$ en suspensión celular C9.

El sensor de glucosa elaborado con microelectrodos de plata y de carbón modificado con glucosa oxidasa, hechos con microfabricación láser probó ser factible; para probar este sensor se emplearon muestras de agua destilada y deionizada con glucosa. El volúmen de las muestras fue $1\mu L$, dosificado con una micropipeta. Se midió en un rango de $10mg/dL$ to $240mg/dL$.

Para el procesamiento de las señales del sensor de glucosa se diseñó, un Hardware, que consiste en un circuito electrónico que es capaz de medir procesar la señal de un sensor para muestras con una concentración mínima de $2.5mg/dL$ y máxima de $300mg/dL$. Dicho hardware envia estas señales a una computadora que ejecuta un software que puede procesar, almacenar, leer y graficar lo datos de multiples una medición con múltiples senosres. De manera que con el hardware y software diseñado hace posible prescindir de un equipo tan sofisticado con el SMU u osciloscopio.

Por otro lado, el sensor de insulina presentado en este documento, consiste en una plataforma integrada en el que se puede medir una biomolécula o más de dos de manera simultánea; por ello en lugar de utilizar un método amperométrico para medir insulina, empleamos dicho método con el cual fue posible medir insulina con una concentración mínima de $\sim 100ng/mL$. Esté método se ha implementado con un técnica de detección óptica similar al ELISA.

El trabajo que se presenta en éste documento es parte de un proyecto mayor, por lo que el sensor de insulina se está caracterizando en el Laboratorio de Neuroendocrinología Comparada.

Con el trabajo sobre microelectrodos presentado, se publicó un artículo titulado “Use of a CD laser pickup head to fabricate microelectrodes in polymethylmethacrylate substrates for biosensing applications”.

Hemos sometido una solicitud de patente para un sensor de biomoléculas, con la cual se presentan las posibilidades para medir glucosa-insulina y otras biomoléculas. El número de solicitud de dicha patente es Mx/a/2016/008613.

Trabajo futuro

Aunque tanto el sensor de glucosa, como el de insulina se han probado y han mostrado factibiliad, no se han integrado, por lo que hay tareas que pueden hacerse a futuro.

- Producir microelectrodos mediante el método de fabricación láser, pero cambiando el método de depósito del material conductor, en este caso se puede emplear pulverización catódica.
- Integrar ambos sensores en la misma plataforma de medición.
- Integrar el software de procesamiento del sensor de glucosa con el software de procesamiento de imágenes del sensor de insulina.
- Fabricar la tarjeta de circuito impreso, para integrar el hardware de procesamiento de las señales del sensor de glucosa y control de la plataforma mecánica del sensor de insulina.

A — Preparación de electrodos

Objetivo: Elaborar microelectrodos de pasta de carbón y plata, en micromoldes elaborados en sustratos de PMMA o PDMS, utilizando la técnica de doctor blade.

A.1. Materiales

- Materiales conductores: pasta de conductora o tinta de plata.
- Micromolde.
- Toallas de papel.
- Varilla de acero inoxidable.
- Navaja.

A.2. Equipo

- Bata.
- Guantes.
- Cubrebocas.
- Medidor de impedancias.

A.3. Preparación

Por seguridad e higiene debe usarse guantes de nitrilo, cubrebocas, bata y gafas.

1. Cortar piezas de papel ($10x10cm$ aproximadamente) para limpiar la superficie del sustrato.
2. Colocar el sustrato sobre la toalla de papel.
3. Depositar pasta conductora sobre el micromolde[1].
4. Tomar la varilla de acero inoxidable y limpiar el exceso del material conductor mediante un barrido sobre el sustrato.

[1] cuando se emplea un sustrato de PDMS, en lugar de la varilla, se puede emplear una navaja.

5. Poner el sustrato en la parrilla a 50°C por 10 minutos cuando se emplea pasta de carbón; Cuando se emplea tinta de plata, 5 minutos son suficientes.

6. Verificar el el electrodo se haya depositado correctamente, mediante un microscopio óptico.

7. Caracterizar eléctricamente el electrodo mediante el medidor de impedancias (Ver apéndice B).

B — Uso del medidor de impedancias

Objetivo: Emplear el medidor de impedancias para la caracterización eléctrica de electrodos.

B.1. Materiales y equipo

- Sustrato con microelectrodo.
- Medidor de impedancias RLC meter E4980A.
- Lupa.

B.2. Uso

Por higiene debe usarse guantes de nitrilo, cubrebocas y bata.

Para desplazarse en el menú del medidor de impedancia se utilizan las flechas $\Leftarrow \Rightarrow \Uparrow \Downarrow$, para desplazarse a través de las opciones que se muestran en la pantalla.

El botón [MEAS SETUP] , se utiliza para cambiar la configuración del equipo y los parámetros de medición.

1. Encender el medidor de impedancia.
2. Verificar que los cables estén conectados con el medidor de impedancias y el micromanipulador, tal como se muestra en la Figura 2.32a.
3. Encender el medidor de impedancia.
4. Realizar el ajuste en circuito abierto.
   - [MEAS SETUP] → [Correction]
   - Verificar que la opción esté en **OFF** antes de iniciar el ajuste, además de verificar que las puntas del medidor **NO** se estén en contacto entre si.
   - [MEAS OPEN], esperar hasta que finalice el ajuste, y mientras esta corrección se lleva a cabo EVITE TOCAR o MOVER el equipo.
   - [MEAS OPEN] → [ON]
5. Realizar el ajuste en circuito cerrado.
   - [MEAS SETUP] → [Correction]
   - Verificar que la opción esté en **OFF** antes de iniciar el ajuste y que las puntas estén en contacto entre sí.

- MEAS SHORT, esperar hasta que finalice el ajuste, y mientras esta corrección se lleva a cabo EVITE TOCAR o MOVER el equipo.
- MEAS SHORT → ON
- DISPLAY FORMAT, Cuando las correcciones se han realizado correctamente deberá observar un valor de impedancia $\sim \mu\Omega$ a $m\Omega$.

6. Colocación de la muestra en la plataforma de medición, con ayuda de las platinas Figura 2.33(a,c).
   - Colocar la muestra en la platina que se muestra en la Figura 2.32c.
   - Con la platina de la Figura 2.33c, se puede ubicar la muestra a una zona cercana a las puntas.
   - Utilizar las perillas de la platina que se muestra en la Figura 2.33a, para posicionar las puntas del manipulador sobre los electrodos o estructuras deseadas.
   - Cuando se requiera posicionar sobre el electrodo, se debe utilizar la lupa para hacer que la punta toque la superficie sin dañar la estructura, tal como se muestra en la Figura 2.32d.
7. Configurar los parámetros deseados de medición.
   - Impedancia y frecuencia.
     - MEAS SETUP → FUNC → MORE → (Z,θ)
     - MEAS SETUP → FUNC → FREC , ajusta la frecuencias deseada mediante las teclas numéricas.
   - Tablas.
     - MEAS SETUP → LIST SETUP → FREC.
     - Desplazarse sobre la línea 1.
     - Puede usar las teclas numéricas para ajustar el valor deseado o configurar tablas logarítmicas FILL LOG , lineales FILL LINEAR o definidas por el usuario.
   - Inicio de medición.
     - MEAS SETUP → TRIG → MANUAL , para indicarle al equipo cuando iniciar mediante el botón trigger.
     - MEAS SETUP → TRIG → INT , para que el equipo inicie la medición automaticamente.
     - Se puede usar la función TRIG DELAY para que el equipo inicie la medición con el retardo especificado, después de que el TRIGGER ha sido activado, ya sea manual o interno
   - Guardar mediciones en archivo.
     - Para configurar el almacenamiento en una memoria USB externa, SAVE/RECALL → SAVE DATA → MEDIA → EXT.
     - Iniciar las mediciones SAVE/RECALL → SAVE DATA → START LOG, DISPLAY OPTION → LIST SWEEP → Trigger, con ello la medición se inicia.

- Para almacenar los datos guardados en la tabla construida por el medidor de impedancia SAVE/RECALL → SAVE DATA → SAVE AND STOP, el equipo muestra el nombre del archivo en la parte inferior del medidor de impedancia.
- El nombre del archivo no se puede cambiar y por defecto el equipo lo almacena con formato *.csv*. Los archivos pueden tener un nombre que vas desde *E498x000.csv* hasta *E498x999.csv*; cuando se almacena el archivo número *999*, el contador se reinicia a *000*; por lo que debe considerar esto para evitar sobre escribir algún archivo.

8. Retirar la muestra.

   - Utilizar la perilla ubicada en la parte superior de la platina que se muestra en la Figura 2.33a (girar en el sentido horario), para retirar las puntas de la muestra y evitar dañar la muestra.

9. Limpiar las platinas y las puntas del manipulador con un hisopo y alcohol.

C — Preparación de PDMS

Objetivo: Preparar PDMS Sylgard 184.

C.1. Materiales

- PDMS Sylgard 184.
- Agente curante para PDMS Sylgard 184.
- Varilla de acero inoxidable.
- Vaso de precipitado.

C.2. Equipo

- Balanza analítica.
- Dremel o herramienta similar.
- Desecador.

C.3. Preparación

Por seguridad e higiene debe usarse guantes de nitrilo, cubrebocas, bata y gafas.

1. Medir la cantidad requerida de PDMS, utilizando una báscula analítica y un vaso de precipitados.
2. Añadir el agente curante en una proporción 10 a 1 en peso, es decir, agregar el 10 % de la masa de polímero en agente curante.
3. Mezclar durante 5 minutos a 1500 rpm utilizando el Dremel con la varilla de acero inoxidable.
4. Desgasificar con un desecador durante el tiempo necesario para extraer las burbujas de aire generadas durante el mezclado (aproximadamente10 minutos).
5. Emplear la mezcla para replicar estructuras y curar a la temperatura necesaria.

D — Preparación de muestras con glucosa

Objetivo: Preparar muestras con distintas concentraciones de glucosa con un pH de 7.4

D.1. Materiales

- Glucosa-D.
- PBS.
- Buffer con pH de 4 y de 7.
- Agua destilada.
- Ácido clorhídrico.
- Probetas.
- Vaso de precipitados graduados de $1000ml$ y $100ml$.
- Agitador magnético.
- Guantes de nitrilo.
- Bata.
- Cubreboca.
- Gafas.

D.2. Equipo

- Parrilla con agitador (Heidolph).
- Balanza analítica.
- Medidor de pH (pH Meter 340 Corning).

D.3. Preparación

Por seguridad e higiene debe usarse guantes de nitrilo, cubrebocas, bata y gafas.

