



Universitat Autònoma de Barcelona

**Integración de microsensores y
estructuras microfluídicas para la medida
de parámetros químicos en sistemas
biológicos**

Isabel Burdallo Bautista

Tesis Doctoral

Programa de doctorado en Ciencia de Materiales

Dirigida por Cecilia Jiménez Jorquera y Antoni Baldi Coll

Tutor: Julián Alonso Chamarro

Departamento de Química

Facultad de Ciencias

2014

Memoria presentada para aspirar al Grado de Doctor por Isabel Burdallo Bautista

Isabel Burdallo Bautista

La doctora Cecilia Jiménez Jorquera, Investigadora Científica y el Doctor Antonio Baldi Coll, Científico Titular, ambos con destino en el Instituto de Microelectrónica de Barcelona, IMB-CNM del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICAN QUE:

Los trabajos incluidos en la presente memoria titulada: *Integración de microsensores y estructuras microfluídicas para la medida de parámetros químicos en sistemas biológicos*, han sido realizados bajo su dirección por Isabel Burdallo Bautista, licenciada en Ciencias Químicas, en las instalaciones del Instituto de Microelectrónica de Barcelona. Para que conste y tenga los efectos pertinentes en el departamento de Química de la Universidad Autónoma de Barcelona, firman la presente certificación el 10 de Julio de 2014.

Vist i plau

Dra. Cecilia Jiménez Jorquera

Dr. Antoni Baldi Coll

Dr. Julián Alonso Chamarro



Bellaterra Septiembre 2014

“Solo triunfaremos si no nos olvidamos de aprender”

Rosa Luxemburg

A mi familia

ÍNDICE

ÍNDICE	7
AGRADECIMIENTOS	9
LISTA DE ABREVIATURAS	15
LISTA DE PUBLICACIONES	17
1 INTRODUCCIÓN	19
1.1 SENSORES QUÍMICOS DE ESTADO SÓLIDO	24
1.2 SENSORES BASADOS EN TRANSISTORES DE EFECTO DE CAMPO (ISFETs) 24	
1.2.1 SENSORES AMPEROMÉTRICOS	28
1.2.2 ELECTRODOS INTERDIGITADOS	34
1.2.3 ELECTRODOS DE REFERENCIA	36
1.3 TECNOLOGÍA DE FABRICACIÓN DE ESTRUCTURAS MICROFLUÍDICAS	38
1.3.1 PROCESOS DE PEGADO	40
1.3.2 TECNOLOGÍA DE INTEGRACIÓN DE SENSORES Y MICROFLUÍDICA.	43
1.3.3 ENCAPSULADO DE SENSORES QUÍMICOS	44
1.4 LOCs: MONITORIZACIÓN DE PARÁMETROS QUÍMICOS EN SISTEMAS BIOLÓGICOS	47
2 OBJETIVOS	51
3 DESARROLLO DE SENSORES PARA LA MONITORIZACIÓN DE PARÁMETROS QUÍMICOS EN SISTEMAS BIOLÓGICOS	53
3.1 REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN	55
3.2 SENSORES	59
3.2.1 ISFETs	59
3.2.2 SENSORES AMPEROMÉTRICOS	61
3.2.3 ELECTRODOS INTERDIGITADOS	66
3.2.4 ELECTRODOS DE PSEUDO-REFERENCIA	66
3.3 METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN	73
3.3.1 EVALUACIÓN EN MEDIOS ACUOSOS	73
3.3.2 EVALUACIÓN EN MEDIOS DE CULTIVO	81
3.4 RESULTADOS	82
3.4.1 MEDIDAS EN MEDIO ACUOSO	82
3.4.2 MEDIDAS EN MEDIOS DE CULTIVO	96
3.5 CONCLUSIONES	100

4	TECNOLOGÍA DE INTEGRACIÓN DE ICs Y MICROFLUÍDICA	101
4.1	REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN	102
4.2	TECNOLOGÍA DE INTEGRACIÓN DE SENSORES Y MICROFLUÍDICA	104
4.3	METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN	108
4.4	RESULTADOS	110
4.5	CONCLUSIONES	117
5	APLICACIONES DE LA TECNOLOGÍA DE INTEGRACIÓN DE SENSORES Y MICROFLUÍDICA	119
5.1	REACTIVOS E INSTRUMENTAL	120
5.2	DISPOSITIVO INALÁMBRICO PARA EL ANÁLISIS DE pH	121
5.2.1	METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN	125
5.2.2	RESULTADOS	126
5.3	DISPOSITIVO DE AUTODIAGNÓSTICO PARA EL CONTROL DE LITIASIS RENAL	129
5.3.1	METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN	131
5.3.2	RESULTADOS	132
5.4	SISTEMA DE MONITORIZACIÓN AUTOMÁTICA DE CULTIVOS CELULARES	135
5.4.1	RESULTADOS	144
6	CONCLUSIONES	149
7	REFERENCIAS	151

AGRADECIMIENTOS

La investigación realizada en esta Tesis Doctoral y recogida en la presente memoria ha sido posible gracias a la siguiente financiación:

Ayuda **Predocctoral de Formación de Personal Investigador** de referencia BES-2008-005512 asociada al proyecto de investigación TEC2007-68012-C03-01, en el Organismo Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Ayuda para **Estancias Breves en 2010** en el New Jersey Institute of Technology (EEUU), asociada a la Ayuda Predocctoral de Formación de Personal Investigador de referencia BES-2008-00512.

Proyecto: **Microsistemas monolíticos tipo RFID para el sensado autónomo de parámetros químicos y biológicos** (RICH), TEC2010-19467, Ministerio de Ciencia e Innovación.

Proyecto: **Desarrollo de microsistemas avanzados de análisis mediante integración de micro/nano sensores y detectores ópticos**. (Desarrollo de microsistemas analíticos integrados) (MICANOPT). TEC2007-68012-C03-01, Ministerio de Ciencia e Innovación.

Proyecto: **Desarrollo de sustratos electroactivos para el crecimiento y la supervivencia neuronal**. (Desarrollo de microsensores electroquímicos para medida de células nerviosas) NEUROMAT (PIF2006-50F0104). Ministerio de Educación y Ciencia.

Proyecto: **Redes de sensores y microsistemas para el control del impacto de la producción agrícola y la minería en los acuíferos** (REDSSENS), del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, CYTED 510AC0408.

También querría mostrar mi agradecimiento por la ayuda prestada durante el desarrollo de esta tesis al **Laboratorio de Reparación Neural del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo**, por la acogida y apoyo durante el estudio con cultivos neuronales; al **Grupo de Investigación de Nanobiosensores y Nanobiofísica Molecular** del Institut Calatà de Nanociència i Nanotecnologia CIN2-, CSIC, por el apoyo técnico durante las medidas de ángulo de contacto; al **Laboratorio de Litiasis Renal de la Universidad de las Islas Baleares** y al equipo de la **empresa Devicare S.L.**, por la colaboración en el desarrollo del primer prototipo del dispositivo de autodiagnóstico de control de litiasis; al personal del **Laboratori d'ambient controlat** de la UAB, por el soporte técnico durante el desarrollo de la tecnología de integración; a todo el personal del **Instituto de Microelectrónica de Barcelona (IMB-CNM)** y en especial al equipo del **Grupo de**

Transductores Químicos (GTQ) que han ayudado al desarrollo de esta tesis durante sus diferentes fases. Mi especial agradecimiento a la Doctora Raquel Pérez Castillejos, Investigadora principal del **Tissue Models Lab (TML)** del New Jersey Institute of Technology (NJIT), USA, y a todo su equipo, por la inestimable acogida científica y personal durante los 4 meses que estuve de estancia allí. La experiencia allí adquirida es la semilla de la tecnología de integración de sensores y microfluidica desarrolla.

Y como no, mi agradecimiento a mis directores de tesis, **Cecilia Jiménez y Toni Baldi**.

ABSTRACT

The objective of this thesis is to solve some of the scientific-technical problems related to the integration of solid state sensors in lab on a chip systems (LOCs). To achieve this, the development of a technology that allows the integration of chips fabricated with microelectronics and microfluidic structures on polymer substrates is presented.

This manuscript is divided into 6 chapters. In Chapter 1 a general introduction to the main elements involved in the development of this technology is presented. These elements are microelectronic sensors, microfluidic structures and existing integration technologies. An analysis of the state of the art of the main applications of LOC systems in the literature has led us to address the application of the devices fabricated within this thesis to measure chemical parameters for biological applications. In Chapter 2 the objectives and motivations followed in this thesis are defined.

The production and characterization of a number of microsensors for use in cell culture and measurement of biological fluids is presented in Chapter 3. These microsensors are ion selective field effect transistors (ISFET), amperometric sensors and impedimetric interdigitated electrodes (IDE) and are applied to monitor pH, potassium ion, dissolved oxygen, glucose and conductivity of the extracellular medium, respectively.

In Chapter 4 the development of a technology that allows the integration of these sensors into commercial platforms, such as PCB (printed circuit board) with simple microfluidic structures made of PDMS is exposed. In Chapter 5, the flexibility of the technology developed is presented by the manufacture of three devices of LOC systems, for use in the measurement of the extracellular pH in cell cultures and controlling the pH of the urine in gallstone disease.

Future work involves optimizing integration technology developed and further progress towards making LOC systems viable for application in areas of industrial interest is summarized in Chapter 6.

RESUMEN

El objetivo de esta tesis es resolver algunos aspectos científicos-técnicos de los LOC relacionados con la integración de sensores de estado sólido. Para conseguirlo se presenta el desarrollo de una tecnología que permite la integración de chips fabricados con tecnología microelectrónica y estructuras microfluídicas en sustratos poliméricos.

Este manuscrito se divide en 6 capítulos. En el Capítulo 1 se realiza una introducción general de los principales elementos involucrados en el desarrollo de esta tecnología de integración, que son los sensores fabricados con tecnología microelectrónica, las estructuras microfluídicas, y las tecnologías de integración existentes. Un análisis del estado del arte de las principales aplicaciones de los sistemas LOC en la literatura, nos ha llevado a dirigir la aplicación de los dispositivos fabricados hacia la medida de parámetros químicos para aplicaciones biológicas. En el Capítulo 2 se definen los objetivos y motivaciones que han llevado al trabajo de investigación de esta tesis.

En el Capítulo 3 se presenta la fabricación y caracterización de una serie de microsensores para su aplicación en cultivos celulares y en la medida de fluidos biológicos. Estos sensores son transistores de efecto de campo sensibles a iones (ISFET), sensores amperométricos y sensores impedimétricos o electrodos interdigitados (IDE), para la medida de pH, ion potasio, oxígeno disuelto, glucosa y conductividad del medio, respectivamente. En el Capítulo 4 se expone el desarrollo de una tecnología que permite la integración de estos sensores en plataformas comerciales tipo PCB (printed circuit board) con sencillas estructuras microfluídicas fabricadas en PDMS. En el Capítulo 5 se demuestra la flexibilidad de la tecnología desarrollada mediante la fabricación de tres dispositivos de sistemas LOC, para su aplicación en la medida del pH extracelular de cultivos celulares y en el control del pH de la orina en la enfermedad de litiasis. En el Capítulo 6 se resume el trabajo futuro a realizar para optimizar la tecnología de integración desarrollada y seguir avanzando hacia la fabricación de sistemas LOC viables para su aplicación en sectores de interés industrial.

LISTA DE ABREVIATURAS

APTMS	3-aminopropyl trimethoxysilane
BSA	Albúmina de serum bovino
CA	Cronoamperometría
CE	Contra electrodo
CMOS	Complementary metal oxide semiconductor
CPG	Cronopotenciometría galvanostática
CV	Voltamperometría cíclica
DABA	Ebecryl 600
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTSP	Ditiobis-N-succinimidil propionato
EI	Espectroscopía de impedancias
FIM	Fixed Interferent method
FTIR-ATR	Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier en reflectancia total atenuada
GOD	Glucosa oxidasa
GTQ	Grupo de Transductores Químicos
IC	Circuito integrado
IDE	Electrodo interdigitado
IMB-CNM	Instituto de microelectrónica de Barcelona-Centro Nacional de Microelectrónica
ISE	Ion selective electrode
ISFET	Ion selective field effect transistor
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
LSV	Linear sweep voltammetry
LOC	Lab on a chip
MTP	Micro titre plate
NHE	Normal hydrogen electrode
NMOS	Negative channel metal-oxide semiconductor
OCA	Ángulo de contacto
PBS	Disolución tampón comercial de Ph
PCB	Printed circuit board
PDMS	Polidimetil siloxano
PFOTS	1H, 1H, 1H, 2H, 2H- Perflurooctyltriethoxysilane
PMMA	Polimetil metacrilato
p-RE	Electrodo de pseudo-referencia
PSA	Pressure sensitive adhesive
PVC	Policloruro de vinilo
RE	Electrodo de referencia
REFET	Reference field effect transistor
RFID	Radio frequency identification
SAM	Self assembled monolayer
SU-8	Resina epoxi
(μ)-TAS	(micro)Total analysis systems
TPM	3-(Trimetoxisilil) propil metacrilato
UV	Ultravioleta
WE	Electrodo de trabajo

LISTA DE PUBLICACIONES

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral se encuentran recogidos en las siguientes publicaciones y patente solicitada:

“Secondary Ag/AgCl Pseudo-Reference Electrode on Silicon Substrate”, Fernando L. Almeida, Marcelo Bariatto Andrades Fontes, Cecilia Jimenez, and Isabel Burdallo, ECS Transactions. 14 (1), 73 (2008)

“Microelectrodes for the measurement of cellular metabolism”, Burdallo I, Jiménez-Jorquera C. Procedia Chemistry. 2009;1(1):289-92.

Integration of microelectronic chips in microfluidic systems on printed circuit board” Burdallo, I, Jimenez-Jorquera, C, Fernandez-Sanchez, C, Baldi, A. J Micromech Microeng, 2012. 22: p. 105022 (7pp).

“A new device for simple and accurate urinary pH testing by the Stone former patient”. Grases, F., Rodriguez, A, Berga, F, Costa-Bauza, A, Prieto, R, Burdallo, I, Cadarso, A, Jimenez-Jorquera, C, Baldi, A, Garganta, R. SpringerPlus, 2014. 3(1): p. 209

P201430180 *“Sensor de iones basado en medida diferencial y método de fabricación”*, Baldi Coll, A.; Dominguez-Horna, C.; Jimenez-Jorquera, C.; Fernandez-Sanchez, C.; Llobera, A.; Merlos, A.; Cadarso, A.; Burdallo, I.; Vera-Gras, F., CSIC, 2014.

1 INTRODUCCIÓN

Desde que Andreas Manz publicase en 1990 su artículo “Microchemical Total Analysis systems” (μ -TAS) [1] ha habido una gran evolución de los sistemas Lab-on-a-chip (LOC) (Figura 1-1). Inicialmente concebidos para mejorar el rendimiento de los sistemas analíticos, integrando y escalando las funciones y procesos de un laboratorio en el reducido espacio de un chip, se han ido transformando en auténticos laboratorios miniaturizados que integran una gran cantidad de componentes y con aplicaciones en una gran diversidad de campos [2, 3]. Un hito clave para la proliferación de este tipo de sistemas tuvo lugar a finales de la década de los 90, con la introducción del prototipaje rápido (*rapid prototyping*) de complejos diseños microfluidicos basados en el moldeo del polímero polidimetil siloxano (PDMS) [4, 5] (Figura 1-2). Este hecho permitió la apertura del campo de los sistemas μ -TAS a científicos no expertos en el campo de la microfluidica, creando sus propios sistemas en respuesta a los requerimientos específicos de su ámbito de experimentación.

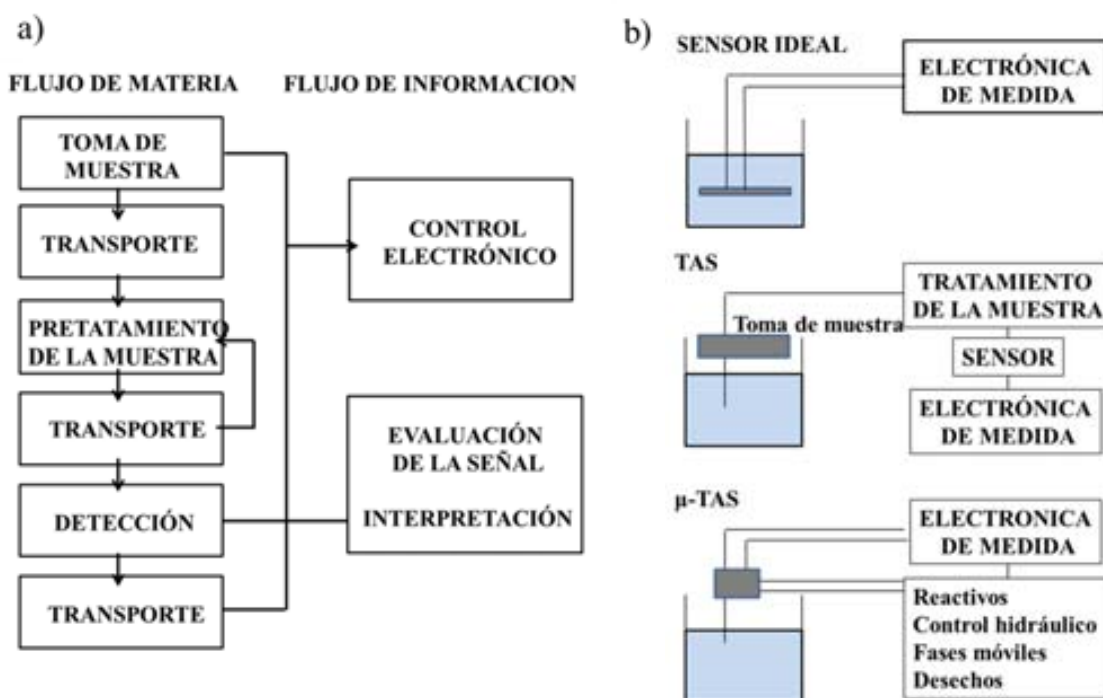


Figura 1-1. a) Diagrama del flujo de materia e información en un análisis químico cuantitativo. b) Diagrama esquemático de un sensor químico ideal, un sistema de análisis químico total (TAS) y un “sistema miniaturizado de análisis químico total” (μ -TAS), según[1].

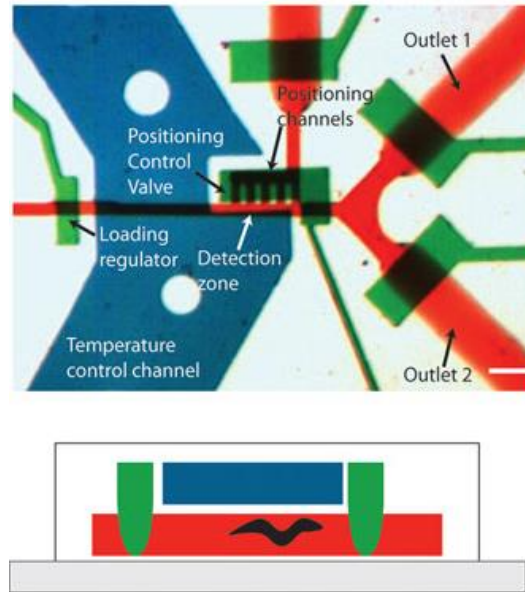


Figura 1-2. Válvulas fabricadas íntegramente en PDMS [6].

Una de las tendencias actuales de los sistemas LOC pasa por los denominados sistemas microfluidicos basados en gotas (*droplet microfluidics* o *emulsion microfluidics*) [7, 8]. En base a la utilización de dos fases fluídicas inmiscibles que fluyen por dos canales separados que cuando se unen forman gotas, se crean y manipulan gotas de emulsiones a una gran velocidad, que actúan como pequeños tubos de ensayo dónde tienen lugar reacciones químicas o actividad biológica de una manera controlada (Figura 1-3 a). La aparición en 2007 de sistemas analíticos microfluidicos basados en papel (*paper based microfluidics*) [9, 10] ha abierto también un nuevo paradigma en los sistemas LOC. Su éxito se basa en la eliminación de sistemas de impulsión adicionales, ya que el fluido se mueve a través de las microfibras del papel mediante fuerzas capilares (Figura 1-3 b). Mediante impresión de tintas de diferentes materiales se forman fácilmente los canales que delimitan los fluidos así como los propios elementos sensores. Enlazando con esta última técnica cabe resaltar la impresión 3D de sistemas microfluidicos, que fabrica estructuras de diversos materiales mediante su deposición, capa a capa [11, 12] (Figura 1-3 c).

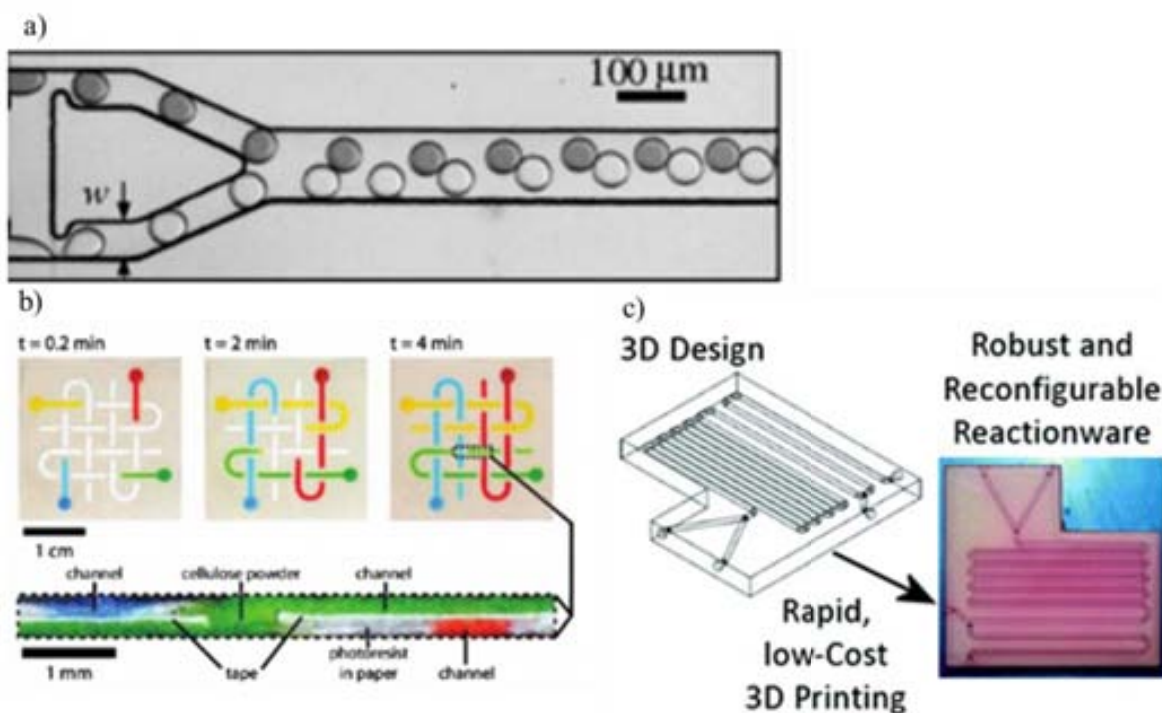


Figura 1-3. Imágenes de sistemas LOC a) Sistema microfluídico en base a la formación de gotas [13]. b) Sistema microfluídico basado en papel [14]. c) Sistema microfluídico fabricado mediante impresión 3D [11].

Esta continua y exponencial evolución del campo de los LOC a nivel académico, con cerca de 10.000 publicaciones científicas en los últimos 10 años relacionadas con la microfluídica, contrasta con el reducido número de productos basados en esta tecnología que llegan a ser comercializados con éxito [15]. Los expertos coinciden en que para que los sistemas LOC den el salto de su estado actual de prototipos académicos al mercado, se ha de desarrollar una tecnología de integración de los subsistemas que lo componen que permita su producción en masa [16-20]. En la Figura 1-4 se muestra la división del proceso de fabricación de sistemas LOC en cuatro fases. En la fase 1 se enmarcan las actividades de diseño; en la fase 2 las correspondientes al desarrollo y fabricación; la fase 3 engloba los procesos posteriores de integración y ensamblaje y en la fase 4 se enmarcan las actividades relativas al control de calidad (QC) [21]. Los costes de fabricación varían en función del volumen de sistemas fabricados. Mientras que para fabricar pocos prototipos, entre 10 y 100, el 80 % de los costes se concentran en la fase 1 y 2, para volúmenes grandes el 80 % de los costes se concentra en la fase 3. Por tanto, la optimización del diseño y la tecnología de fabricación e integración de los sistemas LOC es necesaria para que estos sistemas lleguen a mercado de forma masiva. Esta tecnología ha de ser automatizable y económicamente viable, análoga a la tecnología microelectrónica desarrollada desde la década de los años 50, y que ha posibilitado el éxito en la comercialización de los circuitos integrados (ICs). La estrategia a seguir es desarrollar una tecnología que permita: 1) utilizar sustratos económicos. La tecnología microelectrónica tiene

mucho que aportar a los sistemas LOC dado que permite la obtención de complejos microsistemas analíticos en un espacio reducido, pero es necesario desarrollar una tecnología que permita integrar los chips de silicio en los sustratos de las estructuras microfluídicas [16, 22]; 2) minimizar los pasos de ensamblaje para reducir el coste de la fase de post-procesos [19] y 3) introducir todos los componentes necesarios en una misma plataforma con un diseño robusto y lo más universal posible [23]. El diseño de los sistemas ha de ser lo más sencillo posible, tanto para el usuario final, potencialmente inexperto en el uso de la tecnología del dispositivo, como para simplificar los procesos de integración [23, 24]. La introducción de las técnicas de prototipaje rápido a nivel de laboratorio en el campo de la microfluídica, como el replicado en PDMS, ha permitido fabricar complejos sistemas a la carta que no siempre han sido las aproximaciones más funcionales y sencillas.

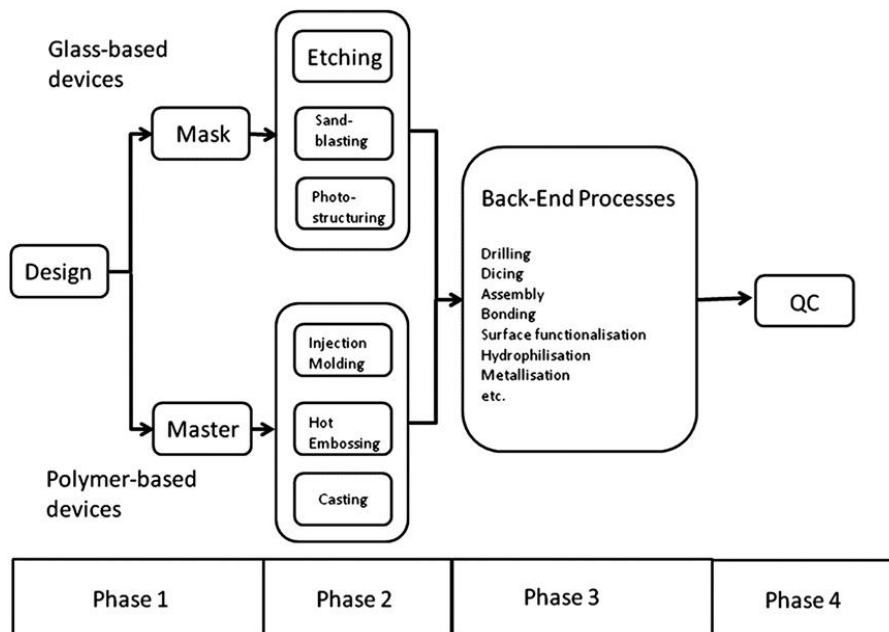


Figura 1-4. Proceso de fabricación de sistemas LOC, según [21], mostrando las cuatro fases de la cadena. Fase 1: diseño; Fase 2: fabricación; Fase 3: procesos posteriores de integración y ensamblaje; Fase 4: Control de calidad (QC).

Es objeto de esta tesis resolver algunos aspectos científico-técnicos de los LOC relativos a la integración de sensores de estado sólido. Es por ello que en este trabajo se presenta el desarrollo de una tecnología que permite la integración de chips fabricados con tecnología microelectrónica y estructuras microfluídicas en sustratos poliméricos. En este Capítulo se expone un compendio de los principales elementos involucrados en el desarrollo de esta tecnología de integración: sensores fabricados con tecnología microelectrónica y estructuras microfluídicas, así como las tecnologías de fabricación e integración existentes. Un análisis del estado del arte de las principales aplicaciones de los sistemas LOC en la literatura, nos ha llevado a dirigir la aplicación de los dispositivos fabricados en el marco de esta tesis hacia la medida de parámetros biológicos. En el

Capítulo 2 se indican los objetivos y motivación que han llevado al trabajo de investigación de esta tesis. Así, en el Capítulo 3 se presenta la fabricación y caracterización de una serie de microsensores para su aplicación en cultivos celulares y en la medida de fluidos biológicos. Estos sensores son transistores de efecto de campo sensibles a iones (ISFET), sensores amperométricos y sensores impedimétricos o electrodos interdigitados (IDE), para la medida de pH, ion potasio, oxígeno disuelto, glucosa y conductividad del medio, respectivamente. En el Capítulo 4 se expone el desarrollo de una tecnología que permite la integración de estos sensores en plataformas comerciales tipo PCB (*printed circuit board*), con sencillas estructuras microfluídicas fabricadas en PDMS. En el Capítulo 5 se demuestra la flexibilidad de la tecnología desarrollada mediante la fabricación de tres dispositivos de sistemas LOC, para su aplicación en la medida del pH extracelular de cultivos celulares y en el control del pH de la orina en la enfermedad de litiasis. En el Capítulo 6 se resume el trabajo futuro a realizar para optimizar la tecnología de integración desarrollada y seguir avanzando hacia la fabricación de sistemas LOC viables para su aplicación en sectores de interés industrial.

1.1 SENSORES QUÍMICOS DE ESTADO SÓLIDO

Un sensor químico es un dispositivo que responde de una manera selectiva y reversible a los cambios de actividad de una especie química determinada, generando una señal eléctrica susceptible de ser amplificada y procesada, proporcional a la concentración o actividad de dicha especie. Consta esencialmente de tres componentes: un elemento receptor de especies químicas, un transductor y un circuito para el tratamiento de la señal [25]. La principal ventaja de los sensores químicos con respecto a otras técnicas analíticas consiste en que pueden utilizarse en medidas directas sin la necesidad de hacer tratamientos previos de la muestra.

En este trabajo se explicará someramente el funcionamiento de los ISFETs (*Ion Selective Field Effect Transistors*), de los sensores amperométricos e impedimétricos, principales sensores electroquímicos utilizados en las aplicaciones biológicas, objeto de esta tesis.

1.1.1 SENSORES BASADOS EN TRANSISTORES DE EFECTO DE CAMPO (ISFETs)

El ISFET es un dispositivo sensible a la concentración de iones, básicamente protones, en solución que consiste en dos electrodos (fuente y drenador), una puerta formada por un dieléctrico sensible a protones y un electrodo de referencia que cierra el circuito. Su funcionamiento se basa en la formación de un campo eléctrico entre fuente y drenador al aplicar un potencial perpendicular en los electrodos de puerta. A este efecto se le denomina efecto de campo [26].

En la Figura 1-5 se muestra el esquema de la estructura de un ISFET así como el circuito potenciométrico necesario para llevar a cabo la medida.

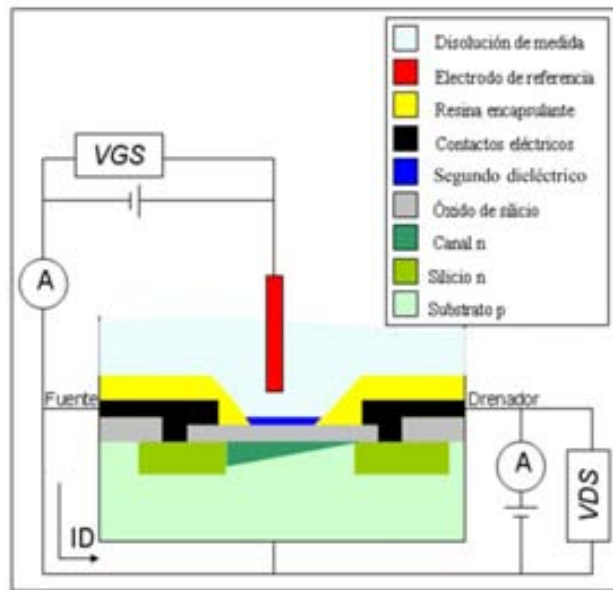


Figura 1-5. Estructura de un ISFET y del circuito potenciométrico.

La conductividad del canal de electrones entre la fuente y el drenador es modulada mediante la diferencia de potencial entre la puerta y la fuente (V_{GS}). En este caso se genera una corriente de drenador, I_D , que describe el efecto de campo y que viene descrita por la Ecuación 1-1

$$I_D = \mu C_{OX} \frac{W}{L} [(V_{GS} - V_{th}) \times V_{DS}] - \frac{1}{2} V_{DS}^2$$

Ecuación 1-1

para $V_{GS} - V_{th} \geq V_{DS}$; μ es la movilidad de los electrones en el canal, C_{OX} es la capacidad del óxido por unidad de área, W/L es la relación amplitud/longitud del canal, V_{DS} es el potencial de drenador-fuente y V_{th} es el voltaje umbral (tensión mínima necesaria para generar el canal de electrones entre la fuente y el drenador del dispositivo).