1. Limpiar el área de trabajo previamente.
2. Calibrar el medidor de pH mediante el empleo de los buffers de 4 y 7.
3. Dosificar $1l$ de agua destilada y $100ml$ de PBS, en un vaso de precipitados, mediante el uso de una probeta y un vaso de precipitados.
4. Colocar la solución sobre la parrilla y agitar con ayuda de un agitador magnético a $400rmp$ durante $3minutos$.
5. Medir el pH de la disolución.
6. Agregar una gota de ácido clorhídrico y repetir el paso 4, hasta lograr un pH de 7.4.
7. Tomar $100ml$ de la disolución obtenida en el paso 6 y verterla en un vaso de precipitados.
8. Pesar la cantidad de glucosa-D $[mg]$ con el uso de una balanza.
9. Agregar la glucosa-D $[mg]$ a $100ml$ de la disolución obtenida del paso 7.
10. Poner en la parrilla el vaso de agua con glucosa-D.
11. Agitar a $400rmp$ durante $3minutos$.
12. Verter la cantidad deseada en un frasco esterilizado color ambar.
13. Repetir los pasos del 7 al 12, tantas veces como cantidad de muestras con distintas concentraciones de glucosa se requiera.
14. Guardar la(s) muestra(s) en el refrigerador a $4°C$.
15. Limpiar y lavar los materiales utilizados.
16. Guardar los materiales y equipo utilizado.
17. Limpiar el lugar de trabajo.

E — Funcionalización de partículas magnéticas

Protocolo de funcionalización de partículas magnéticas (PM).

E.1. Materiales utilizados

- Buffer 1. Fostato de sodio 0.1 M PH. 7.4
- Buffer 2. PBS libre de Mg2+ y Ca2+ suplementado con 0.1 de BSA.
- Buffer 3. 0.2 M Tris w/0.1 BSA PH 8.5

E.2. Lavado de partículas magnéticas

Resuspender en contenido del vial vortexeándolo $30s$, transferir $100\mu l$ a un tubo de $1.5ml$ poner el imán y descartar el sobrenadante, agregar $1ml$ del buffer 1 y resuspender.

E.3. Funcionalización de partículas magnéticas

Utilizar $200\mu g$ de antígeno por $1ml/4x10^8 PM$

1. Transferir $1ml$ de PM en el buffer 1 para resuspenderlas.
2. Colocar el tubo en un imán durate un minuto y quitar el sobrenadante.
3. Resuspender las PM en el Buffer 1 y añadir $200\mu g$ de antígeno para llegar a un volumen total de acoplamiento de $1ml$.
4. Incubar durante $24hr$ a $37°C$ en constante agitación.
5. Colocar el tubo en un imán durate un minuto y quitar el sobrenadante.
6. Añadir $1ml$ del buffer 2, mezclar e incubar durante $5min$ a $2°C$.
7. Aplicar el imán durante $1min$, eliminar el sobrenadante, y repetir los pasos 5 y 6 una vez.
8. Incubar $4hrs$ a $37°C$ en $1ml$ del buffer 3 para desactivar el resto de grupos libres.
9. Aplicar el imán durante $1min$, eliminar el sobrenadante.
10. Agregar $1ml$ del buffer 1.
11. Aplicar el imán durante $1min$, eliminar el sobrenadante y repetir el paso 10.

F — Aplicaciones con microelectrodos

F.1. Sensor de temperatura

Adicionalmente, se diseñaron microelectrodos para medir temperatura en regiones menores a $1cm^2$ para aplicaciones biomédicas, los cuales consisten en un electrodo de carbón es de $10.4mm$ de largo y $50\mu m$ de ancho con un área de sensado de $1mm^2$. Se eligió una geometría de espiral para optimizar el área de sensado en regiones pequeñas.

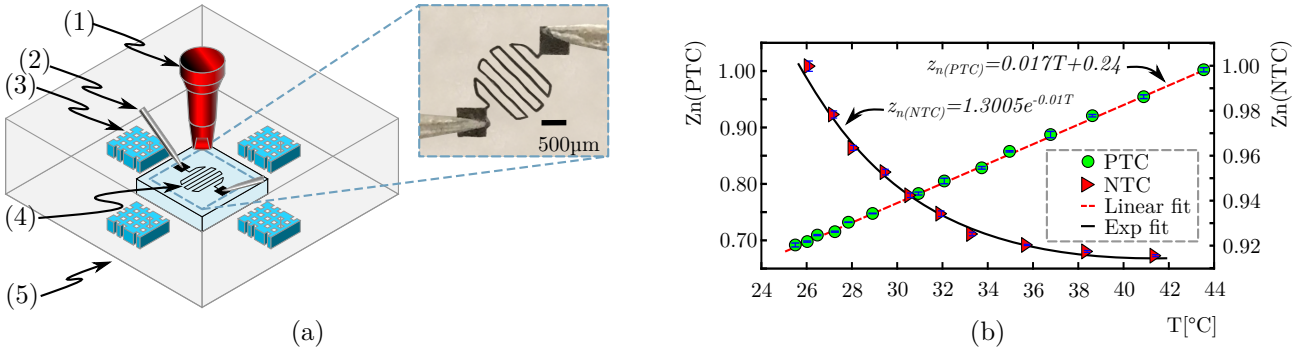


Figura F.1: Configuración del experimento para probar el sensor de temperatura (a) y respuesta de sensores de NTC y PTC (b).

En la configuración del experimento que se muestra en ls Figura F.1, (1) es la fuente de calor, (2) son las puntas de prueba, (3) el sensor de temperatura DTH11, (4) los microelectrodos de pasta de carbon paste y (5) una cámara.

El microelectrodo de pasta de carbón (Figura F.1a-4) se conectó al medidor de impedancias a través de las puntas de prueba (Figura F.1a-2); Una fuente de calor (Figura F.1a-1) se colocó a $15mm$ del microelectrodo (Figura F.1a-4) y cuatro sensores DHT11 (Figura F.1a-3) fueron utilizados a $1cm$ del microelectrodo (Figura F.1a-4) para propósito de calibración. Todos estos componentes fueron encapsulados en una cámara (Figura F.1a-5) para evitar corrientes de convección. La fuente de calor entonces se encendió mientras la temperatura en el interior de la cámara era monitoreada con una computadora y una tarjeta Arduino UNO; entonces la impedancia del microelectrodo fue registrada con un medidor de impedancias de manera simultánea. Un rango de 25 a $44°C$ fue cubierta, útil para aplicaciones de temperatura corporal humana evitando de esta manera la fundición del PMMA. Este rango fue escogido debido a que estos microelectrodos fueron utilizados para aplicaciones biológicas, como sensores de glucosa.

Se probaron dos materiales distintos sin modificar la geometría del molde obteniendo así sensores con coeficiente de temperatura positivo (PTC, *positive temperature coefficient*) y (NTC, *negative temperature coefficient*). El primero de ellos, hecho de pasta de carbón (LaserCon), presentó una respuesta lineal en un rango entre 25 y $40°C$ (Figura F.1b); El segundo, hecho de nuestra pasta de carbón, presentó una respuesta exponencial decreciente en el mismo rango de

temperatura. Por lo tanto, es posible diseñar y producir termistores PTC o NTC eligiendo el material depositado en nuestros micromoldes, y además es posible cambiar la sensibilidad del sensor dependiendo de la aplicación requerida.

F.2. Microelectrodos para conteo celular

También se probó la viabilidad de los microelectrodos de plata para aplicaciones de conteo celular en soluciones. Escogimos microelectrodos de plata para evitar algun tipo de bioactividad y porque tiene propiedades antibacteriales [123]. Una forma útil y menos invasiva para el conteo de células y proliferación celular puede ser obtenida en base a la técnica de medición de impedancia [124]. Cuando las células son cultivados sobre un arreglo de electrodos vessel, la impedancia medida debido a la interacción electrodo-células se incrementa con el número de células. Éste método hace posible la medición del número aproximado de células que se encuentran en una suspención o adheridas sobre el sustrato del electrodo. Así, se diseñó y fabricó un arreglo de electrodos que se muestran en la Figura F.2b-1. Mediciones de impedancia se hicieron para un medio de cultivo de celulas y cuatro concentraciones de suspensión celular C9 (C1 ($0.25x10^6$), C2 ($0.5x10^6$), C3 ($0.75x10^6$), C4 ($1x10^6$) $[celulas/mL]$) cuantificados por un hemocitómetro [125]. Para cada una de estas suspensiones, una gota de $7.5\mu L$ fue depositada sobre el electrodo Figura F.2b-1. El diseño fue adapatado de [124]). La impedancia fue medida de $40kHz$ to $1MHz$ at $10mV$; los resultados se muestran en la Figura F.2, Z and θ se normalizaron como $Z_n = \frac{Z-Z_0}{Z_0}$, $\theta_n = \frac{\theta-\theta_0}{\theta_0}$, donde Z_0 and θ_0 son la magnitud y ángulo de fase de la impedancia del medio de cultivo sin células.

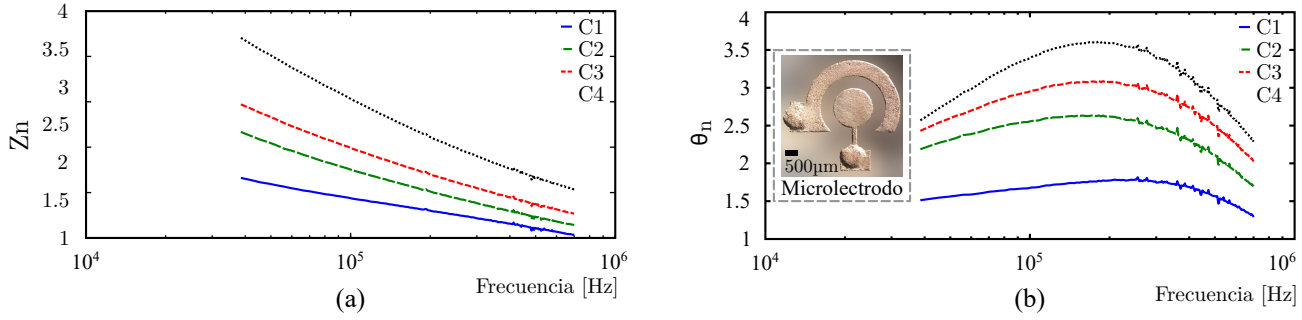


Figura F.2: Conteo de células mediante medición de impedancia (Z_n(a) y θ_n(b)) con microelectrodos de plata para diferentes concentraciones de suspensión Hep C9.

De la Figura F.2 se puede observar que la diferencia entre θ_0 y θ se incrementa con la concentración de células, de manera similar como se reporta en [124], entre mayor es la concentración de células el sistema es mas capacitivo. Una curva de calibración para el conteo de células puede ser obtenido graficando la impedancia como una funcion de la concentración de células. Además, la capacitancia puede ser calculada de las mediciones de impedancia, dichos cálculos muestran que estos valores están entre $6nF$ and $83nF$. Con esto, se puede implementar un circuito para medir estos cambios capacitivos, a través del uso de un temporizador analógico que genere una frecuencia que sea inversamente proporcional a la capacitancia; entonces, se puede utilizar un microcontrolador para calcular esta frecuencia a través del conteo de pulsos dentro de un periodo de tiempo dado. Desde luego esto queda fuera de los propósitos del presente trabajo, pero podría hacerse como trabajo futuro.

Biomed Microdevices (2017) 19:5
DOI 10.1007/s10544-016-0145-0

Use of a CD laser pickup head to fabricate microelectrodes in polymethylmethacrylate substrates for biosensing applications

Jehú López-Aparicio[1,2] · Mathieu Hautefeuille[1,2] · Sara Herrera-Domínguez[1,2] · Adriana Razo-de-León[1,2] · Mariel Cano-Jorge[1,2] · Ixchetl Rojas-Benito[1,2] · Mariana Centeno-Sierra[1,2] · Tatiana Fiordelisio-Coll[1,2] · Catalina Elizabeth Stern-Forgach[1,2]

© Springer Science+Business Media New York 2017

Abstract In this work, we report a simple fabrication method for microelectrodes on a polymethylmethacrylate substrate, using a low-cost laser platform based on a CD-DVD unit for direct rapid-prototyping. We used this laser microfabrication technique to etch any desired design on polymethylmethacrylate substrates to produce microchannels with controlled geometry, with a highly repeatable micron-scale resolution. Those shallow microchannels were then filled with a conductive paste of material of our choice that was converted into microelectrodes of desired shapes and geometries after drying. To validate our process, different geometries, sizes and materials were used as electrodes, and then tested for amperometry and impedance measurements. Development of these microelectrodes is motivated by their potential application in sensors and biosensors, such as glucose and cell counting, as demonstrated in this paper.

Keywords Microelectrodes · Microfabrication · Biosensing

1 Introduction

Electrodes are required in many applications to carry signals from one circuit element to another. In electronic devices for application like sensors (Moser and Gijs 2007; Huang et al. 2010) and biosensors (Radke and Alocilja 2005; Varshney and Li 2009), microelectrodes are necessary to obtain and record signals from non metallic elements like biological analytes or cell activities. They are used typically in voltammetry (Millan et al. 1994; Goyal et al. 2010), amperometry (Huang et al. 2010; Bandodkar et al. 2014; Hernández et al. 2011; Arslan et al. 2011; Kaur and Verma 2012) and impedance applications (Varshney et al. 2007). To avoid any type of bioactivity in biosensors, microelectrodes can be made of inert materials like gold, stainless steel, platinum, silver or carbon paste.

To fabricate microelectrodes onto low glass transition temperature (*Tg*) polymers is not simple due to melting. One common method to fabricate microelectrodes is conventional photolithography (Madou 2002). This technique is not always ideal because it requires several steps usually done in a clean room, and with specialized equipment, it is time consuming, and a different mask used to expose the photosensitive coating is necessary for any modification in the design. When one-step techniques are preferred or required, laser microfabrication techniques offer solutions to produce high-resolution microstructures that do not require a mask and the structure size can be controlled. Ultrashort pulsed lasers are used to create directly pattern of microelectrodes array on a glass substrate by removing a metal layer for instance (Hayden and Dalton 2010); this method requires a sputter coating step and any change in the design only requires modifying the design by software. However this process is not fully compatible with polymethylmethacrylate. Another method to produce microelectrodes is laser direct patterning by selectively curing nanoparticles from organometallic inks (Kang et al. 2011), but this method requires several steps before and after transferring the desired pattern, such as pre-baking and

✉ Jehú López-Aparicio
jehu@ciencias.unam.mx

[1] Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

[2] Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia, Facultad de Ciencias, UNAM, Ciudad de México, México

Published online: 10 January 2017

post-baking to ensure good structural behaviour. But these steps are not compatible with *Tg* polymers due to elevated temperature.

Techniques like inkjet printing are limited by the resolution that they can achieve, especially, if the substrate has an hydrophobic surface. For that reason this technique is combined with laser sintering. As an alternative, ultrashort pulsed laser ablation has been used to produce microelectrodes on a polymer and can be performed using a colloid of Ag nanoparticles (Lee et al. 2012). Furthermore, Direct Laser Plotting has been used recently as a prototyping method to patterning (Wang et al. 2012) microelectrodes and to fabricate microfluidic structures on polymers, but it is limited by its high cost and level of complexity.

In this work we present a mask-free and low-cost method to produce microelectrodes on substrates of polymethylmethacrylate (PMMA). This method does not require sputter coating, pre-baking or development steps. We used a laser ablation technique, by employing an existing laser platform based on a CD-DVD unit, to produce microchannels on substrates of PMMA and use it as mold to produce microelectrodes, with a method similar to what is reported in Hautefeuille et al. (2013).

2 Experimental

2.1 Materials and equipments

Graphite powder (Sigma-Aldrich), silver conductive ink (Chemtronics), carbon paste (LaserCon), adhesive tape Tuk 4020 (Industrias Tuk S.A. de C.V.), glucose oxidase (aspergillus niger Type VII, Sigma-Aldrich), D-Glucose, carbon nanoparticles (CNP) (Sigma-Aldrich, part no. 633100) and standard cell culture media (DMEM) (Gibco) were all used as purchased, without modification. The PMMA substrates were produced by cutting a comercial acrylic slide of $1'' \times 3''$ from large acrylic sheets (Plastiglas de México S.A. de C.V.) and used as such without further treatment. We used a homemade laser platform (Hautefeuille et al. 2012) in the laser ablation technique; an optical microscope (Nikon H550S) and profilometer (KLA Tencor D600) for inspection and characterization of the geometry; Precision LCR Meter (Agilent E4980A) for electrical characterization of microelectrodes and impedance measurements; temperature and humidity sensors (DHT11), Arduino UNO and a computer to characterize our temperature sensor and Interactive SourceMeter Instrument (Keithley Model 2405) to characterize our glucose sensor.

2.2 Mold preparation

The surface of the PMMA substrate was coated with CNP, as described in Hautefeuille et al. (2013). This method was indeed compatible with PMMA as presented in Section 3.1. Full characterization of our process will be presented elsewhere for PMMA as it is outside the scope of this paper. 2D patterns (Fig. 1a) were designed using *Inkscape*, open access software, and converted to a binary file to be used for the CNC program of our homemade platform. It was employed to irradiate the PMMA substrate with a laser beam to etch the desired design at the surface (Hautefeuille et al. 2012). Focusing the beam on the slide surface produces a micron-scale local etching (Fig. 1c), depth and width are controlled by laser conditions as in Hautefeuille et al. (2012) and presented for PMMA in (Fig. 3a). The etched substrate was cleaned with distilled water using an ultrasonic bath at 23 °C @ 10 min and ethyl alcohol to remove CNP excess. This process produces a micromold (Fig. 1d) with controlled geometry.

2.3 Microelectrode preparation

We mixed by hand the carbon paste (LaserCon) with glucose oxidase ($10 : 1\ w/w$) during 5 minutes as described in Wang and Zhang (2001), to prepare the glucose enzyme electrode, which is used in Section 3.6. We also prepared our own carbon paste by hand mixing graphite, cellulose and distilled water ($5 : 4 : 4\ w/w/w$) to use it in our temperature sensor (Section 3.4). A thin layer of conductive material (carbon paste or silver ink) was then used to fill the etched patterns by using doctor blading technique (Fig. 1e). The substrate was baked at 50 °C @ 5 min to dry the solvents and, as a result, the conductive material left inside the mold was then converted into microelectrodes of desired shapes and geometries (Fig. 1f). To validate our process, different geometries, sizes, and materials were used as electrodes and then tested in amperometry and impedance measurements.

An optical microscope was used to verify the patterning before and after cleaning the substrate, as well as to corroborate that the conductive material was well deposited. A profilometer was employed to measure the mold profile before and after filling it with conductive material. A scanning electron microscope was employed to measure the electrode width and inspect the surface after filling it with silver conductive ink. Finally, electrical characterization was performed by measuring the microelectrode impedance with a precision LCR-meter (Fig. 2a), which uses a four-terminal pair configuration to avoid any mutual inductance or interference of the test signal or due to the test tips, especially at

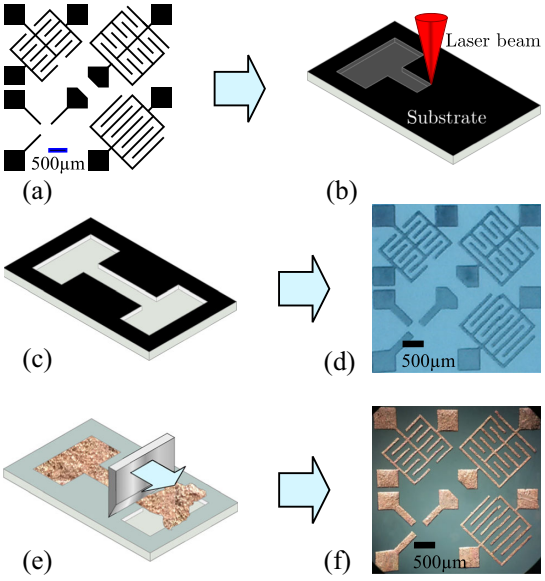


Fig. 1 Process to prepare microelectrodes using laser microfabrication technique on PMMA substrate. **a** is a 2D design transfered to a **b** PMMA substrate treated with CNP and irradiated with a laser beam, **c** after cleaning the CNP from PMMA substrate, **d** a custom etched design is obtained and, **e** Micromolds filled with a conductive material produces **f** microelectrodes

high frequencies. The impedance of the test tips used in this configuration was measured to be less than $1m\Omega$, in a range of 20 Hz to 2 MHz and 1 mV to 2 V.

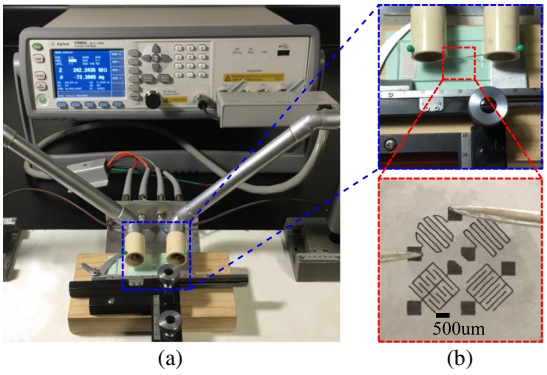


Fig. 2 Bench setup for electrical characterization of microelectrodes. **a** LCR-meter and **b** test tips on microelectrodes

3 Results and discussion

3.1 Geometry characterization

By modifying the lasing conditions, it is possible to vary the depth of the etching in acrylic slides (Fig. 3a). Height and width of each channel can be made design-specific. A resolution of 4 μm per etched pixel was used to guarantee reproducibility. We have observed that roughness in the bottom of the mold helps to retain the material when this is filled. Furthermore, an optimal depth of 20 μm or more (Fig. 3b ,c) in the etched mold is recommended to perform an appropriate filling of conductive material (Fig. 3d), particularly for viscous carbon paste. After profilometry, the resulting microelectrodes show a 2–3 microns lower thickness that was considered in the impedance calculations and an average roughness lower than 1 micron over the full electrodes.