El potencial de puerta, V_{GS} , está relacionado con el potencial que se crea en la interfaz dieléctrico/solución cuando el ISFET está sumergido en una solución. Este potencial superficial, Ψ_0 , es el que relaciona la respuesta del sensor con la variación de pH, según la Ecuación 1-2.

$$\Psi_0 = 2.303 \frac{KT}{q} \frac{\beta}{\beta + 1} (pH_{pzc} - pH)$$

Ecuación 1-2

donde k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, q la carga del electrón, pH_{pzc} es el pH en el punto donde la densidad de carga neta debida a los centros activos de la superficie es cero y β es una constante que depende de la capacidad de reacción de los centros activos de la puerta y que por tanto depende del tipo de material del dieléctrico de puerta (SiO_2 , Si_3N_4 , Al_2O_3 , etc.).

De esta expresión se observa que la respuesta de un ISFET es similar a la de un sensor potenciométrico (ISE, Ion Selective Electrode), de pendiente Nernstiana.

ISFETs SELECTIVOS A IONES

Para el desarrollo de ISFETs selectivos a iones o moléculas se requiere la modificación de la puerta con materiales orgánicos o inorgánicos. En un principio se utilizaron las membranas de policloruro de vinilo (PVC) que ya se usaban en los ISEs, pero la pobre adherencia de éstas a la puerta del ISFET hizo plantearse la investigación de otro tipo de material como matriz polimérica. Los polímeros fotocurables fueron los materiales alternativos más aceptados. Por este motivo, actualmente la matriz polimérica que se utiliza en la fabricación de este tipo de membranas en el Grupo de Transductores Químicos (GTQ) del IMB-CNM (CSIC) es una mezcla que tiene como componente principal un polímero fotocurable de la familia de los diacrilatos uretanos. Aparte de resolver el inconveniente de la pobre adhesión de las membranas de PVC presentan una ventaja suplementaria ya que permiten emplear tecnología compatible con la tecnología fotolitográfica asociada a la fabricación de los ISFETs.

Los componentes principales de estas membranas son: un polímero, un plastificante, un ionóforo y aditivos como las sales lipofílicas. La función del polímero es la de proporcionar las propiedades mecánicas necesarias a la membrana; el plastificante modula la permeabilidad de la fase orgánica y ajusta la movilidad de los centros de coordinación de la membrana según su viscosidad; el ionóforo es el elemento fundamental de la membrana ya que es el que determina la selectividad al ion analizado; las sales lipofílicas disminuyen la resistividad de las membranas y afectan a la sensibilidad y el fotoiniciador inicia la polimerización de la membrana cuando esta es irradiada con luz ultravioleta [27]. Las membranas selectivas a iones forman una interfaz no polarizada con la solución. El modo de trabajo utilizado con estos sensores consiste en medir el potencial que se genera a través de la interfaz entre la membrana y el electrolito debido al equilibrio que se establece entre la especie a detectar en la superficie de la membrana. Este potencial varía según la ecuación de Nernst (Ecuación 1-3), en analogía a los ISEs:

$$E = E^0 + \frac{RT}{z_i F} \ln a_i$$

Ecuación 1-3

donde E es el potencial de membrana medido, E^0 el potencial estándar, R la constante universal de los gases (8.314 J/K mol), T la temperatura (K), z_i la carga del ion, F la constante de Faraday (96500 C/mol de electrones) y a_i la actividad del ion en solución.

La respuesta de una membrana no es específica sino selectiva, por lo que es necesario definir un término adicional, denominado coeficiente de selectividad potenciométrico (K_{ij}^{pot}), característico para cada ion interferente y que se define como el factor que permite cuantificar la contribución de un ion interferente a la respuesta del ion principal y evaluar cómo puede afectar a su sensibilidad [28].

REFETs

La miniaturización de un electrodo de referencia para ser utilizado en la medida con ISFETs ha sido uno de los grandes retos de todos los grupos de investigación que fabrican estos sensores. Una alternativa es utilizar un REFET (Reference FET) junto con un ISFET y hacer la medida diferencial de ambos, como se muestra en la Figura 1-6. La medida diferencial consiste en medir los cambios de tensión umbral de ambos dispositivos utilizando como terminal de puerta un electrodo metálico inmerso en la solución y obtener así la respuesta como resta de los dos valores obtenidos [29]. El REFET está constituido por un ISFET insensible al analito a medir. La estrategia más ampliamente utilizada para fabricar REFETs consiste en modificar la puerta de un ISFET, mediante la deposición de una membrana insensible a los iones a determinar (pH, K^+ , NO_3^- ...) o una funcionalización que bloquee los grupos de intercambio iónico de la superficie del dieléctrico. Así, para aplicaciones de medida de pH, se reporta en la literatura el uso de membranas de poliuretano [30]; parileno [31]; PVC [32, 33]; monocapas de silano (SAM, *self assembled monolayer*) [34], poliacrilato [35], entre otras. Sin embargo, estas membranas no son del todo insensibles al pH y en algunos casos degradan la respuesta del ISFET debido a una elevada resistencia y un tiempo de respuesta más largo. Una estrategia que propuso Janata en 1978 [29] consiste en la formación de un microdepósito con un gel o solución sobre la puerta del ISFET y el cierre de este depósito mediante una tapa de epoxi. Un capilar de vidrio permite el contacto entre la solución interna y externa. Posteriormente se describieron sistemas ISFET/REFET basados en la integración con un sistema de flujo que permite la renovación del líquido de referencia sobre la puerta del REFET [36]. A pesar de la existencia de estas estrategias, en la actualidad los ISFETs que se venden llevan como electrodo de referencia un electrodo de Ag/AgCl miniaturizado, lo cual indica que no se ha conseguido desarrollar un REFET funcional o económicamente viable.

En este trabajo uno de los mayores éxitos conseguidos es llevar a la práctica un REFET funcional, utilizando sencillas estructuras microfluídicas sobre chips de silicio. Este trabajo ha dado lugar a una patente y a un producto en fase de comercialización [37, 38].

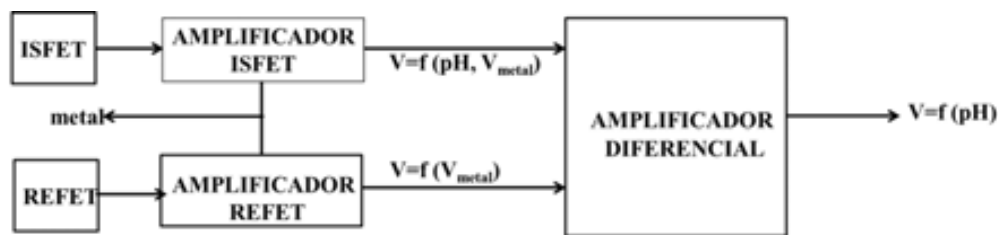
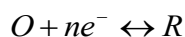


Figura 1-6. Representación esquemática del par ISFET/REFET diferencial con un electrodo metálico [39].

1.1.2 SENSORES AMPEROMÉTRICOS

Los sensores amperométricos suelen ser electrodos de materiales conductores relativamente inertes, como el oro, metal utilizado en esta tesis. El electrodo, en contacto con una solución de electrolito electroactivo, mide la intensidad de corriente que fluye en una celda electroquímica, manteniéndose el potencial del electrodo de trabajo fijo mediante una fuente externa. Esto se logra monitorizando la transferencia de electrones durante el proceso de oxidación-reducción del analito tal como se muestra, en forma general, en la Reacción 1-1



Reacción 1-1

donde O y R son las formas oxidadas y reducidas del par redox y n es el número de electrones involucrados en la reacción. Para sistemas controlados por las leyes de la termodinámica el potencial del electrodo puede ser usado para establecer la concentración de las especies electroactivas en la superficie del electrodo, de acuerdo con la ecuación de Nernst. Estas reacciones están gobernadas por la ley de Faraday, de la que se deriva la Ecuación 1-4, por lo que la corriente resultante de dichos procesos se denomina de tipo faradaico y es la que interesa desde el punto analítico. La intensidad de corriente medida corresponde a la transducción de la velocidad de la reacción electroquímica en la interface del electrodo.

$$i = jxA = nFAv; t = \frac{Q}{i}$$

Ecuación 1-4

siendo i la intensidad de corriente (Amperios, A), j la densidad de corriente eléctrica (A/cm²), A el área del electrodo de trabajo (cm²), t el tiempo de reacción (s) y Q la carga eléctrica (As), F la constante de Faraday (C) y v es la velocidad de reacción electroquímica.

La voltamperometría (o barrido de potencial) es probablemente la técnica electroquímica más utilizada en química analítica para determinaciones cuantitativas y cualitativas y en química física para la obtención de información termodinámica y cinética de sistemas electroquímicos [40]. Esta técnica consiste en aplicar un potencial distinto del potencial en circuito abierto en la interfaz electrodo/solución en presencia de una especie electroactiva. Cuando se aplica un potencial en un rango determinado y en ambas direcciones (oxidación y reducción) a un sistema donde se tiene un par electroactivo, se obtiene un voltamperograma cíclico como el que se muestra en la Figura 1-7. A esta técnica se le denomina voltamperometría cíclica (CV).

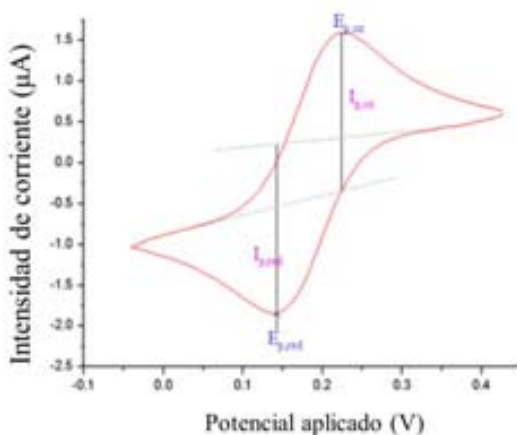


Figura 1-7. Voltamperograma cíclico obtenido en respuesta a un potencial aplicado a un sistema redox

El pico de corriente del voltamperograma de la Figura 1-7 sigue la ecuación de Randles-Sevcik (Ecuación 1-5):

$$i_p = \varphi_p(\Delta)nFAC\left(\frac{nFvD}{RT}\right)^{1/2}$$

Ecuación 1-5

donde i_p es la intensidad del pico (A); n el número de electrones que aparecen en la semirreacción para el par redox; F la constante de Faraday; A el área del electrodo (cm^2); C la concentración de analito (mol/cm^3); v la velocidad de barrido de potencial (V/s); D el coeficiente de difusión del analito (cm^2/s); R la constante universal de los gases; T la temperatura (K); φ_p la función de la corriente que depende de la velocidad de transferencia de carga heterogénea y Δ un número adimensional de valor comprendido entre $0.446 \geq \varphi_p(\Delta) \geq 0.351$. Sustituyendo los valores de las constantes, la Ecuación 1-5 queda como la Ecuación 1-6, donde se muestra que la corriente es directamente proporcional a la concentración de las especies electroactivas y aumenta con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido:

$$i_p = (2.687 \times 10^5) nAC \sqrt{nvD}$$

Ecuación 1-6

La relación de la corriente del pico directa/inversa ($I_{p,red}/I_{p,ox}$) para procesos reversibles suele ser próxima a la unidad, sin embargo, reacciones químicas acopladas a la reacción redox estudiada pueden alterar significativamente esta relación [41]. El número de electrones transferido en una reacción electroquímica reversible puede ser determinado en función de la separación de los picos de oxidación y reducción (ΔE_p):

$$\Delta E_p = E_{p,ox} - E_{p,red} = 2.218 \frac{RT}{nF}$$

Ecuación 1-7

donde $E_{p,ox}$ y $E_{p,red}$ son en potencial del pico de oxidación y reducción, respectivamente.

La voltamperometría de barrido lineal (LSV, *Linear Sweep Voltammetry*) es definida por los mismos parámetros que la voltamperometría cíclica. La diferencia es que el potencial es barrido sólo en una dirección mientras que el método cíclico incluye también el barrido inverso. En la cronoamperometría, la corriente que fluye por el electrodo, es monitorizada en función del tiempo, manteniendo el potencial aplicado hasta el final del experimento.

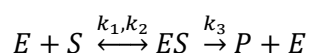
Normalmente, para la medida amperométrica, se utiliza una celda electroquímica, consistente en aplicar un potencial variable entre el electrodo de trabajo (WE) y el electrodo de referencia (RE) que hace que circule una corriente entre estos dos electrodos que es proporcional a la concentración de especies electroactivas en la disolución. El contra electrodo (CE) permite cerrar el circuito y es por donde pasa la corriente.

En este trabajo se han utilizado sensores amperométricos de oro para la medida de oxígeno disuelto. Para la medida de glucosa se modificó la superficie de estos electrodos con una membrana enzimática de glucosa oxidasa. Con tal de adecuar el rango lineal de la respuesta del biosensor se depositó una membrana de difusión sobre el electrodo basada en un polisiloxano.

SENSORES ENZIMÁTICOS

Las enzimas son catalizadores biológicos altamente selectivos que aumentan la velocidad de algunas reacciones bioquímicas. En estas reacciones, la molécula transformada se denomina sustrato, y usualmente implica el empleo de otro reactivo llamado cofactor para poder generar los correspondientes productos. La alta selectividad de las reacciones catalíticas, así como su gran eficiencia de reacción, las hacen susceptibles de ser utilizadas en biosensores, monitorizando por medios fisicoquímicos alguna de las especies que intervienen en la reacción [42].

El tratamiento matemático de la cinética enzimática es muy complejo, pudiendo ser simplificado, para casos dónde hay un solo sustrato, a través de la siguiente reacción esquemática (Ecuación 1-8):



Ecuación 1-8.

donde E, S y P representan la enzima, el sustrato y el producto, respectivamente, y ES es el intermedio enzima-sustrato, k_1 es la constante de formación del complejo intermedio ES, k_2 es la constante de disociación de dicho complejo y k_3 es la constante de formación del producto P.

Para una concentración determinada de enzima, la velocidad de la reacción catalizada enzimáticamente viene dada por la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 1-9):

$$v = \frac{V_m[S]}{K_m + [S]}; K_m = \frac{k_2 k_3}{k_1}; K_{cat} = \frac{V_m}{[E]}$$

Ecuación 1-9

donde V_m es la máxima velocidad de reacción y K_m es la constante de Michaelis-Menten, que corresponde a la concentración de sustrato para la cual la velocidad es igual a la mitad de la velocidad máxima, y que indica, en caso de que $k_2 \gg k_3$, la afinidad de la enzima por el sustrato. El valor de K_m es independiente de la concentración de enzima presente en el sistema, pero dependiente del sustrato a reaccionar y de las condiciones microambientales como el pH y la fuerza iónica. La constante catalítica (K_{cat}) determina la rapidez con que la enzima puede ser reciclada para otra ronda de reacción.

La Figura 1-8 a muestra la representación gráfica de la cinética de una reacción enzimática en función de la concentración de sustrato, según la ecuación de Michaelis-Menten. Desde un punto de vista analítico, a medida que el valor de K_m aumenta, el intervalo de linealidad del sistema aumenta pero a costa de una disminución en la sensibilidad del método de detección. En la figura

Figura 1-8 b se muestra la representación gráfica de la Ecuación 1-10, denominada diagrama de Lineweaver-Burk. Esta representación de la inversa de la velocidad frente a la inversa de la concentración de sustrato es una herramienta muy útil para calcular los parámetros cinéticos de la reacción enzimática [43]. Del punto de corte con el eje de ordenadas se determina la inversa de V_m y del de las abscisas el valor de K_m .

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_m [S]} = \frac{K_m}{V_m [S]} + \frac{1}{V_m}$$

Ecuación 1-10

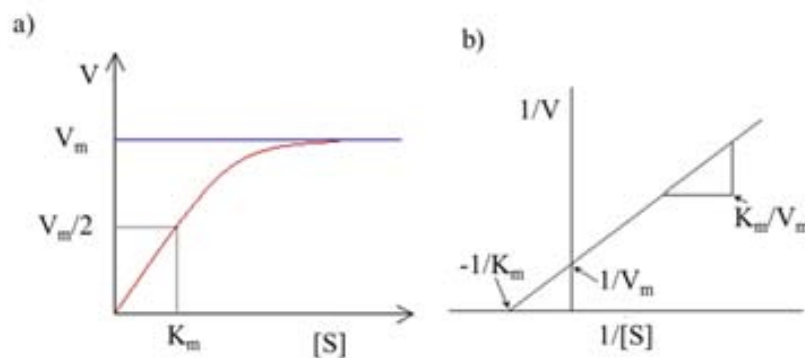


Figura 1-8. a) Representación de la cinética de reacción enzimática según la ecuación de Michaelis-Menten. b) Representación de Lineweaver-Burk para el cálculo de los parámetros cinéticos de una reacción enzimática.