3.2 Electrical characterization

Each microelectrode was characterized electrically by impedance measurements using signals from 5 mV to 2 V @ 20 Hz to 2 MHz at 25 °C. In dry conditions the magnitude of the impedance (Z) (Fig. 4a) of microelectrodes vary 1.5 % in carbon paste structures (Fig. 4a-1) and 2.85 % in silver structures (Fig. 4a-2) when the voltage applied to those

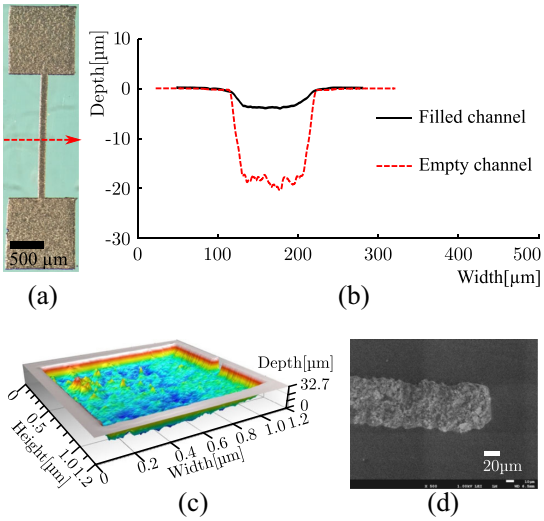


Fig. 3 **a** Micromold on PMMA substrate, **b** etch profile for empty and filled channel, **c** 3D profile of an entire PAD and **d** SEM micrograph of a silver microelectrode detail

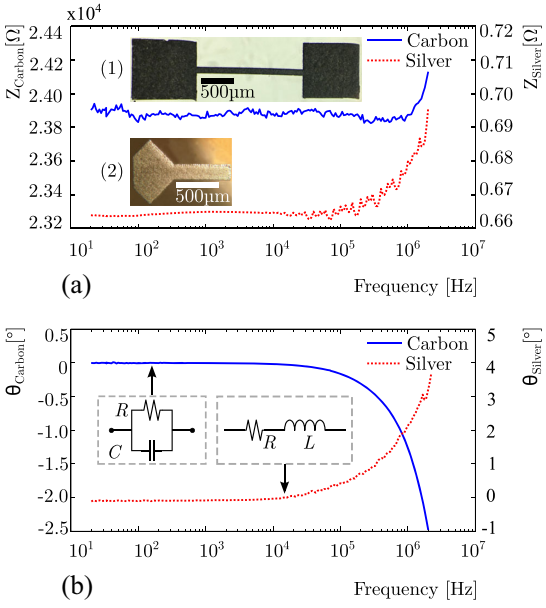


Fig. 4 (a-1) Impedance of carbon paste and (a-2) silver microelectrodes at 1 V from 20 Hz to 2 MHz

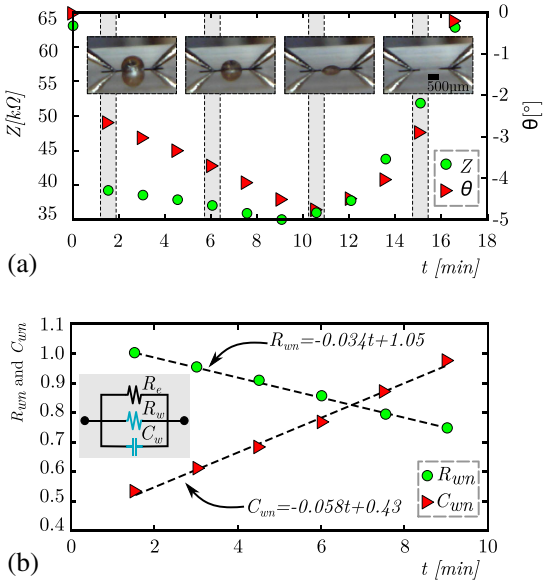


Fig. 5 **a** Impedance of carbon paste microelectrode (Fig. 4a-1) through the time when a drop of water is placed over the microelectrode and **b** normalized R_w and C_w

structures vary from 5 mV to 2 V. From the phase angle of the impedance (θ) (Fig. 4b) it is observed that the impedance response of silver microelectrodes fits to a resistance - inductance model in a series configuration. In the same manner, for carbon paste microelectrodes, the impedance fits to a resistance - capacitance model in a parallel configuration. Furthermore, Z remains constant for frequencies lower than 1 MHz, which is an advantage for applications that use signals in that range of frequencies or applications that use DC signal, like amperometric applications.

3.3 Water droplets measurements

Carbon microelectrodes are humidity sensitive and it can affect the total impedance of the system over time. For this reason, a drop of distilled water of 1 μL was placed over the carbon microelectrode, as shown in (Fig. 5a), then a series of impedance measurements was performed with a LCR Meter. This carbon paste microelectrode (Fig. 4a-1) was a straight line of 2 mm long and 100 μm wide with a square contact pad of 1 mm $\times$ 1 mm at each end. It was observed that the largest $\Delta\theta$ is between 80 and 300 Hz, whereas the largest ΔZ is for frequencies greater than 10 kHz. Z decreased due to resistance R_w and capacitance C_w caused by the water drop, and returned to its initial value (R_e) when the water drop evaporated (Fig. 5a).

In Fig. 5b it is shown in the electrical model when the water drop is placed over the microelectrode; R_w and C_w were calculated from measurements (Fig. 5a) and normalized as $R_{wn} = \frac{R_w - R_0}{R_0}$ and $\theta_{wn} = \frac{\theta_w - \theta_0}{\theta_0}$. In the first nine minutes C_{wn} is incremented 2.8 % each minute while R_{wn} 1.7 %. Thus, this behaviour in the impedance should be considered in a measurement process that takes more than one minute and less than ten minutes.

3.4 Temperature measurements

To test and validate our carbon paste microelectrodes in an application in dry conditions, we designed microelectrodes for sensing temperatures in regions less than 1 cm^2 for biomedical applications. This carbon microelectrode (Fig. 6d) was 10.4 mm long, 50 μm wide and 1 mm$\times$1 mm of sensing area. A spiral geometry was chosen in order to optimize the sensed area in small regions (Fig. 6d).

The carbon paste microelectrode (Fig. 6d) was connected to the LCR Meter through the test tips (Fig. 6b); a heat source (Fig. 6a) was placed at 15 mm of the microelectrode (Fig. 6d) and four DHT11 sensors (Fig. 6c) were used at 1 cm from the microelectrode (Fig. 6d) for calibration purposes. All these components were enclosed in a chamber (Fig. 6e) to avoid convection currents. The heat source was then turned on while the temperature inside the chamber was monitored with a computer and an

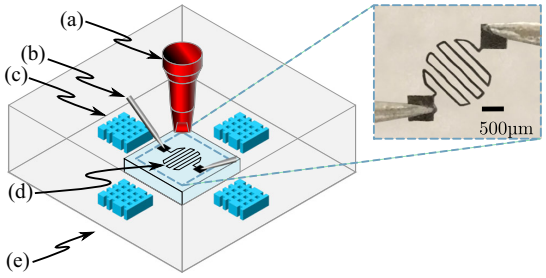


Fig. 6 Experiment setup used to test our temperature sensor where: **a** is the heat source, **b** test tips, **c** DTH11 sensor, **d** carbon paste microelectrode and **e** chamber

Arduino UNO; then the impedance of the microelectrode (Fig. 6d) was registered with the LCR meter simultaneously. A range from 25 to 44 °C was covered, useful for human or animal temperature applications, thus avoiding PMMA Melting. This range was chosen because these microelectrodes will be used in biological applications, like glucose sensors.

Two different materials were tested without modifying the geometry of the mold: a positive temperature coefficient (PTC) and a negative temperature coefficient (NTC) were then obtained. The first of them was made with carbon paste (LaserCon). It presented a linear response in a range between 25 to 40 °C (Fig. 7). The second one made with our own carbon paste, presented a decreasing exponential response in the same range of temperature. Thus, it is possible to design and produce PTC or NTC thermistors by choosing the material deposited in our micromolds, and it is also possible to vary the sensibility of the sensor depending on the application.

3.5 Biological cells counting electrodes

We also tested the viability of our silver microelectrodes (inset of Fig. 8) for cell counting applications in liquid conditions. We choose silver microelectrodes to avoid

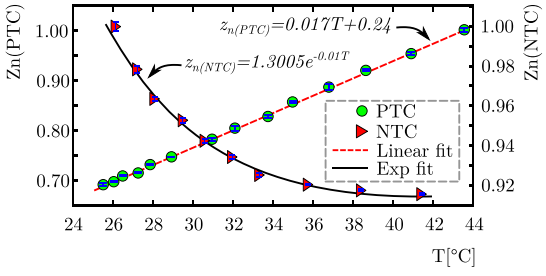


Fig. 7 Temperature measurement using a microelectrode of carbon paste (Fig. 6d)

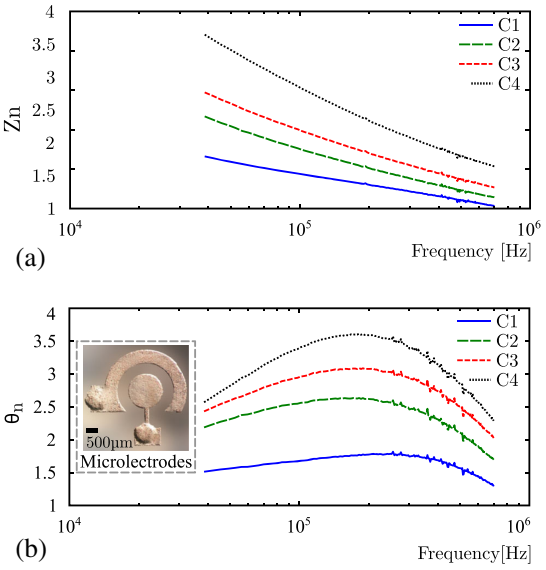


Fig. 8 Impedance measurement (Z_n **a** and θ_n **b**) using silver microelectrodes for cell-counting for different concentration of Hep C9-suspensions ($C1 = 0.25 \times 10^6$, $C2 = 0.5 \times 10^6$, $C3 = 0.75 \times 10^6$ and $C4 = 1 \times 10^6$) [cells/mL]

any type of bioactivity and because it has antibacterial properties (Ravindran et al. 2013). A useful and less invasive way for cell-counting and cell-culture proliferation evaluation may be obtained based on an impedance measurement technique (Huang et al. 2003). When cells are cultured over an electrode array vessel, the impedance measured due to the electrode-cells interaction increases with the number of cells. This method makes possible the measurement of the approximate number of cells found either in suspension or adhered over the electrode substrate. Thus, we designed and fabricated a microelectrode array system (inset of Fig. 8a). Impedance measurements were made for cell culture media and four concentrations of C9 liver cells suspensions (C1 (0.25×10^6), C2 (0.5×10^6), C3 (0.75×10^6), C4 (1×10^6) [cells/mL]) quantified with an hemocytometer (Phelan and May 2007). For each of these suspensions, a drop of 7.5 μL was placed over the electrode (inset of Fig. 8), design adapted from Huang et al. 2003) after homogenization and then the impedance was measured from 40 kHz to 1 MHz at 10 mV; the result is shown in (Fig. 8) Z and θ normalized as $Z_n = \frac{Z-Z_0}{Z_0}$, $\theta_n = \frac{\theta-\theta_0}{\theta_0}$, where Z_0 and θ_0 are the magnitude and phase angle of the impedance of the cell media without cells.