Hay varias estrategias para inmovilizar la enzima y otros componentes en la superficie del electrodo. 1- La adsorción física, a través de fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno, bien por simple inmersión del electrodo en una solución con la enzima o bien favorecida mediante electroadsorción, fenómeno basado en la migración electroforética de moléculas cargadas bajo la acción de un campo eléctrico [44]. Esta técnica es sencilla de realización pero poco reproducible. 2- El atrapamiento en membranas poliméricas inmovilizadas sobre el electrodo. Esta técnica está muy extendida, con especial mención a las membranas electropolimerizables y fotocurables [45, 46]. Sin embargo, la mezcla pre-polimérica no siempre es un ambiente adecuado para la enzima y la necesidad de acceso eléctrico directo al electrodo durante la inmovilización limita su aplicación. 3- La unión a través de enlaces covalentes mediante moléculas puente bifuncionales, capaces de unirse por un extremo a la superficie del electrodo y por otro a la enzima. Cuando se trabaja con electrodos metálicos, los compuestos tiolados son una buena opción, ya que dan lugar a monocapas de moléculas altamente ordenadas sobre la superficie del electrodo [47]. La formación de SAMs es sencilla y rápida, sumergiendo los electrodos en una solución n-alcanotiolada. La posterior inmersión del electrodo modificado en una disolución con la enzima disuelta permite la incorporación de moléculas de enzima mediante enlaces peptídicos. Independientemente de la

estrategia de inmovilización utilizada, es habitual reforzar el anclaje de la enzima al electrodo mediante un entrecruzamiento posterior con glutaraldehído.

Uno de los aspectos más críticos de un sensor enzimático consiste en la limitación que la cinética de la reacción enzimática tiene sobre el rango de detección. Una estrategia para expandir el rango de sustrato a determinar, consiste en restringir el acceso del sustrato a la enzima a través de una membrana de difusión. De esta manera, la respuesta del biosensor es controlada por el fenómeno de difusión del sustrato y no por la cinética de la reacción enzimática. [48]. En la Figura 1-9 a se muestra la respuesta del biosensor al pasar de condiciones de control cinemático a condiciones de control por difusión, con un rango lineal alargado, con una constante aparente de Michaelis ampliada (K_m^{app}), y una sensibilidad disminuida. En la literatura se pueden encontrar membranas de difusión de baja porosidad [49], pero de nuevo, al igual que ocurría en los procesos de inmovilización de la enzima, la deposición de estas membranas habitualmente incluye la inmersión del electrodo en mezclas poliméricas con solventes, que pueden desnaturar la enzima [50].

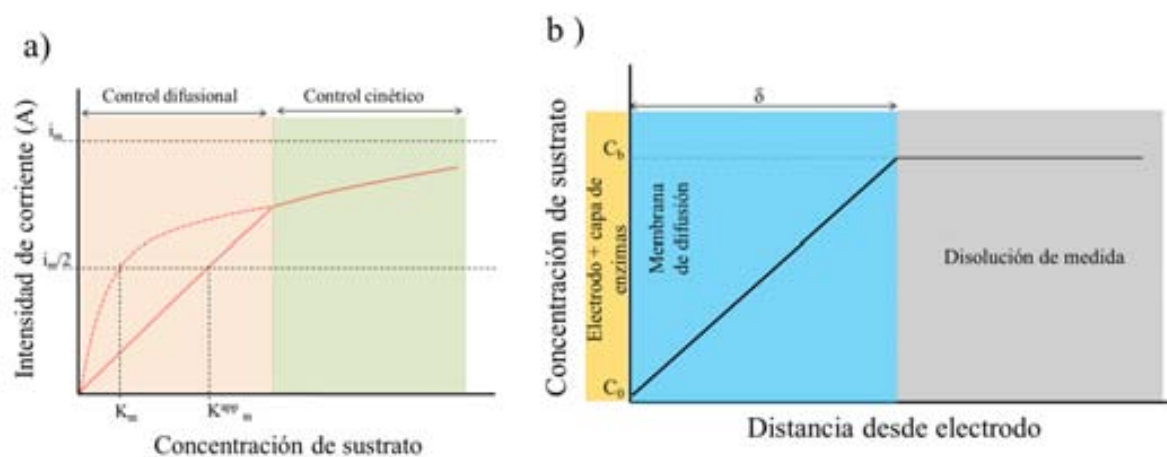


Figura 1-9. a) Efecto de la difusión del sustrato en la sensibilidad y rango lineal del biosensor. b) Efecto del espesor de la membrana en la concentración de sustrato que llega a la superficie del electrodo.

Siguiendo la segunda ley de Fick para el flujo por difusión en la membrana, e igualando éste con el consumo de glucosa por reacción enzimática, se determina el efecto del espesor de la membrana de difusión en la concentración de sustrato que hay en la superficie del electrodo (Ecuación 1-11) (Figura 1-9 b):

$$\frac{D}{\delta}(C_b - C_0) = \frac{K_{cat}[E]}{C_0 + K_m}$$

Ecuación 1-11

siendo D el coeficiente de difusión del sustrato a través de la membrana, δ el espesor de la membrana de difusión, C_b y C_0 la concentración de sustrato en la disolución de medida y en la superficie del electrodo, respectivamente, y $[E]$ la concentración superficial de enzima. Para tener control por difusión se debe cumplir que $C_0 \ll C_b$, de manera que el flujo de moléculas de sustrato, F , solo dependa linealmente de su concentración en la solución (Ecuación 1-12):

$$F \cong \frac{D}{\delta} C_b$$

Ecuación 1-12

La corriente en el electrodo, a su vez, será proporcional al flujo de sustrato que debe ser igual al ritmo de generación de productos electroactivos.

1.1.3 ELECTRODOS INTERDIGITADOS

Los sensores impedimétricos se basan típicamente en electrodos interdigitados (IDE, interdigitated electrodes) y se utilizan para la medida de impedancias en la superficie del sensor. Están formados por dos electrodos metálicos con un elevado número de dígitos intercalados con el objetivo de conseguir una elevada relación entre la longitud de los electrodos y el área que ocupan. Una de sus principales aplicaciones es la medida de conductividad en soluciones electrolíticas [51]. La herramienta analítica utilizada para caracterizar la evolución de la impedancia de un sistema en un rango determinado de frecuencias es la espectroscopia de impedancias (EI). Esta técnica es muy versátil y permite determinar variables de los procesos de transporte de masas, la cinética de las reacciones químicas, propiedades dieléctricas de materiales, etc.

Básicamente la EI se fundamenta en la medida de las impedancias eléctricas en el sistema en un rango de frecuencias determinado. Se aplica un voltaje, señal sinusoidal, y se analiza la respuesta en corriente del sistema, también sinusoidal. Para realizar las medidas es necesario determinar el circuito eléctrico equivalente del IDE. Para ello se asocian los componentes eléctricos del circuito con los correspondientes procesos o elementos electroquímicos del IDE y la solución de medida. Los IDE presentan distintos aspectos ventajosos frente a otros dispositivos de medida de conductividad: se pueden realizar medidas en soluciones de muy baja o nula conductividad, permiten medir la constante dieléctrica del medio, y lo más importante, tienen una penetración de campo muy baja, es decir, que solo miden el medio que está inmediatamente adyacente a la superficie, lo que evita la influencia de la geometría de la celda de medida (o de la estructura microfluidica en que se integre) en la respuesta. A pesar de todo, presentan algunas desventajas, como un rango de medida limitado. Un posible circuito eléctrico equivalente que describe el comportamiento de un IDE en solución acuosa se recoge en la Figura 1-10:

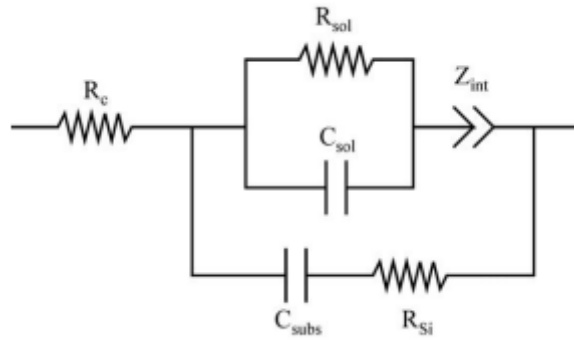


Figura 1-10. Esquema del circuito equivalente que describe el comportamiento de un IDE.

donde R_{sol} hace referencia a la resistencia de la solución, C_{sol} a la capacitancia de la solución, R_c a la resistencia de los contactos eléctricos, C_{subs} a la capacitancia de los electrodos con el sustrato, R_{si} a la resistencia del sustrato de silicio y Z_{int} a la impedancia de la interface entre el material del electrodo y la solución. Mediante un analizador de impedancias se recogen los diagramas de Bode y Nyquist, calculando a partir de ellos el parámetro geométrico de la constante de celda (k) relacionada con la R_{sol} mediante la Ecuación 1-13

$$k = \frac{R_{sol}}{\rho} = \frac{\varepsilon}{C_{sol}}$$

Ecuación 1-13

donde ε es la constante dieléctrica de la solución y ρ es la resistividad (la inversa de la conductividad). Partiendo de una conductividad del medio conocida y determinándose la constante de celda, que es independiente del medio y sólo depende del electrodo usado, por lo que su valor es el mismo para todos los ensayos, se puede monitorizar la variación de la R_{sol} , que a su vez se relaciona con la inversa de la conductividad.

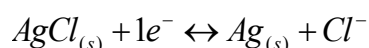
Los sensores impedimétricos no necesitan electrodos de referencia para su funcionamiento, por lo que su integración en sistemas LOC es simple comparada con otro tipo de sensores como los ISFETs o los amperométricos, y es por ello que en este trabajo se han integrado en un sistema microfluidoico que permite medir cambios en la conductividad de disoluciones.

1.1.4 ELECTRODOS DE REFERENCIA

En sistemas de análisis electroquímicos (potenciometría y voltamperometría) es fundamental la utilización de un electrodo de referencia que sea estable para garantizar una medida fiable del electrodo de trabajo [52]. El electrodo de referencia consiste en un electrodo con potencial conocido, estable e independiente de la solución de análisis. Los electrodos de referencia más utilizados son los de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl). Éstos ofrecen mayores ventajas respecto a los de calomelanos o de H₂ ya que son más robustos y estables, de fácil construcción y presentan baja contaminación para su uso en dispositivos médicos.

Los electrodos de Ag/AgCl comerciales consisten en un hilo de plata cubierto de cloruro de plata e inmerso en una solución saturada en iones cloruro que está contenida en un cuerpo de plástico o vidrio. Este tubo suele tener en la parte inferior vidrio poroso tipo Vycor® que hace de unión líquida entre la solución de medida y la interna, permitiendo una buena conducción eléctrica entre las dos soluciones y limitando el flujo de líquido hacia la solución de medida.

La reacción electroquímica que tiene lugar en este electrodo transcurre a través de la Reacción 1-2:



Reacción 1-2

donde el potencial estándar E⁰ la reacción redox del par Ag/AgCl a 25 °C es +0.222 V (vs.NHE, *Normal hydrogen electrode*). El potencial de equilibrio asociado a esta reacción química está relacionado con la actividad del ion cloruro en solución, siguiendo la ecuación de Nernst.

Para trabajar con sensores fabricados con tecnología microelectrónica es necesario disponer de electrodos de referencia miniaturizados que puedan ser integrados en el mismo chip y de este modo aprovechar los beneficios de su pequeño tamaño. Pero normalmente las técnicas de fabricación de estos electrodos no están optimizadas para tamaños a la escala micro. En la actualidad la tecnología utilizada para fabricar electrodos de referencia integrados es la convencional de los electrodos de Ag/AgCl. Para ello se electrodeposita una capa de Ag sobre la superficie del metal del microelectrodo (Platino, Oro, Iridio, etc.) y posteriormente se forma electroquímicamente cloruro de plata a partir de esa capa para obtener una capa de AgCl homogénea [53]. Aunque este proceso parece muy sencillo no siempre da lugar a superficies homogéneas y estables debido sobre todo a la pobre adherencia de la capa de Ag/AgCl sobre el metal. Como consecuencia se obtienen electrodos poco estables y poco durables [54, 55].

Para conseguir un potencial de referencia estable e independiente de la solución de medida se requiere mantener la capa de AgCl en contacto con una solución con concentración de cloruros constante. Para ello los electrodos de referencia comerciales contienen una solución saturada en iones cloruro que está contenida en un cuerpo de plástico o vidrio y un material poroso que actúa de puente salino. Miniaturizar estos dos elementos es uno de los grandes retos de la tecnología de microsensores. Tres son las estrategias seguidas en la literatura: 1) La incorporación de cloruro de potasio (KCl) líquido en una cavidad creada en el chip del microelectrodo; 2) La incorporación sobre la capa de Ag/AgCl de un gel contenedor de KCl; y 3) La incorporación de membranas basadas en líquidos iónicos. Para conseguir la unión líquida se implementan sobre el electrodo fabricado capas o membranas microporosas o membranas externas que limitan el intercambio de ion cloruro entre el electrodo y la disolución [56]. El desarrollo de tecnologías de integración de microcanales sobre los electrodos de Ag/AgCl permite obtener de manera sencilla y rápida uniones líquidas de bajas pérdidas, abriendo posibilidades analíticas para los sistemas LOC [57, 58].

En muchos casos, debido a la dificultad de miniaturizar estos componentes sobre el electrodo, se opta por utilizar el electrodo solo con la capa de Ag/AgCl sin modificar, denominándose electrodos de pseudo-referencia (pRE, *pseudo-reference electrode*). Esto es posible cuando la concentración de ion cloruro de la muestra es elevada y constante.

En el marco de esta tesis se han fabricado electrodos de pseudo-referencia depositando capas de Ag/AgCl sobre microelectrodos de oro para poder ser integrados en sistemas LOC.

1.2 TECNOLOGÍA DE FABRICACIÓN DE ESTRUCTURAS MICROFLUÍDICAS

Los sistemas microfluídicos ofrecen la posibilidad de automatizar los procesos analíticos, permitiendo operaciones de acondicionamiento de la muestra, mezcla de reactivos, calibrado, detección, etc., con pequeños volúmenes de reactivos y muestra y tiempos de reacción cortos. La integración de microsensores y estructuras microfluídicas ofrece grandes ventajas y permite obtener sistemas LOC multiparamétricos. En esta sección se hace un repaso de las técnicas de fabricación más comunes de los sistemas microfluídicos y la integración de estos sistemas con sensores de silicio.

La fotolitografía es una técnica muy utilizada en microelectrónica para la fabricación de ICs, y también tiene su campo de aplicación en la fabricación de estructuras microfluídicas. Esta técnica consiste en depositar una capa de resina fotosintética sobre un sustrato, silicio o vidrio principalmente, (Figura 1-11 a) y hacer pasar un haz de luz ultravioleta (UV) por una máscara con el diseño de la estructura. Si la resina es negativa polimeriza al contacto con la luz y permanece sobre el sustrato formando la estructura microfluídica (Figura 1-11 b₁); y si es positiva, al contacto con la luz se degrada y se elimina al ser revelado el material con un disolvente. Esta capa se puede utilizar entonces como máscara para el ataque (químico o por plasma) del sustrato (Figura 1-11 d), quedando la estructura microfluídica formada directamente en el sustrato una vez revelada la resina (Figura 1-11 e). Para completar la estructura microfluídica es necesario cerrar los canales mediante el pegado de un material, como por ejemplo vidrio o polímeros como el PDMS o el polimetil metacrilato (PMMA). (Figura 1-11 f). La principal desventaja de esta tecnología es la necesidad de instrumental sofisticado, condiciones de sala blanca y personal cualificado.

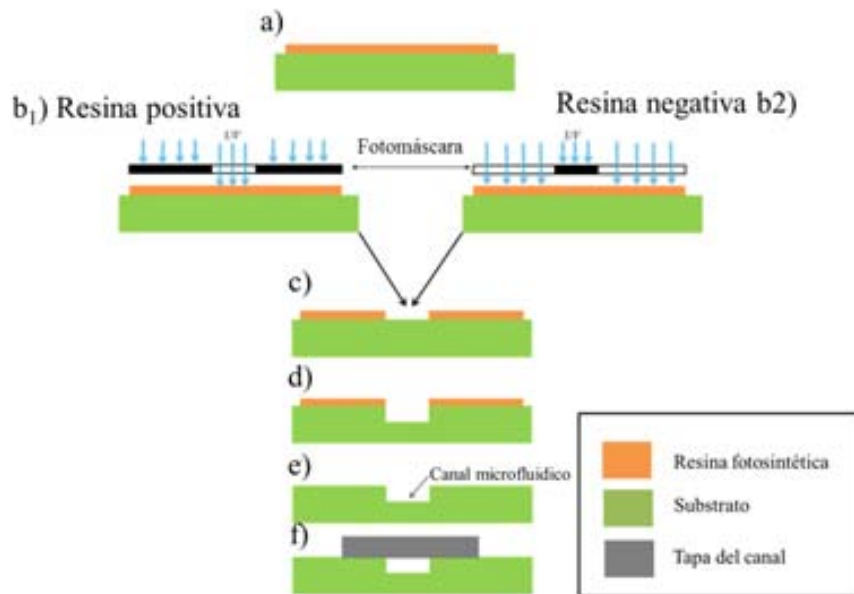


Figura 1-11. Dibujo esquemático del proceso fabricación de canales microfluídicos mediante fotolitografía y posterior ataque del sustrato. a) Deposición de una resina fotosintética sobre un sustrato. b) Irradiación de la resina con luz UV a través de una máscara con los motivos a fabricar. Inversión de los motivos de la máscara según la resina sea negativa o positiva c) Revelado de la resina no polimerizada. d) Ataque del sustrato para formar el canal microfluídico. e) Revelado de la resina. f) Sellado del canal mediante pegado de una tapa.

Pero si en su día, la técnica más utilizada en la fabricación de dispositivos microfluídicos es el replicado por moldeo (*soft lithography*), enmarcada dentro de la metodología de prototipaje rápido debido a la sencillez y rapidez de fabricación de complicadas estructuras con PDMS [59]. El PDMS es un polímero ideal para su utilización en dispositivos LOCs, ya que es biocompatible, ópticamente transparente, permeable a los gases, un buen aislante eléctrico y posee gran estabilidad mecánica [60]. El proceso de fabricación consiste en añadir la mezcla viscosa de pre-polímero y agente entrecruzante (Sylgard 184, Dow Corning Corporation) sobre un molde con el diseño a replicar (Figura 1-12 a y b). Una vez el polímero ha entrecruzado (1 día a temperatura ambiente o 30 minutos a 60 °C), el PDMS endurecido puede ser retirado del master y está listo para ser utilizado (Figura 1-12 c), previo pegado a un sustrato que selle los canales (Figura 1-12 d)

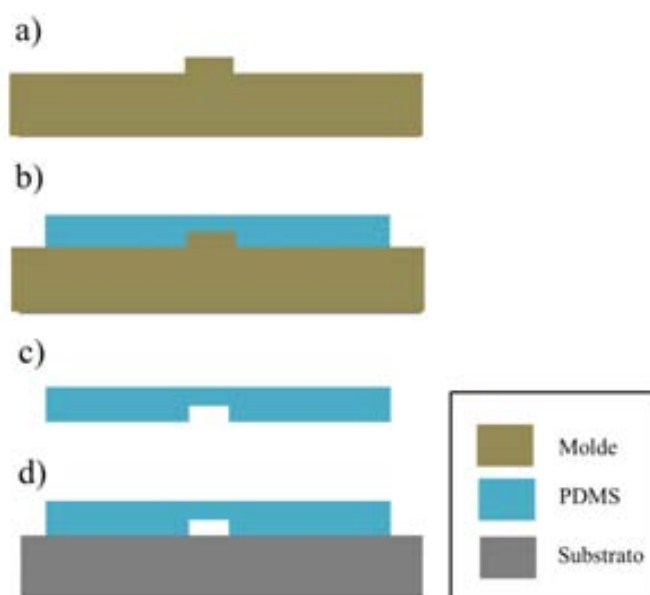


Figura 1-12 Dibujo esquemático del proceso de replicado por moldeo con PDMS a) Molde con el diseño a fabricar. b) Deposición y curado del polímero sobre el molde. c) Separación de la estructura microfluidica replicada. d) Sellado de la estructura sobre un sustrato.

1.2.1 PROCESOS DE PEGADO

La calidad del sellado de los canales determina la funcionalidad del sistema LOC fabricado, ya que la presión interna que soporta el sistema limita el tipo de aplicación.

La adhesión se define como la interacción intermolecular entre dos interfaces [61]. De entre los diferentes mecanismos de adhesión (mecánica, termodinámica, eléctrica) la adhesión molecular es el mecanismo más aceptado para explicar la unión entre dos superficies en contacto. Se basa en interacciones tipo dipolo-dipolo, fuerzas de van der Waals y uniones químicas. La calidad de los sustratos a unir, con superficies libres de imperfecciones, es fundamental para una buena adhesión. La utilización de promotores de la adhesión, como son los tratamientos químicos o los tratamientos con plasmas, son estrategias muy utilizadas en la literatura.

Si bien es posible mantener selladas dos superficies ejerciendo presión sobre ellas [62], esta posibilidad no siempre es factible cuando se tienen estructuras flexibles, como las fabricadas en PDMS, o se requieren sistemas que aguanten presiones internas altas. Las estrategias basadas en el pegado irreversible proporcionan al sistema LOC mayor robustez y durabilidad. La utilización de promotores de la adhesión, tales como capas intermedias adhesivas de PDMS sin curar [63] o de metil silsesquioxano [64] o capas de PDMS con diferente porcentaje de agente entrecruzante [65], son habituales en la literatura. Pero sin duda, el tratamiento superficial con silanos es la estrategia

más utilizada para sellar estructuras fabricadas en PDMS [66, 67]. La introducción de grupos órgano-funcionales en las superficies a unir, mediante tratamientos químicos con silanos, suele ir precedida de una activación superficial con plasma de oxígeno, que en el caso del PDMS genera grupos silanol. En aplicaciones LOC, es deseable que el proceso de pegado no requiera la modificación química del sustrato, para evitar modificar e incluso dañar las superficies funcionalizadas o los elementos de detección [68].

La caracterización de la unión entre superficies se puede realizar mediante técnicas indirectas y directas. Las técnicas indirectas permiten obtener información sobre la composición química de la superficie antes, durante y después del pegado, dando información de los grupos funcionales que forman parte de la unión entre superficies. Las técnicas directas permiten obtener información cuantitativa sobre la fuerza de la unión formada y por tanto la calidad del pegado.

La espectroscopia de rayos X (XPS), es un método de caracterización indirecta que permite obtener información elemental de los estados accesibles de las moléculas superficiales [69], mientras que la microscopía de fuerza atómica (AFM) [70] y la espectroscopia de barrido electrónico (SEM) [67] permiten obtener información topográfica de la muestra. La cuantificación de los grupos funcionales no reaccionados en la superficie es posible determinarla mediante Espectroscopia UV/VIS y fluorescente [71] y la calorimetría diferencial de barrido (DSC), permite obtener información de la estructura química material y del porcentaje de reacción de polimerización y por tanto grupos terminales no reaccionados [68].

Una técnica muy utilizada por su sencillez es el ángulo de contacto (OCA), que permite determinar las propiedades de mojabilidad y la energía superficial de materiales en base al ángulo que forma una gota de un líquido, polar o no polar, sobre la superficie (Figura 1-13). El estudio del ángulo de contacto en superficies tratadas permite realizar una comparación del trabajo de adhesión antes y después de la modificación superficial, y por tanto estimar el grado de modificación del material tras cada tratamiento superficial. Según la ecuación de Young-Dupre (Ecuación 1-14) cuanto menor sea ese ángulo de contacto mayor será la energía superficial y por tanto mayor el trabajo de adhesión:

$$W_a = \gamma_L + \gamma_S + \gamma_{SL}; \gamma_L \cos\Theta = \gamma_S - \gamma_{SL} = \gamma_S(1 + \cos\Theta)$$

Ecuación 1-14

donde γ_L , γ_S y γ_{SL} son, respectivamente, la energía del líquido, del sólido y de la interface sólido líquido; Θ es el ángulo que forma la gota con la superficie y W_a es el trabajo de adhesión.

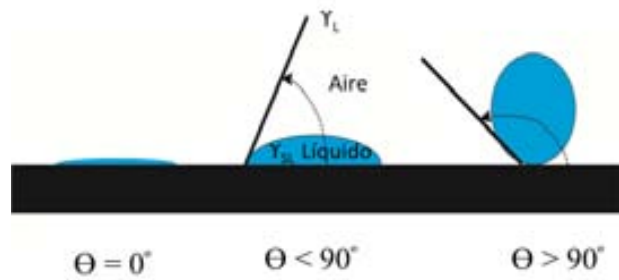


Figura 1-13. Ángulos de contacto de una gota con una superficie.

La espectroscopia infrarroja de reflexión total atenuada (ATR-IR) permite determinar la composición de los grupos funcionales presentes en la superficie de un material. Para ello se hace pasar radiación infrarroja a través de un cristal transmisor de infrarrojos para obtener múltiples reflexiones entre el cristal ATR y la superficie a investigar.

La caracterización directa de la fuerza de enlace entre dos superficies se realiza con ensayos de tracción, que son destructivos y dinámicos, por lo que los parámetros a los que se realiza el ensayo condicionan el valor obtenido de la fuerza de enlace. El test de blíster es un método capaz de medir la adhesión basándose en la inyección de un líquido o gas entre dos materiales unidos, de tal manera que uno de ellos es despegado en forma de ampolla.[72]. La presión o volumen inyectado es medido y usado para determinar el trabajo necesario para despegar el material según la Ecuación 1-5

$$F_{D,Cr} = \frac{P_{Cr} \cdot D_{Cr}}{4}$$

Ecuación 1-15

donde $F_{D,Cr}$ es la fuerza de adhesión de los dos materiales; D_{Cr} es el diámetro de la ampolla crítica, que normalmente se considera un 5% de su tamaño original y P_{Cr} es la presión crítica, correspondiente al valor de presión inyectada cuando el diámetro del blíster ha alcanzado su valor crítico. El valor de la presión crítica es inversamente proporcional al valor del diámetro de blíster y la relación espesor/diámetro del blíster para el material despegado debe ser menor de la unidad.

La presión media ejercida sobre los fluidos en el interior de los sistemas en microfluídicos no suele exceder de los 40 kPa [73]. Para determinar la presión máxima de trabajo que puede aguantar un sistema microfluídico se utiliza el test de fugas. Para ello se inyecta un líquido de color en un canal mientras se aumenta la presión ejercida en el mismo, hasta que el sistema fuga. Estos valores son dependientes de factores como la geometría del sistema, el área de pegado y el tipo de interconexiones microfluídicas utilizadas.

1.2.2 TECNOLOGÍA DE INTEGRACIÓN DE SENSORES Y MICROFLUÍDICA.

El uso de detección óptica en sistemas LOC está muy extendido debido a la simplicidad de integración de estos tipos de transducción con estructuras microfluídicas. El contacto directo entre los transductores (fuentes de luz y fotodetectores) y el sistema microfluídico no es necesario, por lo que los diseños y los procesos de fabricación y post-fabricación de estos sistemas se simplifican enormemente. Pero en muchas aplicaciones existe la necesidad de utilizar otro tipo de transducción, basada en fenómenos electroquímicos, mecánicos, magnéticos u otros [74-76], y que si requieren el contacto directo de los transductores de estado sólido con el líquido dentro del canal. Estos LOC son escasos precisamente por la dificultades tecnológicas de ensamblado de estructuras microfluídicas y sustratos con transductores.

El sustrato más comúnmente usado en la fabricación de transductores es el silicio, principalmente debido a la variedad de procesos de microfabricación disponibles para la formación de estructuras en este material, y a la posibilidad de integrar circuitos microelectrónicos en el mismo sustrato. Un ejemplo reciente del potencial de los transductores de estado sólido de silicio en el diseño de sistemas microanalíticos es el “*ion torrent system*” para la secuenciación del genoma, que utiliza tecnología CMOS para fabricar una matriz de 13 millones de ISFETs [77].

En la literatura se encuentran diversas aproximaciones de metodologías de integración de chips de silicio y estructuras microfluídicas. La estrategia más usada consiste en fijar las estructuras microfluídicas directamente sobre la superficie del chip [78, 79] (Figura 1-14 a) lo que supone utilizar áreas de silicio del orden de los cm^2 , con el sobrecosto que esto significa, pudiendo llegar a resultar en dispositivos económicamente no viables [16, 22]. Integrar los chips fabricados en silicio en sustratos económicos solventa la cuestión de este sobrecosto, pero no siempre resulta en soluciones sencillas o funcionales. Procesos que requieren de muchos pasos (Figura 1-14 b) [80-83] y la utilización de sustratos no estándares (Figura 1-14 c) [84, 85] hacen difícil su automatización. Los procesos de encapsulación de estos chips que resultan en desniveles grandes entre su superficie y el material encapsulante provocan disrupciones abruptas en el flujo del líquido dentro del canal (Figura 1-14 b) [80-84, 86-91], causando flujo no laminar, creando vórtices y volúmenes muertos que degradan las características del sistema microfluídico. Este efecto es especialmente importante en aplicaciones que implican células o micro/nanopartículas suspendidas en el líquido, ya que éstas pueden acumularse en los vórtices [92]. La minimización de los volúmenes muertos además facilita la resolución de los picos cuando se usan técnicas de separación [90, 93, 94].

Las estrategias desarrolladas de pegado de estructuras microfluídicas al chip normalmente requieren modificaciones químicas del sustrato, incompatibles en muchos casos con los materiales de funcionalización del chip [68, 95-99].

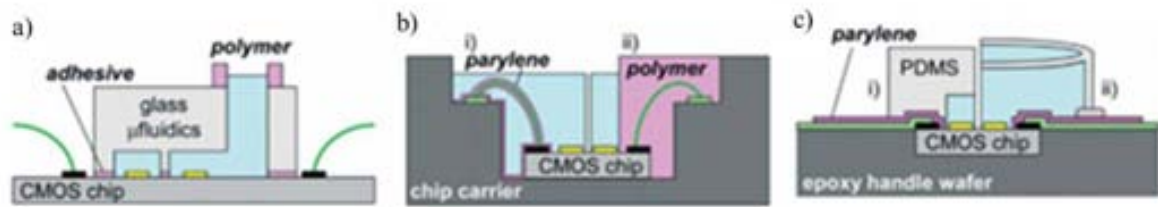


Figura 1-14. Ejemplos de procesos de integración de chips de silicio y estructuras microfluídicas en sustratos plásticos, recopilado en [100].

Los procesos post-fabricación del chip y ensamblaje de la estructura microfluídica con el transductor pueden llegar a ser entre el 80 % [21] y el 95 % del coste total de un LOC [101].

1.2.3 ENCAPSULADO DE SENSORES QUÍMICOS

La encapsulación de los sensores químicos tiene el doble objetivo de proteger de la corrosión las partes eléctricas y a la vez permitir el contacto entre el líquido de medida y las zonas sensibles del sensor. Este es uno de los procesos más críticos en un sensor y también el más costoso. Un buen material en capsulante ha de tener las siguientes propiedades: ser biocompatible, tener una adsorción baja de la solución de medida, tener buena estabilidad química, eléctrica y térmica, proveer una máxima adhesión entre el material encapsulante y el chip para minimizar la penetración de líquido hacia el chip, ser buen dieléctrico, y tener estabilidad estructural [89, 102, 103]. La técnica habitualmente usada para la encapsulación de ICs con sensores químicos ha sido el *chip on board* consistente en pegar el chip sobre una PCB, conectarlo a las pistas de cobre mediante soldadura de sus conexiones (*wire-bonding*) y depositar una resina termocurable sobre el chip y la zona de conexionado. El inconveniente de utilizar este tipo de resinas es la dificultad de definir de forma reproducible la ventana sobre el área sensible del chip (Figura 1-15 a). Con el objetivo de solventar esta problemática, el Grupo de Transductores Químicos desarrolló una metodología de encapsulación, basada en el uso del polímero fotocurable DABA (Ebecryl 600). Este polímero se puede definir mediante técnicas fotolitográficas y por lo tanto permite crear estructuras de forma reproducible y con un grado de automatización elevado [104]. Además, es biocompatible, resistente a disolventes y especies químicas y mecánicamente robusto. Según se muestra en la Figura 1-15 b, la ventana sobre la puerta sensible del chip queda perfectamente

definida con este polímero, así como el espesor de la capa que recubre la soldadura de las conexiones y las pistas de cobre sobre la PCB.