The difference between θ_0 and θ increases with cell concentration, providing similar results to those reported in Huang et al. (2003), the greater the cell concentration the

more capacitive the system is. A calibration curve used for cells counting can be obtained by plotting impedance as function of cells concentration. Furthermore, the capacitance, can be calculated from impedance measurements and was found to be between 6 nF and 83 nF. An electronic circuit can then be implemented to measure capacitive sensors by using an analog timer circuit which generates a frequency that is inversely proportional to capacitance and then a microcontroller can be used to calculate this frequency by counting pulses within a given period of time. This will be shown in future work as it falls outside the scope of this paper, which is to prove the feasibility of using our silver microelectrodes for cell counting.

3.6 Glucose measurement electrodes

As previously mentioned, carbon and silver microelectrodes were designed for amperometric applications. A carbon paste microelectrode was sensibilized with glucose oxidase (Section 2.3), for glucose sensing. We used two electrodes to measure a current that is proportional to the amount of glucose in the sample due to the reaction taking place at electrodes (Wang and Zhang 2001). For this reason, we prepared a square microelectrode of 2 mm×2 mm made of carbon paste mixed with glucose oxidase (Section 2.3) and a silver square microelectrode of 2 mm×2 mm to implement a glucose sensor, similar to a commercial one. After preparing the microelectrodes design they were wired (Fig. 9a) and a double faced adhesive (Fig. 9b) was used as separator to create a microchannel for input of the liquid sample when the microelectrodes are assembled (our glucose sensor) (Fig. 9c). Square microelectrodes of 2 mm×2 mm were chosen as it was the minimum size required to sense a glucose concentration of 10 mg/dL in 1 μL. Then our glucose sensor was connected to a SourceMeter Unit to supply 700 mV to the electrodes (Carbon microelectrode to Vcc and silver microelectrode to GND) and measure at the same time the current produced by the sensor.

Liquid samples of 1 μL with different glucose concentrations were measured. They were prepared by mixing

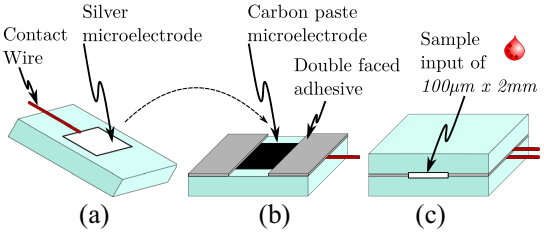


Fig. 9 Microelectrode assembly process. **a** Silver microelectrode on PMMA substrate wired, **b** Carbon paste microelectrode on PMMA and a double faced adhesive was used as separator over the substrate and **c** assembly of both microelectrodes

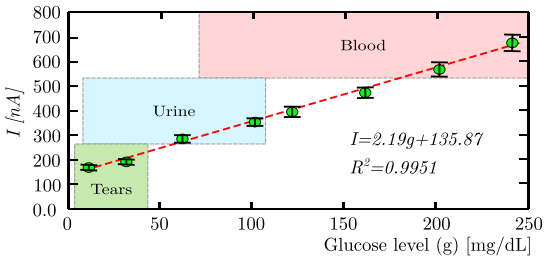


Fig. 10 Glucose measurement by using silver and carbon paste microelectrodes (Fig. 8) and typical glucose levels in tears, urine and blood (Sen and Sarin 1980)

different amounts of glucose (mg/dL) (D-Glucose) in distilled and deionized water, previously prepared with phosphate buffered saline (PBS) and sodium hydroxide (NaOH) to guarantee a $pH = 7.4$. The samples were then measured with commercial glucometers. It is interesting to observe that the glucometers could display discrepancias of up to 25 % with our calibrated solutions. From the results (Fig. 10) it can be seen that our microelectrode enabled the measuring of glucose concentration in a range from 10 mg/dL to 240 mg/dL. We also designed an electronic system to measure concentrations from 10 mg/dL to 240 mg/dL; this electronic system is able to sense current between 100 nA and 1 μA; this current is converted to a voltaje signal between 1 V to 18 V, then processed to determine a glucose concentration of a sample. With these results it is possible to confirm the viability of our electrodes to be used in amperometric sensors as well.

4 Conclusions

We report a low cost method to produce microelectrodes on polymethylmethacrylate substrates with a controlled geometry and size, with two different materials to use them in biological applications. We used a laser microfabrication technique to etch acrylic slides with a desired geometry to produce micromolds, which were filled with a conductive material and converted into microelectrodes after drying. This process gave us an alternative to develop microelectrodes at low cost on polymethylmethacrylate substrates. To prove the applicability of our method, we designed and produced microelectrodes to measure temperature; the results showed that it is possible to design PTC or NTC thermistors by changing the conductive material. Moreover, we produced a silver microelectrode array system for biological cell counting; the results showed that it is possible to detect cell concentration in media culture by impedance measurements. Finally, we designed an amperometric glucose sensor in which we used a silver microelectrode and a carbon paste microelectrode modified with glucose

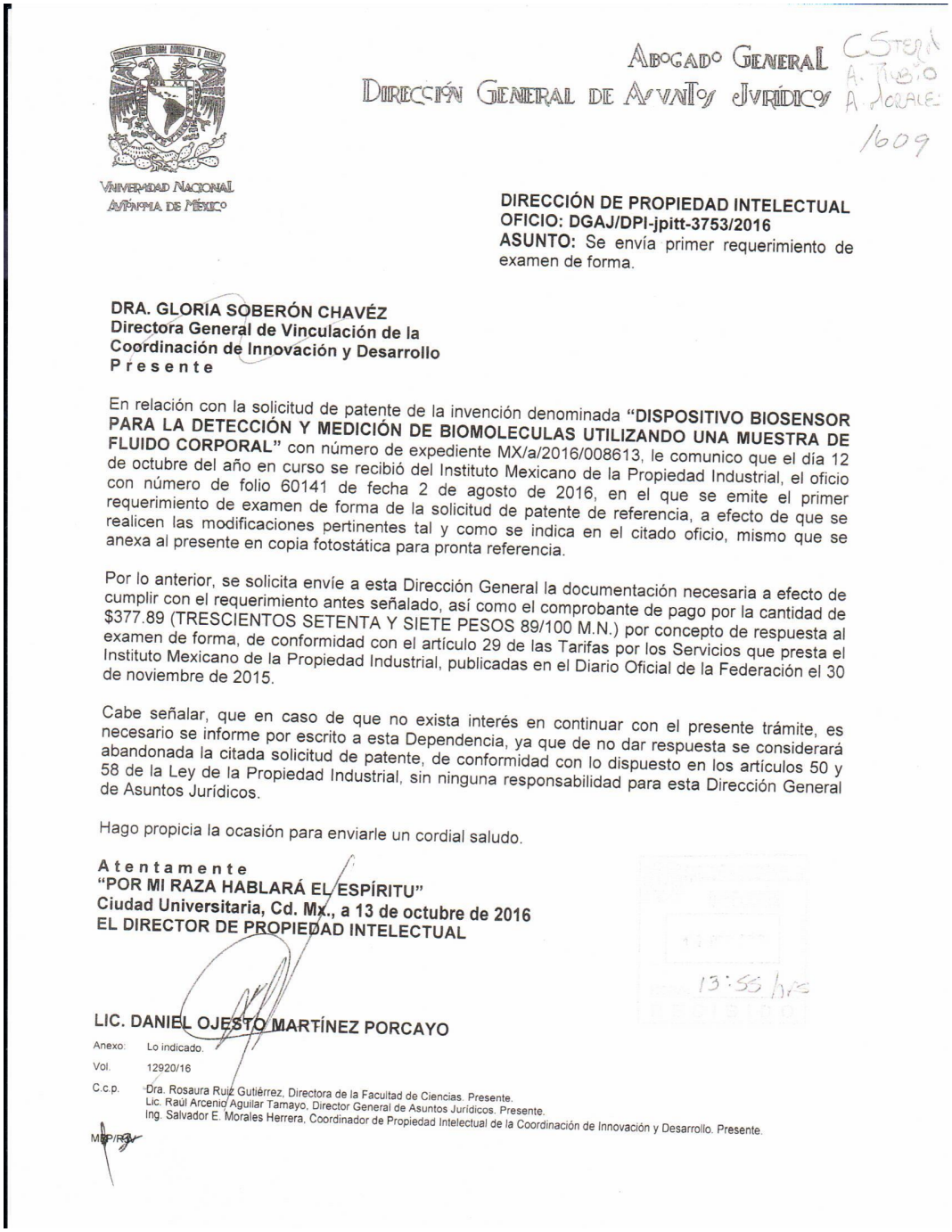
oxidase, to measure glucose from 10 mg/dL to 240 mg/dL, using samples of 1 μL. Results show that it is possible to use those structures to measure glucose levels. Furthermore, our electronic system is able to process the signal produced in our microelectrode, in this way it is not necessary to use sophisticated equipment like an SMU meter. Therefore, we report a low cost, quick and inexpensive method to produce microelectrodes, which proves to be feasible to produce microelectrodes on demand.

Acknowledgments The authors thank LaNSBioDyT, DGAPA-PAPIIT grant #TA100315, CONACyT #271573 and #246988. JL thanks Aaró n Cruz-Ramírez and Diego Zamarrón-Hernández for their technical support.