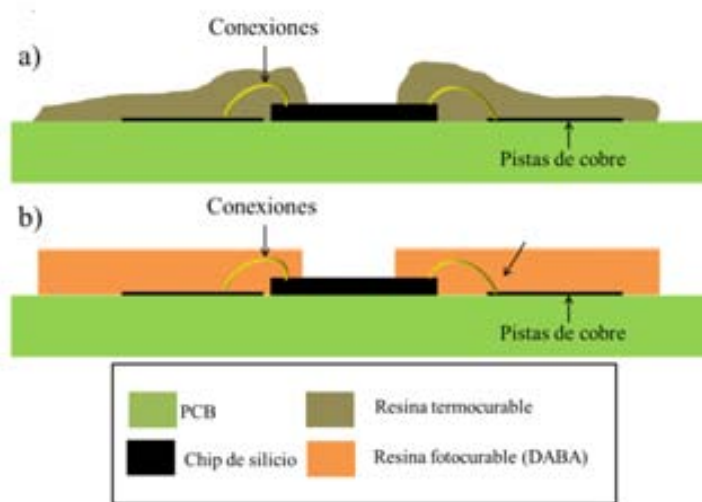


Figura 1-15. Diagrama de la sección transversal de un PCB con el chip fijado y soldadas las conexiones al PCB según la metodología *Chip on board*. Detalle de la ventana sobre la parte sensible del chip a) *glop top* de una resina termocurable y b) la resina fotocurable DABA.

Otras técnicas de encapsulación de ICs con sensores químicos utilizan diferentes resinas, como la poliimida (PI), el poliestireno (PS) y las resinas epoxi (como el SU-8). La PI destaca, por su gran estabilidad térmica, buenas propiedades aislantes, baja constante dieléctrica y su buena adhesión a la mayoría de los sustratos. Sin embargo, no es posible la deposición y grabado de capas gruesas, mayores de 20 μm y no son químicamente estables en soluciones fuertemente alcalinas [105]. El PS también es un material muy usado en fotolitografía por sus buenas propiedades dieléctricas, buena estabilidad química y bajo coste, si bien el proceso de curado es relativamente lento, para curar una capa de 10 μm de material es necesario irradiar la muestra durante 10 minutos [102]. Pero sin duda, las resinas más extendidas en el encapsulado de sensores químicos son las basadas en epoxi, como la resina SU-8. Si bien se ha alcanzado un alto grado de automatización, su uso tiene ciertas limitaciones en procesos de encapsulado de sensores para aplicaciones microfluídicas. Para el desarrollo de una metodología de encapsulación de ICs y estructuras microfluídicas se ha de asegurar una superficie plana y libre de grietas y deformidades para evitar fugas de líquido, condiciones que no cumplen estas resinas. La necesidad de realizar largos pasos intermedios durante el proceso de curado de las resinas epoxi, que requieren altas de hasta los 200 $^{\circ}\text{C}$, provoca la formación de grietas en la superficie del material debido a problemas de contracción térmica y a la formación de burbujas de gas saliendo del interior de la resina no endurecida todavía [89, 93, 106, 107].

Por ello, en el marco de esta tesis se ha desarrollado un proceso de encapsulación específico para aplicaciones microfluídicas, basado en el uso del polímero DABA que, como se ha mencionado anteriormente, ya se utiliza para encapsular sensores para otras aplicaciones. La polimerización mediante luz UV de espesores de entre 10 μm a 500 μm de la resina DABA es un proceso rápido, cura en pocas decenas de segundos sin necesidad de post-procesos de calentamiento, por lo que las superficies están libres de grietas y ampollas. Esto es debido al hecho de que su prepolímero no contiene solventes que tengan que ser desgasificados en pasos intermedios y a que la reacción de polimerización no necesita procesos de calentamiento susceptibles de causar estrés térmico en el material. Esto permite el rellenado de cavidades de cualquier profundidad y la aplicación sobre materiales de diferente coeficiente de expansión térmica. Sin embargo, la resina DABA tiene las desventajas de no permitir un curado pre-exposición, lo que dificulta el proceso fotolitográfico por estar el polímero en estado líquido durante el alineamiento de la máscara y la exposición a luz UV, y que la exposición ha de realizarse en ausencia de oxígeno para obtener una buena polimerización.

1.3 LOCs: MONITORIZACIÓN DE PARÁMETROS QUÍMICOS EN SISTEMAS BIOLÓGICOS

Como ya se ha mencionado, las ventajas de los sistemas LOC respecto a los sistemas analíticos convencionales residen en una reducción notable del consumo de volumen de reactivos, muestras y residuos; tiempos de análisis y respuesta cortos; un flujo laminar que permite controlar reacciones; compactibilidad de los sistemas; análisis multiparamétrico y en general una potencial disminución de los costes de fabricación [20]. Es por todo esto que los sistemas LOC se utilizan en una gran variedad de aplicaciones, como en el control medioambiental [108] o en el control de calidad en la industria alimentaria [109], pero el mayor campo de aplicación pertenece a las aplicaciones bioquímicas [110] debido a la posibilidad, de utilizar volúmenes de muestra reducidos y de realizar el análisis simultáneo de diferentes parámetros.

En esta sección se repasan los avances más significativos respecto a la medida de cultivos celulares y de sistemas de autodiagnóstico basados en LOC.

MONITORIZACIÓN DE CULTIVOS CELULARES

La monitorización de cultivos celulares con sensores electroquímicos se ha descrito extensamente en la literatura. Así por ejemplo, se usan sensores interdigitados para medir la adhesión celular y obtener información sobre la proliferación del cultivo [111, 112] y sensores enzimáticos para determinar las fluctuaciones de glucosa y lactato en el medio [113, 114]. La utilización de transductores tipo ISFET para monitorizar el pH extracelular se ha descrito también extensamente. La basificación del medio puede ser debida a la inhibición de la producción de productos ácidos del metabolismo, como el ácido láctico y el dióxido de carbono, lo que podría interpretarse como una disminución o cese de la actividad metabólica [115-117]. Los ISFETs selectivos a iones se utilizan para determinar las fluctuaciones del flujo de iones potasio y sodio a través de la membrana celular, aportando información del estado de las células. Si se produce lisis celular la concentración de iones potasio en el medio extracelular aumentará, ya que la concentración intracelular es 30 veces superior a la extracelular [118, 119]. Para la medida del oxígeno disuelto en el medio, se han utilizado sensores amperométricos tipo Clark. Esta medida da idea de la respiración celular, y por tanto, del estado de vida de las células. Una disminución o cese del consumo de oxígeno en el cultivo celular podría deberse a la muerte, parcial o total, de éstas [113, 120].

Es conveniente, a la hora de estudiar el metabolismo celular, monitorizar simultáneamente varios analitos, ya que el seguimiento de un sólo parámetro puede dar lugar a interpretaciones erróneas.

Esto es debido a la complejidad del metabolismo celular, donde la variación de un parámetro puede ocurrir por una u otra vía, cada una de ellas con una cinética diferente o bien corresponder a diversos motivos. Esta necesidad de realizar análisis multiparamétrico de diferentes muestras, unido a las restricciones de volumen de la muestra ha propiciado que la tecnología microfluídica se haya convertido en una herramienta imprescindible en el campo de los cultivos celulares [113, 121-123].

Los ejemplos de sistemas LOC comerciales para monitorización de cultivos son limitados. Algunos ejemplos son el sistema CIB (Roche xCELLigence) [124]) que permite la evaluación de la adhesión celular y de la citotoxicidad mediante medida de impedancias [125, 126]; el sistema DOX-96 (Daikin Industries, Ltd) [127, 128] para monitorizar la respiración celular; y el sistema Bionas 2500 (Bionas GmbH) utilizado para la monitorización del pH extracelular, la adhesión celular y la actividad respiratoria celular [112, 129, 130]. La falta de repetitividad y reproducibilidad de estos sistemas [131-133], así como la baja sensibilidad en experimentos a tiempos largos [120, 127, 134-136] son factores que limitan su comercialización. Esto es debido principalmente al diseño de estos sistemas, estando el cultivo celular en contacto directo con los sensores [113, 123]. En el caso de sistemas para monitorizar la adhesión celular con sensores impedimétricos esta sería una buena estrategia, pero no así para otro tipo de sensores, como los ISFETs o los electrodos amperométricos, en los cuales la parte sensible se ve bloqueada o degradada con el tiempo debido al crecimiento de células sobre la superficie sensible del chip. Además la fisiología celular puede verse alterada por campos eléctricos generados en algunos transductores electroquímicos, como los ISFETs, o por algunos procedimientos experimentales [120, 127, 136].

Para mejorar el rendimiento analítico de los dispositivos LOC para monitorización de cultivos celulares, se deberían cumplir los siguientes requerimientos: 1- evitar el contacto directo entre las células y los sensores; 2- análisis simultáneo de múltiples parámetros en varios cultivos; 3- reducción del consumo; 4- estabilidad de la medida en experimentos de varios días de duración; 5- automatización de todos los procesos del sistema; 6- compactación del sistema para poder realizar experimentos dentro de incubadoras.

En este trabajo se ha fabricado un sistema de monitorización de cultivos celulares, que permite analizar simultáneamente el pH extracelular de seis muestras. Para ello ha sido necesario el desarrollo de una tecnología de integración de sensores y estructuras microfluídicas, que en base a un diseño sencillo y funcional, permite: 1- integrar varios sensores en un mismo sustrato asegurando flujo laminar y evitando volúmenes muertos en el sistema; 2-recoger muestras de diversos cultivos, dirigir las hacia los sensores y realizar análisis independientes de cada muestra; 3-

asegurar un volumen mínimo de muestra y reactivos; 4- calibrar los sensores entre medidas sin interferir en los cultivos y 5- un consumo eléctrico bajo del sistema.

DISPOSITIVOS DE AUTODIAGNÓSTICO

Los sistemas de autocontrol de enfermedades pueden mejorar notablemente la calidad de vida de los pacientes, haciendo posible controlar su estado de salud en tiempo real sin necesidad de desplazarse a un hospital. La potencialidad de este tipo de sistemas se desprende de los datos revelados por un estudio realizado en 2003 en Estados Unidos, donde se sostenía que había alrededor de 162 millones de personas que padecían algún tipo de enfermedad considerada crónica [137]. Actualmente los sistemas de autodiagnóstico más conocidos son los glucosímetros para el control de la glucosa en diabéticos. Algunos ejemplos de estos dispositivos comerciales, basados en sensores enzimáticos para determinar la glucosa en sangre son: One Touch Ultra, Arkray, Ascencia Contour, BD Test Strip, Freestyle, Precision Xtra, TrueTrack Smart System y Accucheck Aviva. Existen también dispositivos para el control del embarazo en orina, para la medida de drogas en saliva, todos ellos basados en técnicas de lateral flow e inmunodiagnóstico. Sin embargo, aún hay mucho trabajo por hacer respecto a los sistemas de autodiagnóstico.

La utilización de sensores fabricados con tecnología microelectrónica en este tipo de dispositivos, junto con la implementación de estructuras microfluídicas que permiten realizar tareas de acondicionamiento y calibración del sistema, posibilita obtener sistemas LOC de un rendimiento analítico elevado, muy sensibles y precisos, de respuesta rápida, portables, con un consumo energético bajo y de bajo coste. El tipo de analito a detectar, líquido a analizar, así como la frecuencia necesaria del análisis, determinan el tipo de sensor y el diseño microfluídico a integrar. Algunas enfermedades monitorizadas con sistemas LOC son la diabetes, con sensores enzimáticos amperométricos que detectan la concentración de glucosa en sangre y el trastorno bipolar que se trata con litio y requieren un buen control de la concentración de este ion en sangre (LOC electrophorético medimate). Este tipo de dispositivos, por su portabilidad y bajo coste, tienen también su campo de aplicación en la detección de enfermedades, como el sida [138] y la tuberculosis [137], en países en los que el acceso a hospitales y material sanitario complejo no siempre es posible.

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica que causa variaciones en los niveles de glucosa en sangre sobre el valor normal de 4-6 mM. Esta enfermedad afecta alrededor de 200 millones de personas en el mundo entero, y es por ello que alrededor del 85 % del mercado de los biosensores esté enfocado a los biosensores de glucosa. Normalmente se usan sensores de glucosa de punción

digital, basados en sensores amperométricos y microfluídica de flujo lateral, con los reactivos pre-guardados en el mismo dispositivo. Los avances en materiales y tecnologías abren un nuevo futuro al control de la diabetes, con la vista puesta en un dispositivo implantable y que de información en tiempo real y precisa de la variación de glucosa en la sangre.

Recientemente se ha propuesto que la recurrencia en litiasis renal se podría disminuir mediante el control del pH de la orina [37]. La litiasis renal consiste en la formación de cálculos en las vías urinarias. La formación de estos cálculos está ligada con la aparición de cristales de ácido úrico y fosfato cálcico que actúan como puntos de nucleación, y es por ello que el control del pH de la orina en un paciente propenso a sufrir litiasis puede prevenirle de un próximo ataque. Así valores en la orina de $\text{pH} < 5.5$ inducen la formación de cristales de ácido úrico, mientras que valores de $\text{pH} > 6.2$ inducen la formación de cristales de fosfato cálcico. Estos aspectos comentados dan cuenta de la necesidad de tener medidas precisas y exactas del valor del pH urinario.

En esta tesis se describe el desarrollo de un sistema basados en la utilización de transductores electroquímicos tipo ISFET y la implementación de estructuras microfluídicas, que ha posibilitado la fabricación de un dispositivo comercializable para el control de pH en orina, que permite realizar calibrados del sistema entre medidas de una manera rápida y sencilla [37, 38].

2 OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis consiste en el desarrollo de técnicas o metodologías de integración de sensores basados en tecnología microelectrónica (chips de pequeño tamaño) y estructuras microfluídicas, con vistas a la implementación de sistemas de medida para la monitorización de parámetros químicos en sistemas biológicos (medios de cultivo celular, bioreactores, muestras de fluidos de seres vivos, etc).

Los objetivos concretos de la tesis se presentan a continuación:

1. Estudio de la idoneidad de sensores tipo ISFET, microelectrodos amperométricos e IDEs, fabricados en el IMB-CNM con tecnología microelectrónica para su aplicación en medidas de cultivos celulares y en el control de enfermedades
2. Desarrollo de una tecnología de integración de los chips sensores con estructuras microfluídicas para la implementación de sistemas analíticos con mayores prestaciones que las que ofrecen estos sensores por sí solos. La tecnología a desarrollar debe permitir la integración de múltiples chips en una PCB, y debe realizarse a temperatura moderada y sin el uso de disolventes para evitar la degradación de los componentes selectivos de estos sensores. Se probarán materiales como el PDMS para las estructuras microfluídicas por su gran versatilidad.
3. Diseño y fabricación de sistemas analíticos de medida de pH, utilizando la tecnología desarrollada

3 DESARROLLO DE SENSORES PARA LA MONITORIZACIÓN DE PARÁMETROS QUÍMICOS EN SISTEMAS BIOLÓGICOS

En este Capítulo se muestran los sensores desarrollados y utilizados a lo largo del trabajo de esta tesis. Se explica detalladamente la fabricación de los sensores de glucosa y los electrodos de Ag/AgCl, desarrollados íntegramente para esta tesis, mientras que para los sensores -ISFETs para pH y potasio, sensores voltamperométricos y los sensores de conductividad- su fabricación se describe sucintamente. Todos los sensores se evaluaron para determinar sus características de respuesta analítica y para algunos su respuesta se evaluó también en medios de cultivos para crecimiento neuronal.

Cabe destacar que gran parte del trabajo mostrado en este capítulo forma parte de un proyecto sobre regeneración neuronal y seguimiento de los cultivos mediante sensores. Este proyecto – NEUROMAT, PIF2006-50F0104- fue financiado por el CSIC dentro de la convocatoria de los Proyectos Intramurales de Frontera. En este proyecto participaron el Instituto de Ciencias de Materiales de Barcelona (ICMAB), el Laboratorio de Reparación Neural del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo, el Instituto de Cerámica y Vidrio (ICV) y el Instituto de Microelectrónica de Barcelona (IMB-CNM). En este proyecto se estudió la posibilidad de regenerar el sistema nervioso en situaciones de lesión neuronal, mediante el uso de materiales electroactivos. La estrategia del proyecto residía en estimular el crecimiento neuronal mediante la aplicación de campos eléctricos que favorezcan el crecimiento de las neuritas y las orienten. Para ello se desarrollaron en el ICMAB y en el ICV materiales con propiedades electroquímicas apropiadas para la supervivencia neural y el crecimiento axonal y que además permitan la aplicación de campos eléctricos en el cultivo. Tras la electroestimulación es crucial poder determinar el estado de las neuronas. Esto se realiza mediante la monitorización de parámetros metabólicos en los cultivos celulares con sensores electroquímicos, trabajo desarrollado en el IMB-CNM y cuyos resultados preliminares se presentan en este informe.

Los analitos escogidos para el seguimiento del metabolismo celular son la acidificación del medio extracelular mediante ISFETs de pH; la respiración celular mediante microelectrodos voltamperométricos sensibles a oxígeno disuelto; el flujo del ion potasio a través de la membrana celular mediante ISFETs con membrana selectiva a estos iones; el consumo de glucosa y la variación de conductividad en el medio. Estos parámetros se escogieron por ser claves en el metabolismo celular [112, 116, 129, 139-141]. La respiración celular dará información del estado de vida de las células: una disminución o cese del consumo de oxígeno en el cultivo celular podría

deberse a la muerte, parcial o total, de éstas. La acidificación-basificación del medio dará información de la actividad metabólica no-oxidativa: la basificación del medio podría interpretarse como la inhibición de la producción de productos ácidos del metabolismo, como el ácido láctico y el dióxido de carbono, lo que podría interpretarse como una disminución o cese de la actividad metabólica. El flujo del ion potasio a través de la membrana celular dará información del estado de las neuronas: si se produjera una lisis celular la concentración de iones potasio en el medio extracelular aumentaría notablemente, ya que la concentración intracelular es unas 30 veces mayor que la extracelular[118, 119]. El consumo de glucosa da idea de la actividad celular y la monitorización de la conductividad del medio permite cuantificar e identificar cambios en el medio de estudio. La impedancia eléctrica se ha utilizado como herramienta para una gran variedad de procesos biológicos, permitiendo detectar, cuantificar e identificar cambios en el medio de estudio.

En este trabajo se fabricaron por primera vez en el grupo sensores de glucosa a partir de electrodos amperométricos de oro. Para ello se estudió la inmovilización de la glucosa oxidasa (GOD) mediante varios métodos, y se depositó una membrana de difusión para adecuar el rango de detección del electrodo.

Para medir con estos sensores se requiere de un electrodo de referencia. Uno de los grandes retos de los grupos que trabajan con microelectrodos electroquímicos es obtener un microelectrodo de referencia que se pueda integrar con los electrodos de trabajo. En este trabajo se ha desarrollado un electrodo de pseudo-referencia en base a los sensores fabricados en la sala blanca de IMB-CNM y utilizando la tecnología estándar de Ag/AgCl.

3.1 REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN

REACTIVOS PARA LA PREPARACIÓN DE LOS SENSORES

Todos los reactivos utilizados, tanto en la preparación de los sensores como en su evaluación, son de calidad “para análisis” o similar. Mientras no se diga lo contrario los reactivos provienen de las casas Fluka, Sigma-Aldrich y Panreac. Las soluciones acuosas usadas en este trabajo se prepararon con agua desionizada (resistividad mayor de 18 M Ω).

Para enganchar los chips de los microelectrodos amperométricos al soporte de PCB (printed circuit board) se utilizó resina epoxi Epoteck H77 (Epoxy Technologies) que cura a 160°C. Para la encapsulación de los ISFETs se usó una mezcla polimérica fotocurable formada por tres componentes diferentes: una matriz prepolimérica basada en un epoxi diacrilato de bisfenol A, Ebecryl 600 (DABA, Allnex Bélgica) que se encuentra en una proporción de un 70 % en peso (w/v); el agente entrecruzante 1,6-diacrilato hexediol (HDDA, Allnex Bélgica) en un 27 % w/v y el fotoiniciador Irgacure 651 (Ciba Geigy) en un 3% w/v. El polímero encapsulante DABA, muestra buena resistencia química y adhesión a la superficie del chip semiconductor [142].

Se realizaron tratamientos de acondicionamiento de los ISFETs de pH ya encapsulados en una solución de ácido fluorhídrico al 10 % en volumen (v/v) y en una solución de hidróxido sódico al 2.5 % w/v.

Para aumentar la adhesión de las membranas selectivas a iones potasio a la superficie del chip se silanizó la puerta con una mezcla al 10 % v/v de 3-(Trimetoxisilil) propil metacrilato (TPM) en etanol. Para la preparación de estas membranas se usaron los componentes indicados en la Tabla 3-1 disueltas en la mínima cantidad de tetrahidrofurano:

Tabla 3-1. Composición membrana selectiva iones potasio

Componente	Función	% w/v	Proveedor	
Ebecryl 270	Prepolímero	47.8	Allnex	Matriz polimérica
1,6-diacrilato hexediol	Agente Entrecruzante	10	Allnex	
Irgacure 651	Fotoiniciador	1.2	Ciba Geigy	
Tetrakis(4-clorofenil) borato de potasio	Sal lipofílica	0.5	Fluka	
Bis(2-etilhexil) sebacato	Plastificante	38.5	Fluka	
Valinomicina	Ionóforo	2	Fluka	

Antes de usar los microelectrodos de oro por primera vez se realizó un pretratamiento de la superficie metálica. Primero se realizó una limpieza química en solución piraña (70 % v/v de ácido

sulfúrico concentrado y 30 % v/v peróxido de hidrógeno (H_2O_2)). La activación electroquímica de la superficie de los microelectrodos de oro, en todos casos, se realizó en nitrato potásico (KNO_3) 0.1M y la caracterización del estado de la superficie en ferricianuro de potasio ($K_3Fe(CN)_6$).

La electrodeposición de plata sobre los microelectrodos de oro se realizó en una solución comercial de plata, SILVERTMS (Enthone OMI), de tipo alcalino cianurada. La formación de la capa de cloruro de plata a partir de la plata ya depositada se realizó en una solución de ácido clorhídrico 0.1M (HCl):

Para los experimentos con los sensores de glucosa se utilizó una disolución tampón comercial (PBS) de pH 7.4 con los siguientes componentes: tampón fosfato 0.01M, KCl 0.0027M y cloruro sódico (NaCl) 0.137M. La inmovilización de la enzima sobre los electrodos de oro se realizó a partir de una disolución de glucosa oxidasa (GOD) y albúmina de serum bovino (BSA) en una proporción 5 % w/v de cada molécula en PBS pH 7.4. Se usó una disolución al 25 % v/v de glutaraldehído en PBS pH 7.4 para fijar la enzima a la superficie del electrodo. En el caso de la inmovilización de la enzima a través de enlaces covalentes, se utilizó una disolución 4 mM de ditiobis-N-succinimidil propionato (DTSP) en dimetil sulfóxido (DMSO). La membrana de difusión se formó vía polimerización por condensación gaseosa de la molécula 3-aminopropyl trimethoxysilane (APTMS).

REACTIVOS PARA LA EVALUACIÓN DE LOS SENSORES

La caracterización electroquímica de los ISFETs de pH se realizó en una solución tampón universal de pH 2 con los siguientes componentes: ácido bórico, ácido acético (HAc) y ácido fosfórico (todos 1 M) en KNO_3 0.1M variando el pH con hidróxido potásico (KOH) 1 M. La caracterización de los ISFETs con membrana selectiva a iones potasio se realizó con KNO_3 y NaCl.

El estudio del potencial de trabajo de los sensores de glucosa se realizó variando la concentración de H_2O_2 en una disolución PBS pH 7.4, al ir añadiendo volúmenes conocidos de una solución stock de H_2O_2 0.1 M. La caracterización de la capa de DTSP absorbida sobre el electrodo se realizó en una disolución de KOH 0.5 M saturada de nitrógeno (N_2). La caracterización electroquímica de los sensores de glucosa se realizó en una disolución PBS pH 7.4 según se añadieron cantidades conocidas a partir de una disolución stock 0.1M de glucosa. Esta solución stock se preparó cada 3 días y se guardó en nevera, tras dejar 12 horas a temperatura ambiente para permitir la mutorrotación hacia la forma β -D-glucosa. Los electrodos una vez modificados con enzimas se guardaron en PBS pH 7.4 a 4°C.

La caracterización electroquímica de los IDE se realizó en 5 soluciones acuosas de KCl en el rango de concentración de 10^{-1} M a 10^{-6} M. (Conductividades entre 10-1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$).

Las soluciones acuosas de composición similar al medio de cultivo celular utilizadas para caracterizar los sensores son las siguientes:

Solución A: (sólo especies inorgánicas) 0.026 M de hidrógeno carbonato de sodio (NaHCO_3); 0.051 M de NaCl; 9×10^{-4} M de di-hidrógeno fosfato de sodio (NaH_2PO_4) y 0.01 M de ácido (4-(2hidroxietil)-1-piperazazinil-etanosulfónico) (HEPES). Esta solución se usó para evaluar la respuesta de los ISFETs, acidificándola con HAc 1 M y basificándola con KOH 1 M.

Solución B: 0.01 M de di-hidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4); 0.01 M de hidrógeno fosfato de di-sodio (Na_2HPO_4); 0.05 M de KCl, 0.13 M de NaCl y 0.02 de D-(+)-glucosa. Esta solución se usó para evaluar la respuesta de los microelectrodos de oro al oxígeno disuelto.

La composición del medio de cultivo neuronal, llamado medio neurobasal (GIBCO #370-1103, GIBCO, Grand Island; NY) se expone en la Tabla 3-2.

Tabla 3-2. Composición del medio neurobasal

Componente	Concentración [μM]	Componente	Concentración [μM]	Componente	Concentración [μM]
<i>Sales inorgánicas</i>		<i>Vitaminas</i>		<i>Aminoácidos</i>	
CaCl_2 (anhídrido)	1800	D-Ca pantotenato	8	L-alanina	20
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0.2	Cloruro de colina	28	L-arginina.HCl	400
KCl	5360	Ácido Fólico	8	L-asparagina. H_2O	5
MgCl_2 (anhídrido)	812	i-Inositol	40	L-cysteina	10
NaCl	41300	Niacinamida	30	L-glutamino	500
NaHCO_3	26000	Piridoxal.HCl	20	L-glutamato	
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	900	Riboflavina	1	<i>Otros componentes</i>	
		Tiamina.HCl	10	D-glucosa	25000
		Vitamina B12	0.2	Rojo de Fenol	23
				HEPES	10000

INSTRUMENTACIÓN

Todos los experimentos excepto aquellos en que se indique lo contrario, se realizaron a temperatura ambiente.

La caracterización electroquímica del dispositivo ISFET se realizó mediante medidas del potencial fijando la corriente. Para ello el voltaje fuente-drenador (V_{DS}) y la corriente fuente-drenador (I_{DS}) se fijaron a valores constantes de 500 mV y 100 μA , respectivamente. Dependiendo de la concentración de analito el potencial umbral (V_{th}) del ISFET varía y como resultado el potencial de

la puerta (V_{GS}) varía mediante un sistema de retroalimentación a través del electrodo de referencia. De este modo se puede mantener constante V_{DS} . Los cambios en V_{GS} son iguales pero de signo contrario a los cambios en la interface de la membrana y la solución que dependen de la concentración del analito. Para la lectura y visualización de los datos se utilizó un PC con tarjetas de adquisición de datos (CIO-DAS y CIO-DAQ) usando programas de Labview para el registro automático de estabilidad en el tiempo y calibrado. El pH de la disolución se registró con un pHmetro (CRISON 2000) para controlar externamente los cambios de pH durante la calibración.

La instrumentación utilizada para la técnicas voltamperométricas para la medida de oxígeno disuelto, glucosa y las medidas relacionadas con la fabricación y caracterización de los electrodos de pseudo-referencia fue un potenciostato/galvanostato tipo III μ -Autolab (PGSTAT 30 con FRA-DSG y FRAADC, EcoChemie) controlado por el software GPES 4.7 (General Purpose Electrochemical System). Para ello se utilizó una celda electroquímica formada por tres electrodos, el de trabajo, el de referencia y el auxiliar, que en algunos casos está integrado en el chip y en otros casos es externo (Radiometer Analytical). Se utilizó una sonda óptica (Hach Lange) para controlar externamente la concentración de oxígeno disuelto.

Para las medidas de impedancia con IDE se utilizó un analizador de impedancias SOLARTRON 1260, controlado con el software de control y monitorización D-Plot.

Para las medidas con los dispositivos tipo ISFET se utilizó un electrodo de referencia de doble unión líquida ORION 900200. Para el estudio de los dispositivos amperométricos se utilizó un electrodo de referencia de Ag/AgCl/10% (w/v) KNO_3 (Metrohm 0726 100). Todos los potenciales en este trabajo están referidos a electrodos de referencia Ag/AgCl, salvo en los casos en que se indique lo contrario.

Se utilizó un perfilómetro KLA-Tencor P15 con cabezal de baja fuerza para medir el espesor de las capa de difusión del sensor de glucosa.

3.2 SENSORES

En el marco de este trabajo se han utilizado diversos tipos de sensores, todos ellos fabricados en el IMB-CNM, y cuyo diseño y tecnología de fabricación forman parte del know-how que el GTQ ha ido adquiriendo a lo largo de los años. Se introducirá brevemente la tecnología de fabricación de estos sensores, centrandó la exposición en la fabricación de los que fueron desarrollados íntegramente dentro de esta tesis, los sensores de glucosa y los electrodos de pseudo-referencia.

3.2.1 ISFETs

En el contexto de este trabajo se han utilizado ISFETs para la determinación del pH y la concentración de ion potasio extracelular.

La fabricación de los transductores ISFET se realizó de acuerdo a la tecnología NMOS (*Negative-channel Metal-Oxide Semiconductor*) previamente desarrollada por el GTQ [143-145]. Cabe destacar que con el fin de tener una mayor flexibilidad tecnológica a la hora de introducir procesos que mejoren las características de funcionamiento de los dispositivos (protección contra descargas electrostáticas, integración del electrodo de pseudo-referencia), o que faciliten el encapsulado (aislamiento de los dispositivos del sustrato), los juegos de máscaras utilizados para la fabricación tiene algunos niveles adicionales a los de la NMOS.

En este trabajo se utilizaron dos tipos de diseños de ISFETs, que se muestran en la Figura 3-1. Uno con la puerta de nitruro de silicio (Si_3N_4) para los sensores de pH y otro con la puerta de óxido de silicio (SiO_2) sobre los que se depositó la membrana selectiva a iones potasio. La razón de utilizar diferentes materiales de puertas es porque mientras que los de nitruro dan una mayor respuesta a pH, los de óxido tienen mayor superficie a silanizar y por tanto la adherencia de la membrana es mayor. En ambos casos, el tamaño de cada chip individual es de $3 \times 3 \text{ mm}^2$ y las dimensiones de la puerta del ISFET son de $10 \times 500 \text{ }\mu\text{m}$.

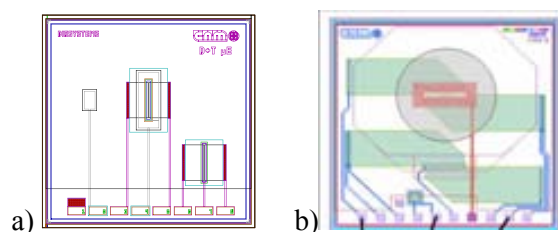


Figura 3-1. Imagen de los ISFETs a) con puerta de Si_3N_4 y b) con puerta de SiO_2 .

En la Figura 3-2 se muestra un dibujo esquemático en corte de la topografía del dispositivo una vez fabricado, con el par ISFET/MOSFET (*metal oxide semiconductor field effect transistor*). Se observa la estructura del ISFET y el MOSFET cada uno con las difusiones de fuente y drenador y su correspondiente metal de contacto, la puerta de nitruro de silicio del ISFET y la de óxido de silicio del MOSFET que además tiene una capa de metal. En la puerta del ISFET se depositó un anillo metálico para la protección contra las cargas electrostáticas (anillo ESD). Según se muestra en la Figura 3-1.a, el ISFET tiene un electrodo metálico que puede hacer de electrodo de pseudo-referencia.

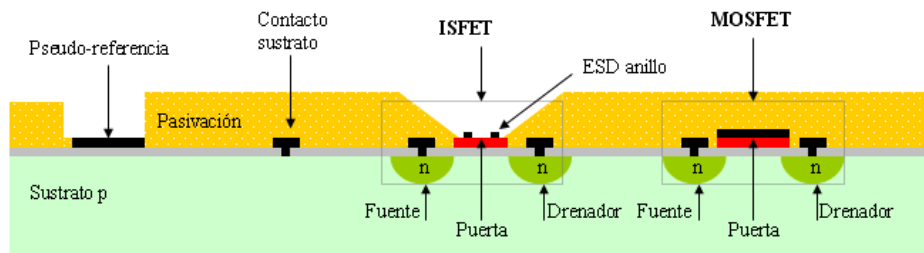


Figura 3-2. Topografía del diseño del ISFET de Si_3N_4 con el par ISFET/MOSFET

Una vez los ISFETS se han fabricado en la Sala Blanca del IMB-CNM, se cortan los chips de la oblea y se fijan en una PCB con una resina epoxy Epoteck H77. Se sueldan los contactos del chip con las pistas de cobre de la tira de PCB con soldadura de hilos de oro. Posteriormente se encapsulan para dejar solo en contacto con el líquido la parte sensible de la puerta del ISFET. Para ello se deposita una capa de una resina formada por Ebecryl 600, HDDA y el fotoiniciador Irgacure 651, tal como se mostró en la Figura 1-15 b. Esta capa encapsulante permite que los ISFETs puedan ser sumergidos en la solución de medida durante largos períodos de tiempo sin que el líquido penetre en las conexiones eléctricas y provoque el cortocircuito del sensor.