References

F. Arslan, S. Ustabaş, H. Arslan. Sensors **11**(8), 8152 (2011)
A.J. Bandodkar, W. Jia, C. Yardımcı, X. Wang, J. Ramirez, J. Wang. Anal. Chem. **87**(1), 394 (2014)
R.N. Goyal, V.K. Gupta, S. Chatterjee. Sens. Actuators B **149**(1), 252 (2010)
M. Hautefeuille, L. Cabriales, R. Pimentel-Domínguez, V. Velázquez, J. Hernández-Cordero, L. Oropeza-Ramos, M. Rivera, M. Carreón-Castro, M. Grether, E. López-Moreno. Lab Chip **13**(24), 4848 (2013)
M. Hautefeuille, A.K. Jimenez-Zenteno, P.R. Pérez-Alcázar, K.M. Hess-Frieling, G. Fernandez-Sanchez, V. Velazquez, M. Grether-Gonzalez, E. Lopez-Moreno. Appl. Opt. **51**(8), 1171 (2012)
C. Hayden, C. Dalton. Appl. Surf. Sci. **256**(12), 3761 (2010)
M. Hernández, C.A. Galán, G.A. Álvarez, M. Páez. Información Tecnológica **22**(6), 25 (2011)
X. Huang, D. Greve, D. Nguyen, M. Domach. in *Sensors, 2003. Proceedings of IEEE*, Vol. 1 (IEEE, 2003), pp. 304–309
X.J. Huang, L. Aldous, A.M. O'Mahony, F.J. del Campo, R.G. Compton. Anal. Chem. **82**(12), 5238 (2010)
B. Kang, S. Ko, J. Kim, M. Yang. Opt. Express **19**(3), 2573 (2011)
A. Kaur, N. Verma. European Journal of Experimental Biology **2**(2), 389 (2012)
S. Lee, D. Lee, C. Lee, Y. Lee, S.T. Wereley, J. Oh. Physica Status Solidi (a) **209**(11), 2142 (2012)
M.J. Madou, *Fundamentals of Microfabrication: the Science of Miniaturization* (CRC Press, Boca Raton, 2002)
K.M. Millan, A. Saraullo, S.R. Mikkelsen. Anal. Chem. **66**(18), 2943 (1994)
Y. Moser, M.A. Gijs. J. Microelectromech. Syst. **16**(6), 1349 (2007)
K. Phelan, K.M. May. Curr. Protoc. Cell Biol., 1–1 (2007)
S.M. Radke, E.C. Alocilja. Biosens. Bioelectron. **20**(8), 1662 (2005)
A. Ravindran, P. Chandran, S.S. Khan. Colloids Surf. B: Biointerfaces **105**, 342 (2013)
D. Sen, G. Sarin. Br. J. Ophthalmol. **64**(9), 693 (1980)
M. Varshney, Y. Li. Biosens. Bioelectron. **24**(10), 2951 (2009)
M. Varshney, Y. Li, B. Srinivasan, S. Tung. Sens. Actuators B **128**(1), 99 (2007)
J. Wang, X. Zhang. Anal. Chem. **73**(4), 844 (2001)
L. Wang, R. Kodzius, X. Yi, S. Li, Y.S. Hui, W. Wen. Sens. Actuators B **168**, 214 (2012)

H — Solicitud de patente



ABOGADO GENERAL
DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS JURÍDICOS

C. STERN
A. TRUBIO
A. MORALES
1609

VNIVERSIDAD NACIONAL
AVTÓNOMA DE MÉXICO

DIRECCIÓN DE PROPIEDAD INTELECTUAL
OFICIO: DGAJ/DPI-jpitt-3753/2016
ASUNTO: Se envía primer requerimiento de examen de forma.

DRA. GLORIA SOBERÓN CHAVÉZ
Directora General de Vinculación de la Coordinación de Innovación y Desarrollo
P r e s e n t e

En relación con la solicitud de patente de la invención denominada **"DISPOSITIVO BIOSENSOR PARA LA DETECCIÓN Y MEDICIÓN DE BIOMOLECULAS UTILIZANDO UNA MUESTRA DE FLUIDO CORPORAL"** con número de expediente MX/a/2016/008613, le comunico que el día 12 de octubre del año en curso se recibió del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, el oficio con número de folio 60141 de fecha 2 de agosto de 2016, en el que se emite el primer requerimiento de examen de forma de la solicitud de patente de referencia, a efecto de que se realicen las modificaciones pertinentes tal y como se indica en el citado oficio, mismo que se anexa al presente en copia fotostática para pronta referencia.

Por lo anterior, se solicita envíe a esta Dirección General la documentación necesaria a efecto de cumplir con el requerimiento antes señalado, así como el comprobante de pago por la cantidad de $377.89 (TRESCIENTOS SETENTA Y SIETE PESOS 89/100 M.N.) por concepto de respuesta al examen de forma, de conformidad con el artículo 29 de las Tarifas por los Servicios que presta el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, publicadas en el Diario Oficial de la Federación el 30 de noviembre de 2015.

Cabe señalar, que en caso de que no exista interés en continuar con el presente trámite, es necesario se informe por escrito a esta Dependencia, ya que de no dar respuesta se considerará abandonada la citada solicitud de patente, de conformidad con lo dispuesto en los artículos 50 y 58 de la Ley de la Propiedad Industrial, sin ninguna responsabilidad para esta Dirección General de Asuntos Jurídicos.

Hago propicia la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 13 de octubre de 2016
EL DIRECTOR DE PROPIEDAD INTELECTUAL

13:55 hrs

LIC. DANIEL OJESTO MARTÍNEZ PORCAYO

Anexo: Lo indicado.
Vol. 12920/16
C.c.p. Dra. Rosaura Ruiz Gutiérrez, Directora de la Facultad de Ciencias. Presente.
Lic. Raúl Arcenio Aguilar Tamayo, Director General de Asuntos Jurídicos. Presente.
Ing. Salvador E. Morales Herrera, Coordinador de Propiedad Intelectual de la Coordinación de Innovación y Desarrollo. Presente.

MEP/RGV

Bibliografía

[1] Dorothee Grieshaber, Robert MacKenzie, Janos Voeroes, and Erik Reimhult. Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. *Sensors*, 8(3):1400–1458, 2008.

[2] Douglas Arvid Skoog, F Holler, R Douglas A Stanley, Mauri Aucejo, AdelaLlobat Estellés, María Herrèz Hernández, RosaAdela Mauri Aucejo, María Llobat Estellés, Rosa Herrèz Hernández, Sierra Alonso, et al. *Principios de análisis instrumental*. Number 543.4/. 5. Cengage Learning,, 2008.

[3] Joseph Wang. *Analytical electrochemistry*. John Wiley & Sons, 2006.

[4] Tony Scully. Diabetes in numbers. *Nature*, 485(7398):S2–S3, 2012.

[5] Steven E Kahn, Rebecca L Hull, and Kristina M Utzschneider. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 444(7121):840–846, 2006.

[6] Salvador Villalpando, Vanessa De la Cruz, Rosalba Rojas, Teresa Shamah-Levy, Marco Antonio Ávila, Berenice Gaona, Rosario Rebollar, and Lucia Hernández. Prevalence and distribution of type 2 diabetes mellitus in mexican adult population: a probabilistic survey. *Salud pública de México*, 52:S19–S26, 2010.

[7] Ralph A DeFronzo. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*, 58(4):773–795, 2009.

[8] Sangeeta R Kashyap and Ralph A Defronzo. The insulin resistance syndrome: physiological considerations. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 4(1):13–19, 2007.

[9] Joseph Wang. Electrochemical glucose biosensors. *Chemical reviews*, 108(2):814–825, 2008.

[10] Himanshu Sharma, Diep Nguyen, Aaron Chen, Valerie Lew, and Michelle Khine. Unconventional low-cost fabrication and patterning techniques for point of care diagnostics. *Annals of biomedical engineering*, 39(4):1313–1327, 2011.

[11] Anthony Turner, Isao Karube, and George S Wilson. *Biosensors: fundamentals and applications*. Oxford University Press, 1987.

[12] Saraju P Mohanty and Elias Kougianos. Biosensors: a tutorial review. *IEEE Potentials*, 25(2):35–40, 2006.

[13] Leland C Clark and Champ Lyons. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of sciences*, 102(1):29–45, 1962.

[14] Da-Wen Sun. *Handbook of food safety engineering*. John Wiley & Sons, 2011.

[15] Alexander Sabelnikov, Vladimir Zhukov, and Ruth Kempf. Probability of real-time detection versus probability of infection for aerosolized biowarfare agents: A model study. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(11):2070–2077, 2006.

[16] Sarmishtha Ghoshal, Debasis Mitra, Sudip Roy, and Dwijesh Dutta Majumder. Biosensors and biochips for nanomedical applications: a review. *Sensors & Transducers*, 113(2):1, 2010.

[17] J Curie and P Curie. Development, par pression, de l'electicite polarise dans les crystaux hemiedbes et fares inclines. *Comp. Rend*, 91:4, 1880.

[18] G Saubrey. The use of quartz crystal oscillators for weighing thin layers and for microweighing applications. *Z. Phys.*, 155:206–222, 1959.

[19] CK O'sullivan and GG Guilbault. Commercial quartz crystal microbalances–theory and applications. *Biosensors and bioelectronics*, 14(8):663–670, 1999.

[20] M Minunni and M Mascini. A piezoelectric biosensor as a direct affinity sensor. In *Optical Sensors and Microsystems*, pages 143–150. Springer, 2002.

[21] K Kanazawa and Nam-Joon Cho. Quartz crystal microbalance as a sensor to characterize macromolecular assembly dynamics. *Journal of Sensors*, 2009, 2009.

[22] AW Warner and CD Stockbridge. Mass measurement with resonating crystalline quartz. *KH Behrndt (Plenum Press Inc., New York). Warner, AW, and Stockbridge, CD, J. Appl. Phys*, 34:437, 1963.

[23] Alan Shons, Frank Dorman, and John Najarian. An immunospecific microbalance. *Journal of biomedical materials research*, 6(6):565–570, 1972.

[24] C Raman Suri, PK Jain, and GC Mishra. Development of piezoelectric crystal based microgravimetric immunoassay for determination of insulin concentration. *Journal of biotechnology*, 39(1):27–34, 1995.

[25] Declan A Healy, Conor J Hayes, Paul Leonard, Louise McKenna, and Richard O?Kennedy. Biosensor developments: application to prostate-specific antigen detection. *TRENDS in Biotechnology*, 25(3):125–131, 2007.

[26] Jeong Hoon Lee, Kyo Seon Hwang, Jaebum Park, Ki Hyun Yoon, Dae Sung Yoon, and Tae Song Kim. Immunoassay of prostate-specific antigen (psa) using resonant frequency shift of piezoelectric nanomechanical microcantilever. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(10):2157–2162, 2005.

[27] Michael Plomer, George G Guilbault, and Bertold Hock. Development of a piezoelectric immunosensor for the detection of enterobacteria. *Enzyme and microbial technology*, 14(3):230–235, 1992.

[28] George G Guilbault. Determination of formaldehyde with an enzyme-coated piezoelectric crystal detector. *Anal. Chem.;(United States)*, 55(11), 1983.

[29] Tzong-Zeng Wu. A piezoelectric biosensor as an olfactory receptor for odour detection: electronic nose. *Biosensors and Bioelectronics*, 14(1):9–18, 1999.

[30] S-M Chang, B Ebert, E Tamiya, and I Karube. Development of chemical vapour sensor using saw resonator oscillator incorporating odorant receptive lb films. *Biosensors and Bioelectronics*, 6(4):293–298, 1991.

[31] Gudrun Bunte, Jürgen Hürttlen, Heike Pontius, Kerstin Hartlieb, and Horst Krause. Gas phase detection of explosives such as 2, 4, 6-trinitrotoluene by molecularly imprinted polymers. *Analytica chimica acta*, 591(1):49–56, 2007.

[32] Xueji Zhang, Huangxian Ju, and Joseph Wang. *Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications*. Academic Press, 2011.

[33] J Des Wright and Keith Rawson. Electrochemical sensors based on impedance measurement of enzymelcatalyzed polymer dissolution: theory and applications. *Analytical Chemistry*, 67(27):3928–3935, 1995.

[34] Christine Berggren, Bjarni Bjarnason, and Gillis Johansson. Capacitive biosensors. *Electroanalysis*, 13(3):173–180, 2001.

[35] Richard F Taylor, Ingrid G Marenchic, and Richard H Spencer. Antibody-and receptor-based biosensors for detection and process control. *Analytica chimica acta*, 249(1):67–70, 1991.

[36] Ibolya Bontidean, Christine Berggren, Gillis Johansson, Elisabeth Csöregi, Bo Mattiasson, Jonathan R Lloyd, Kenneth J Jakeman, and Nigel L Brown. Detection of heavy metal ions at femtomolar levels using protein-based biosensors. *Analytical Chemistry*, 70(19):4162–4169, 1998.

[37] Hanbin Ma, Richard WR Wallbank, Reza Chaji, Jiahao Li, Yuji Suzuki, Chris Jiggins, and Arokia Nathan. An impedance-based integrated biosensor for suspended dna characterization. *Scientific reports*, 3:2730, 2013.

[38] Rangadhar Pradhan, Analava Mitra, and Soumen Das. Impedimetric characterization of human blood using three-electrode based ecis devices. *Journal of Electrical Bioimpedance*, 3(1):12–19, 2012.

[39] Reza Karimi Shervedani, Abdolhamid Hatefi Mehrjardi, and Najmehsadat Zamiri. A novel method for glucose determination based on electrochemical impedance spectroscopy using glucose oxidase self-assembled biosensor. *Bioelectrochemistry*, 69(2):201–208, 2006.

[40] A Caduff, F Dewarrat, M Talary, G Stalder, L Heinemann, and Yu Feldman. Non-invasive glucose monitoring in patients with diabetes: a novel system based on impedance spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(5):598–604, 2006.

[41] Jose M Guisan. *Immobilization of enzymes and cells*, volume 22. Springer, 2006.

[42] Jonathan S Daniels and Nader Pourmand. Label-free impedance biosensors: Opportunities and challenges. *Electroanalysis*, 19(12):1239–1257, 2007.

[43] J Ross Macdonald. Impedance spectroscopy. *Annals of biomedical engineering*, 20(3):289–305, 1992.

[44] Reza Karimi Shervedani and Abdolhamid Hatefi-Mehrjardi. Electrochemical characterization of directly immobilized glucose oxidase on gold mercaptosuccinic anhydride self-assembled monolayer. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 126(2):415–423, 2007.

[45] Petr Skládal. Advances in electrochemical immunosensors. *Electroanalysis*, 9(10):737–745, 1997.

[46] Chao Yang, Daniel Rairigh, and Andrew Mason. On-chip electrochemical impedance spectroscopy for biosensor arrays. In *Sensors, 2006. 5th IEEE Conference on*, pages 93–96. IEEE, 2006.

[47] Calum J McNeil, Dale Athey, Mark Ball, Wah On Ho, Steffi Krause, Ron D Armstrong, J Des Wright, and Keith Rawson. Electrochemical sensors based on impedance measurement of enzyme-catalyzed polymer dissolution: theory and applications. *Analytical Chemistry*, 67(21):3928–3935, 1995.

[48] Hong Cai, Thomas Ming-Hung Lee, and I-Ming Hsing. Label-free protein recognition using an aptamer-based impedance measurement assay. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 114(1):433–437, 2006.

[49] Jung A Lee, Seongpil Hwang, Juhyoun Kwak, Se Il Park, Seung S Lee, and Kwang-Cheol Lee. An electrochemical impedance biosensor with aptamer-modified pyrolyzed carbon electrode for label-free protein detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 129(1):372–379, 2008.

[50] William E Moerner. New directions in single-molecule imaging and analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(31):12596–12602, 2007.

[51] W Gregory Cox and Victoria L Singer. Fluorescent dna hybridization probe preparation using amine modification and reactive dye coupling. *Biotechniques*, 36(1):114–123, 2004.

[52] Bo Liedberg, Claes Nylander, and Ingemar Lunström. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and actuators*, 4:299–304, 1983.

[53] Francisco J. García Vidal y Luis Martín Moreno. *Plasmones superficiales*. Universidad de Dijon, 2008.

[54] Xudong Fan, Ian M White, Siyka I Shopova, Hongying Zhu, Jonathan D Suter, and Yuze Sun. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. *analytica chimica acta*, 620(1):8–26, 2008.

[55] Stefan Maier. *Plasmonics: Fundamentals and Applications*. Springer, 2007.

[56] Lulu Zhang, Xing Chen, Haoyuan Cai, Hui Li, Jianhai Sun, Dafu Cui, and Chaoya Peng. P1. 3.15 a microfluidic-based pdms prism for spr imaging system. *Tagungsband*, pages 971–973, 2012.

[57] Eliza Hutter and Janos H Fendler. Exploitation of localized surface plasmon resonance. *Advanced Materials*, 16(19):1685–1706, 2004.

[58] Dachao Li, Jia Yang, Peng Wu, Di Yang, Bo Wang, Yuan Lin, and Kexin Xu. Glucose measurement by surface plasmon resonance with borate polymer binding. In *Proc. of SPIE Vol*, volume 8591, pages 85910P–1, 2013.

[59] RC Jorgenson and SS Yee. A fiber-optic chemical sensor based on surface plasmon resonance. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 12(3):213–220, 1993.

[60] M Manuel, B Vidal, Raul López, Salvador Alegret, Julian Alonso-Chamarro, Ignacio Garces, and Javier Mateo. Determination of probable alcohol yield in musts by means of an spr optical sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 11(1):455–459, 1993.

[61] Jakub Dostalek, J Čtyrokỳ, Jirı Homola, Eduard Brynda, M Skalskỳ, P Nekvindova, J Špirková, J Škvor, and J Schröfel. Surface plasmon resonance biosensor based on integrated optical waveguide. *Sensors and actuators B: Chemical*, 76(1):8–12, 2001.

[62] C Mouvet, RD Harris, C Maciag, BJ Luff, JS Wilkinson, J Piehler, A Brecht, G Gauglitz, R Abuknesha, and G Ismail. Determination of simazine in water samples by waveguide surface plasmon resonance. *Analytica Chimica Acta*, 338(1-2):109–117, 1997.

[63] F Prieto, B Sepulveda, A Calle, A Llobera, C Domınguez, and LM Lechuga. Integrated mach–zehnder interferometer based on arrow structures for biosensor applications. *Sensors and actuators B: Chemical*, 92(1):151–158, 2003.

[64] EF Schipper, AM Brugman, C Dominguez, LM Lechuga, RPH Kooyman, and J Greve. The realization of an integrated mach-zehnder waveguide immunosensor in silicon technology. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 40(2):147–153, 1997.

[65] Albrecht Brandenburg and R Henninger. Integrated optical young interferometer. *Applied optics*, 33(25):5941–5947, 1994.

[66] Albrecht Brandenburg. Differential refractometry by an integrated-optical young interferometer. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 39(1):266–271, 1997.

[67] Bernard H Schneider, John G Edwards, and Nile F Hartman. Hartman interferometer: versatile integrated optic sensor for label-free, real-time quantification of nucleic acids, proteins, and pathogens. *Clinical chemistry*, 43(9):1757–1763, 1997.

[68] Victor S-Y Lin, Kianoush Motesharei, Keiki-Pua S Dancil, Michael J Sailor, and M Reza Ghadiri. A porous silicon-based optical interferometric biosensor. *Science*, 278(5339):840–843, 1997.

[69] Manoj M Varma, Halina D Inerowicz, Fred E Regnier, and David D Nolte. High-speed label-free detection by spinning-disk micro-interferometry. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(11):1371–1376, 2004.

[70] Ming Zhao, David Nolte, Wonryeon Cho, Fred Regnier, Manoj Varma, Greg Lawrence, and John Pasqua. High-speed interferometric detection of label-free immunoassays on the biological compact disc. *Clinical chemistry*, 52(11):2135–2140, 2006.

[71] Eva Engvall and Peter Perlmann. Enzyme-linked immunosorbent assay, elisa. *The Journal of Immunology*, 109(1):129–135, 1972.

[72] Bertrand Friguet, Alain F Chaffotte, Lisa Djavadi-Ohaniance, and Michel E Goldberg. Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of immunological methods*, 77(2):305–319, 1985.

[73] Brian R Eggins. *Chemical sensors and biosensors*, volume 28. John Wiley & Sons, 2008.

[74] Aaron M Streets and Yanyi Huang. Chip in a lab: Microfluidics for next generation life science research. *Biomicrofluidics*, 7(1):011302, 2013.

[75] George M Whitesides. The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442(7101):368–373, 2006.

[76] Andres W Martinez, Scott T Phillips, George M Whitesides, and Emanuel Carrilho. Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. *Analytical chemistry*, 82(1):3–10, 2009.

[77] Yves Moser and Martin AM Gijs. Miniaturized flexible temperature sensor. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 16(6):1349–1354, 2007.

[78] Xing-Jiu Huang, Leigh Aldous, Aoife M O'Mahony, F Javier del Campo, and Richard G Compton. Toward membrane-free amperometric gas sensors: a microelectrode array approach. *Analytical chemistry*, 82(12):5238–5245, 2010.

[79] Stephen M Radke and Evangelyn C Alocilja. A high density microelectrode array biosensor for detection of e. coli o157: H7. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(8):1662–1667, 2005.

[80] Madhukar Varshney and Yanbin Li. Interdigitated array microelectrodes based impedance biosensors for detection of bacterial cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(10):2951–2960, 2009.

[81] Kelly M Millan, Angela Saraullo, and Susan R Mikkelsen. Voltammetric dna biosensor for cystic fibrosis based on a modified carbon paste electrode. *Analytical chemistry*, 66(18):2943–2948, 1994.

[82] Rajendra N Goyal, Vinod K Gupta, and Sanghamitra Chatterjee. Voltammetric biosensors for the determination of paracetamol at carbon nanotube modified pyrolytic graphite electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 149(1):252–258, 2010.

[83] Amay J Bandodkar, Wenzhao Jia, Ceren Yardımcı, Xuan Wang, Julian Ramirez, and Joseph Wang. Tattoo-based noninvasive glucose monitoring: a proof-of-concept study. *Analytical chemistry*, 87(1):394–398, 2014.

[84] Mónica Hernández, Carlos A Galán, Giaan A Álvarez, and ME Páez. Desarrollo de un biosensor amperométrico en configuración plana para la cuantificación de colesterol. *Información tecnológica*, 22(6):25–32, 2011.

[85] Fatma Arslan, Selvin Ustabaş, and Halit Arslan. An amperometric biosensor for glucose determination prepared from glucose oxidase immobilized in polyaniline-polyvinylsulfonate film. *Sensors*, 11(8):8152–8163, 2011.

[86] Amandeep Kaur and Neelam Verma. Electrochemical biosensor for monitoring insulin in normal individuals and diabetic mellitus patients. *European Journal of Experimental Biology*, 2(2):389–395, 2012.

[87] Madhukar Varshney, Yanbin Li, Balaji Srinivasan, and Steve Tung. A label-free, microfluidics and interdigitated array microelectrode-based impedance biosensor in combination with nanoparticles immunoseparation for detection of escherichia coli o157: H7 in food samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 128(1):99–107, 2007.

[88] Joseph Wang and Xueji Zhang. Needle-type dual microsensor for the simultaneous monitoring of glucose and insulin. *Analytical Chemistry*, 73(4):844–847, 2001.

[89] Stephen D Senturia. *Microsystem design*. Springer Science & Business Media, 2007.

[90] Geoffrey Kotzar, Mark Freas, Phillip Abel, Aaron Fleischman, Shuvo Roy, Christian Zorman, James M Moran, and Jeff Melzak. Evaluation of mems materials of construction for implantable medical devices. *Biomaterials*, 23(13):2737–2750, 2002.

[91] Alejandro Kayum. *Fabricación de microsistemas y máscaras de alta resolución con tecnología láser*. UNAM, México, 2012.

[92] Marc J Madou. *Fundamentals of microfabrication: the science of miniaturization*. CRC press, 2002.

[93] Rabih Zaouk, Benjamin Y Park, and Marc J Madou. Introduction to microfabrication techniques. *Microfluidic Techniques: Reviews and Protocols*, pages 5–15, 2006.

[94] MEMS and Nanotechnology Exchange. Mems and nanotechnology clearinghouse. http://www.memsnet.org/about/processes/deposition.html, 2017. [Consultado Mayo-2017].

[95] Babak Ziaie, Antonio Baldi, Ming Lei, Yuandong Gu, and Ronald A Siegel. Hard and soft micromachining for biomems: review of techniques and examples of applications in microfluidics and drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 56(2):145–172, 2004.

[96] David J Guckenberger, Theodorus E de Groot, Alwin MD Wan, David J Beebe, and Edmond WK Young. Micromilling: a method for ultra-rapid prototyping of plastic microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 15(11):2364–2378, 2015.

[97] Kazuyoshi Itoga, Jun Kobayashi, Yukiko Tsuda, Masayuki Yamato, and Teruo Okano. Second-generation maskless photolithography device for surface micropatterning and microfluidic channel fabrication. *Analytical chemistry*, 80(4):1323–1327, 2008.

[98] Dong Qin, Younan Xia, and George M Whitesides. Soft lithography for micro-and nanoscale patterning. *Nature protocols*, 5(3):491–502, 2010.

[99] S Osswald, K Behler, and Y Gogotsi. Laser-induced light emission from carbon nanoparticles. *Journal of Applied Physics*, 104(7):074308, 2008.

[100] Dow Corning Corporation. *SYLGARDÂ® 184 SILICONE ELASTOMER KIT*. 2000 - 2014.

[101] Himanshu Sharma, Michelle A Digman, Natasha Felsinger, Enrico Gratton, and Michelle Khine. Enhanced emission of fluorophores on shrink-induced wrinkled composite structures. *Optical materials express*, 4(4):753–763, 2014.

[102] M Hautefeuille, L Cabriales, R Pimentel-Domínguez, V Velázquez, J Hernández-Cordero, L Oropeza-Ramos, M Rivera, MP Carreón-Castro, M Grether, and E López-Moreno. New perspectives for direct pdms microfabrication using a cd-dvd laser. *Lab on a Chip*, 13(24):4848–4854, 2013.

[103] Florent Haiss, Sergejus Butovas, and Cornelius Schwarz. A miniaturized chronic microelectrode drive for awake behaving head restrained mice and rats. *Journal of neuroscience methods*, 187(1):67–72, 2010.

[104] Jessica E Koehne, Hua Chen, Alan M Cassell, Qi Ye, Jie Han, Meyya Meyyappan, and Jun Li. Miniaturized multiplex label-free electronic chip for rapid nucleic acid analysis based on carbon nanotube nanoelectrode arrays. *Clinical chemistry*, 50(10):1886–1893, 2004.

[105] Gang Chen, Luyan Zhang, and Joseph Wang. Miniaturized capillary electrophoresis system with a carbon nanotube microelectrode for rapid separation and detection of thiols. *Talanta*, 64(4):1018–1023, 2004.

[106] CJ Hayden and C Dalton. Direct patterning of microelectrode arrays using femtosecond laser micromachining. *Applied Surface Science*, 256(12):3761–3766, 2010.

[107] Bongchul Kang, Seunghwan Ko, Jongsu Kim, and Minyang Yang. Microelectrode fabrication by laser direct curing of tiny nanoparticle self-generated from organometallic ink. *Optics express*, 19(3):2573–2579, 2011.

[108] SH Lee, DJ Lee, CK Lee, YH Lee, Steven T Wereley, and JH Oh. Direct fabrication of microelectrodes on a polymer substrate using selective ultrashort pulsed laser ablation of inkjet-printed ag lines. *physica status solidi (a)*, 209(11):2142–2146, 2012.

[109] Limu Wang, Rimantas Kodzius, Xin Yi, Shunbo Li, Yu Sanna Hui, and Weijia Wen. Prototyping chips in minutes: Direct laser plotting (dlp) of functional microfluidic structures. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 168:214–222, 2012.

[110] Rangadhar Pradhan, Analava Mitra, and Soumen Das. Quantitative evaluation of blood glucose concentration using impedance sensing devices. *Journal of Electrical Bioimpedance*, 4(1):73–77, 2013.

[111] Mathieu Hautefeuille, Alejandro K Jimenez-Zenteno, Pablo Roberto Pérez-Alcázar, Kristopher M Hess-Frieling, Gerardo Fernandez-Sanchez, Victor Velazquez, Marcela Grether-Gonzalez, and Enrique Lopez-Moreno. Utilization of a digital-versatile-disc pickup head for benchtop laser microfabrication. *Applied optics*, 51(8):1171–1177, 2012.

[112] George Mann. *Print: A Manual for Librarians and Students Describing in Detail the History, Methods, and Applications of Printing and Paper Making*. Grafton, 1952.

[113] Sayed IM Zayed and Hassan AM Arida. Preparation of carbon paste electrodes and its using in voltammetric determination of amiloride hydrochloride using in the treatment of high blood pressure. *Int. J. Electrochem. Sci*, 8:1340–1348, 2013.

[114] CHEMTRONICS. *https:www.chemtronics.com*. 2014.

[115] J Ross Macdonald. Impedance spectroscopy. *Annals of biomedical engineering*, 20(3):289–305, 1992.

[116] Agilent Technologies. Agilent e4980a precision lcr meter user's guide. http://www.keysight.com, 2017. [Consultado Mayo-2017].

[117] Kathryn E Toghill and Richard G Compton. Electrochemical non-enzymatic glucose sensors: a perspective and an evaluation. *Int. J. Electrochem. Sci*, 5(9):1246–1301, 2010.

[118] Qi Li, Nan Li, Paul Le Tissier, David R Grattan, and Kagan Kerman. Miniaturized electrochemical immunosensor for label-free detection of growth hormone. *Electroanalysis*, 24(6):1272–1276, 2012.

[119] Anne Guillou, Nicola Romano, Frederik Steyn, Karine Abitbol, Paul Le Tissier, Xavier Bonnefont, Chen Chen, Patrice Mollard, and Agnès O Martin. Assessment of lactotroph axis functionality in mice: Longitudinal monitoring of prl secretion by ultrasensitive-elisa. *Endocrinology*, 156(5):1924–1930, 2015.

[120] Bo Wei, Fang Li, Huicui Yang, Lei Yu, Kaihong Zhao, Rui Zhou, and Yonggang Hu. Magnetic beads-based enzymatic spectrofluorometric assay for rapid and sensitive detection of antibody against apxiva of actinobacillus pleuropneumoniae. *Biosensors and Bioelectronics*, 35(1):390–393, 2012.

[121] Il-Hoon Cho and Joseph Irudayaraj. In-situ immuno-gold nanoparticle network elisa biosensors for pathogen detection. *International journal of food microbiology*, 164(1):70–75, 2013.

[122] B Fabre, V Mesh, A Oneto, G Macalini, H Grosman, C Aranda, and G Berg. La saliva y su utilidad en la evaluación de la función endocrinológica. *Rev. SAEGRE*, 16, 2009.

[123] Aswathy Ravindran, Preethy Chandran, and S Sudheer Khan. Biofunctionalized silver nanoparticles: advances and prospects. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 105:342–352, 2013.

[124] Xiaoqiu Huang, DW Greve, DD Nguyen, and MM Domach. Impedance based biosensor array for monitoring mammalian cell behavior. In *Sensors, 2003. Proceedings of IEEE*, volume 1, pages 304–309. IEEE, 2003.

[125] Katy Phelan and Kristin M May. Basic techniques in mammalian cell tissue culture. *Current protocols in cell biology*, pages 1–1, 2007.