ISFETS CON MEMBRANA SELECTIVA A IONES POTASIO

Las membranas basadas en polímeros fotocurables tienen la propiedad de curar en presencia de luz ultravioleta, hecho que ha sido utilizado por el GTQ desde hace ya algunos años para fabricar ISFETs selectivos a iones y que por lo tanto constituye una técnica estandarizada [146, 147].

Una vez encapsulados los ISFETs en las tiras de PCB, y antes de depositar las membranas se silanizó la superficie de la puerta del ISFET. Después de una esmerada limpieza de la superficie con agua y etanol se depositaron dos gotas de una mezcla de TPM con etanol al 10 % v/v sobre la puerta del dispositivo y se dejó reaccionar en una estufa a 80 °C durante una hora. De esta manera se activa la superficie del sensor con grupos acrilato de modo que copolimerizan con los grupos

acrilato de la membrana y se consigue así una mayor adherencia de la membrana a la superficie del dispositivo.

Una vez funcionalizada la superficie se depositó, utilizando un capilar de vidrio, una gota de la mezcla de membrana preparada con los componentes y proporciones expuestos en la sección 3.1 y se curó bajo luz ultravioleta con una potencia de radiación de 22 mW.cm^{-2} y una longitud de onda de 365 nm durante 15 segundos. Una vez depositadas las membranas sobre los ISFETs se guardaron en una solución 10^{-3} M de cloruro potásico.

3.2.2 SENSORES AMPEROMÉTRICOS

En este trabajo se han utilizado microelectrodos de oro para la determinación de oxígeno disuelto y glucosa extracelular y como transductor para los electrodos de pseudo-referencia miniaturizados.

Los microelectrodos de oro fueron fabricados en el IMB-CNM mediante tecnología de Si/SiO₂/metal y procesos de “*Lift-off*” previamente desarrollados por el GTQ. El proceso de fabricación, esquematizado en la Figura 3-3 , parte, de igual forma que para los ISFETs, de una oblea de silicio de 4 pulgadas de diámetro como sustrato. Para aislar los metales del silicio el primer paso involucra el crecimiento de 1000 nm de óxido térmico sobre la oblea de silicio (Figura 3-3.b). A continuación se realiza un proceso de *lift-off* para definir mediante procesos fotolitográficos motivos para los electrodos y conexiones Figura 3-3.c). Se depositan mediante la técnica de evaporación por haz de electrones los metales: primero una capa de 20 nm de titanio y después una de 100 nm de Oro (Au) (Figura 3-3.d). Se elimina la fotoresina con acetona quedando definidos los motivos metálicos deseados (Figura 3-3.e). Una vez que las estructuras están diseñadas, se deposita una capa de pasivación de óxido de silicio, de unos 600 nm por deposición química en fase vapor asistida por plasma (PECVD) (Figura 3-3.f) y de nuevo se deposita una fotoresina para definir la superficie del electrodo (Figura 3-3.g y h). Para abrir el área de los microelectrodos y los contactos se usa un ataque húmedo en una solución tamponada de ácido fluorhídrico (Figura 3-3.i.). Finalmente la fotoresina es eliminada en acetona (Figura 3-3.j.).

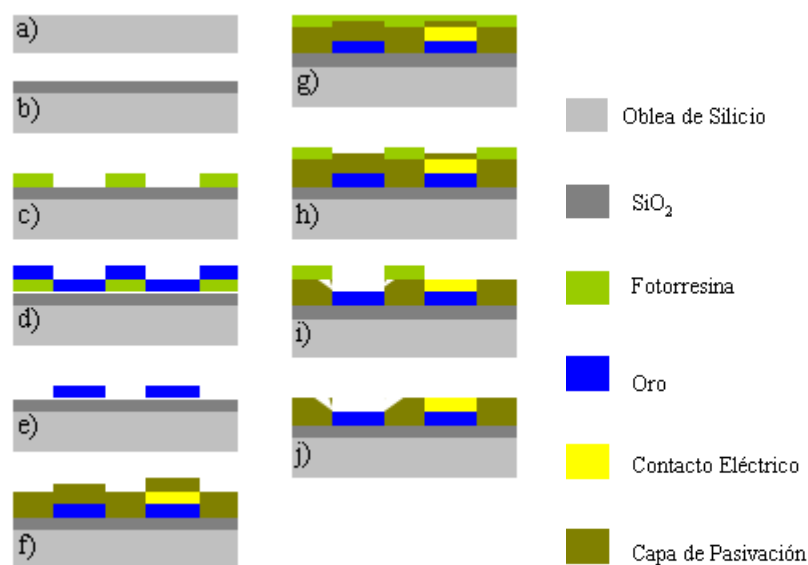


Figura 3-3. Representación esquemática del proceso de *lift-off* para la fabricación de los microelectrodos de oro

En la Figura 3-4 se muestran dos de los chips utilizados en este trabajo, de dimensiones 3 mm x 3.5 mm. Los chips tipo ER constan de tres electrodos, diseñados para ser utilizados como electrodo de trabajo (WE), electrodo de referencia (RE) y electrodo auxiliar (CE). Los chips tipo SER, disponen de dos electrodos, diseñados para ser utilizados como WE y CE. El chip tipo Placa consiste en un único electrodo diseñado para ser utilizado como WE. Para la medida de oxígeno disuelto se usaron chips tipo ER y tipo SER, y para la determinación de glucosa se utilizaron electrodos tipo SER y tipo Placa. En la fabricación de los electrodos de pseudo-referencia de Ag/AgCl se utilizaron chips tipo SER y tipo Placa. En la Tabla 3-3 están recogidas las dimensiones de los electrodos en cada chip.

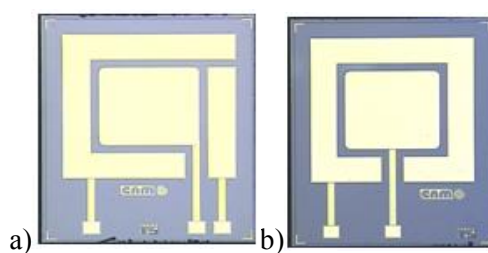


Figura 3-4. Fotografía de los chips amperométricos a) tipo ER y b) tipo SE

Tabla 3-3. Dimensiones de los electrodos en los tres tipos de chips

Chip	Área WE [mm ²]	Área CE [mm ²]	Área RE [mm ²]
ER	1.62	2.08	0.64
SER	1.62	2.77	
Placa	4.51		

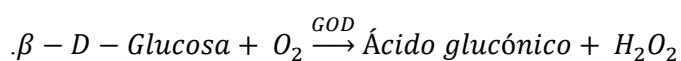
Una vez los sensores se han fabricado en la Sala Blanca del IMB-CNM, se proceden a encapsular de igual manera que los ISFETs, pero utilizando una resina termocurable con grupos epoxy Epoteck H77 en lugar de resina fotocurable Ebecryl 600 (Figura 1-15 a)

Antes de usar los microelectrodos de oro por primera vez se realizó una limpieza química en solución piraña a temperatura ambiente durante 30 s.

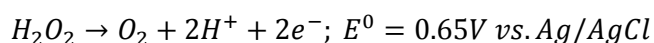
SENSORES DE GLUCOSA

En el contexto de esta tesis se han fabricado sensores de glucosa mediante la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa en la superficie de microelectrodos de oro tipo Placa y tipo SER.

Los sensores amperométricos enzimáticos fabricados se basan en la Reacción 3-1 de oxidación de la β -D-glucosa, como sustrato enzimático, y oxígeno como cofactor, catalizada por la enzima glucosa oxidasa (GOD) [148]. La posterior detección amperométrica del producto de reacción peróxido de hidrógeno (H_2O_2), se realiza según la Reacción 3-2 de oxidación del H_2O_2 [149]:



Reacción 3-1



Reacción 3-2

Para inmovilizar la enzima sobre los electrodos se estudiaron tres procesos con el fin de evaluar cuál de ellos permitía obtener sensores con una respuesta mejor: por adsorción física, por electroadsorción y con formación de enlace covalente. Los protocolos de fabricación se resumen en la Tabla 3-4 y en la Figura 3-5 se muestra un esquema con la configuración de los electrodos modificados.

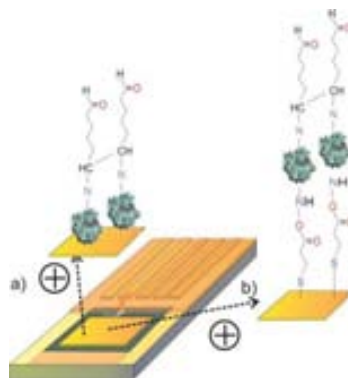


Figura 3-5. Esquema de la configuración final del electrodo modificado según metodología a) de adsorción física y electroadsorción y b) por medio de enlaces covalente.

Para los tres métodos, el paso común para inmovilizar la enzima consiste en sumergir el electrodo en una disolución 5% w/v de GOD, en PBS pH 7.4.

En el caso de la inmovilización mediante electroadsorción se aplicó una densidad de corriente positiva al electrodo para favorecer la migración electroforética de las moléculas de GOD, cargadas negativamente a ese pH. En la Figura 3-6 se muestran, para tres electrodos tipo placa, los cronoamperogramas obtenidos para la electrodeposición de GOD. Como se observa, la electrodeposición es reproducible para los tres electrodos.

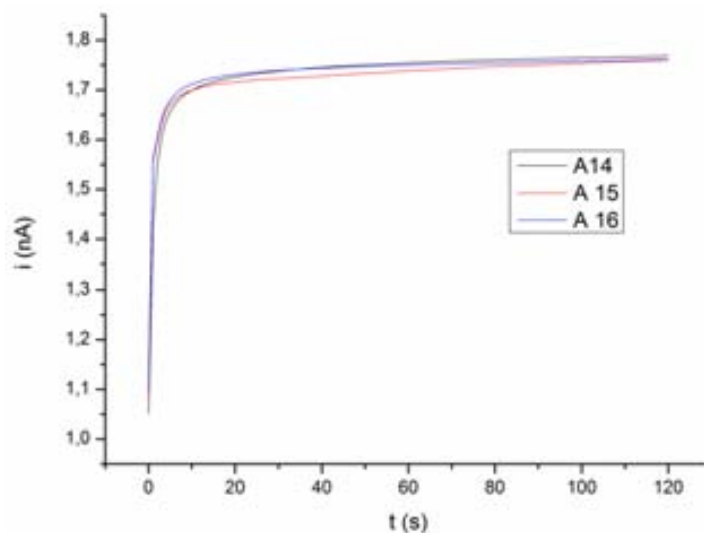


Figura 3-6. Cronoamperograma obtenido de la deposición de las moléculas de GOD, al aplicar una densidad de corriente de 5 mA/cm² sobre electrodos de oro tipo Placa durante 2 minutos.

Para realizar la inmovilización mediante enlaces covalentes se requiere un tratamiento previo del microelectrodo de oro con tal de introducir en su superficie grupos susceptibles de reaccionar con la enzima. Para ello se generó una SAM de moléculas de DTSP, unidas a la superficie de oro a

través de un enlace de azufre dejando libre en el otro extremo de la molécula el grupo succinimida, el cual permite la unión con la enzima a través de un enlace peptídico (Figura 3-5 b).

Para las tres metodologías, una vez inmovilizada la enzima, se realizó un tratamiento con glutaraldehído que forma una red tridimensional y mejora la fijación de la enzima a la superficie del electrodo.

Tabla 3-4. Protocolos de fabricación del sensor enzimático de glucosa.

Método de inmovilización	Pretratamiento del microelectrodo	Inmovilización en [GOD] 5% wt	Post-tratamiento en Glutaraldehído
Adsorción física	No	t = 60 min; T = 4 °C	t = 4 min; T = T _{ambiente}
Electroadsorción	No	j = 5mA/cm ² ; t = 2 min; T = T _{ambiente}	
Enlace covalente (SAM)	[DTSP] 4mM; t = 60 min; T = T _{ambiente}	t = 60 min; T = 4 °C	

Uno de los aspectos más críticos de los sensores enzimáticos de glucosa es su rango lineal, limitado por su cinética normalmente a concentraciones menores de 5mM, y por tanto inferior a la concentración habitual en medios de cultivos. Por ejemplo, en el caso del medio de cultivo neurobasal, la concentración inicial de glucosa es de 25 mM (Tabla 3-2). Para extender el rango de detección lineal y eliminar la dependencia de la respuesta del sensor a la cinética de la reacción enzimática, se depositó una membrana de difusión del polisiloxano APTMS sobre el electrodo. La deposición de la membrana se realizó en fase gas durante 12 horas a temperatura ambiente. En la Figura 3-7 se muestra un esquema con la configuración final de un sensor de glucosa tras la inmovilización de la enzima y la capa de difusión.



Figura 3-7. Esquema de la configuración final de un biosensor modificado con una capa de difusión de APTMS.

3.2.3 ELECTRODOS INTERDIGITADOS

En este trabajo se han utilizado electrodos interdigitados (IDE), con un área total de 2 mm², una anchura de dígitos de 3 μm y una separación entre dígitos de 6 μm, para monitorizar los cambios de conductividad en el medio extracelular.

La fabricación se realizó de acuerdo a la tecnología ya desarrollada en el GTQ [51], consistente en la oxidación térmica de una oblea de silicio para formar una capa de óxido de silicio de 1.5 μm, tras lo cual se deposita, mediante deposición química de vapor de baja presión (LPCVD), una capa de polisilicio de 0.48 μm. Mediante fotolitografía estándar e iones reactivos se graban en el polisilicio los electrodos y subsecuentemente se forman los pads interconectores encima de éstos mediante deposición y grabado de una capa de 0.5 μm de aluminio. Finalmente se deposita y se graba una capa de pasivación consistente en 3000 Å de óxido de silicio y 7000 Å de nitruro de silicio que es eliminada del área de pads y electrodos.

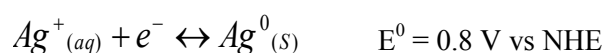
Estos sensores una vez fabricados se encapsularon de igual forma que los ISFETs.

3.2.4 ELECTRODOS DE PSEUDO-REFERENCIA

En esta sección se describe el proceso de fabricación desarrollado en el marco de este trabajo, mediante técnicas electroquímicas, de electrodos de pseudo-referencia de Ag/AgCl sobre microelectrodos de oro, necesarios para realizar las medidas con ISFETs y electrodos amperométricos.

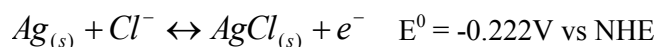
Se utilizaron chips tipo placa (4.51 mm²), nombrados como serie F (F1 a F17) y tipo SER, nombrados como serie R (R01 a R02), utilizándose el electrodo concéntrico (2.77 mm²) para la deposición de las capas de Ag y AgCl (Figura 3-4 b). La deposición de las capas de Ag y AgCl es el proceso más crítico en la fabricación de electrodos de referencia integrados, por lo que debe ser un proceso muy bien controlado.

La electrodeposición de plata transcurre a través de la Reacción 3-3 en una solución comercial de plata:



Reacción 3-3

mientras que la formación del cloruro de plata a partir de la plata ya depositada transcurre a través de la Reacción 3-4 en una solución de HCl 0.1M:



Reacción 3-4

Para depositar estas dos capas se estudiaron dos procesos con el fin de evaluar cuál de ellos permitía obtener capas de mayor calidad. Uno de los dos métodos estudiados fue la cronoamperometría (CA), mediante la cual se aplica un potencial y se mide la corriente en el tiempo. El otro proceso fue la cronopotenciometría galvanostática (CPG), en la cual se aplica una corriente y se mide el potencial en el tiempo.

La densidad de corriente, j , a la que se lleva a cabo el proceso de electrodeposición del material es un parámetro importante, ya que determina la velocidad de formación, la adherencia al sustrato y la calidad final de la capa [54, 55, 150-152]. La intensidad de corriente eléctrica, i , que hay que pasar por el electrodo de trabajo para que tenga lugar la formación de la capa se relaciona, mediante la Ecuación 3-1, con la densidad de corriente eléctrica y el área del electrodo, A :

$$i = j \cdot A$$

Ecuación 3-1

El espesor de las capas depositadas se eligió teniendo en cuenta las recomendaciones de la bibliografía [153], dónde se expone que el grosor de la capa de cloruro de plata ha de ser, como mínimo, $\frac{1}{4}$ del espesor de la capa de plata y que para depositar el cloruro de plata se consume $\frac{1}{3}$ del espesor de plata [54]. En la Figura 3-8 se muestra un dibujo esquemático de la configuración de las capas de Ag y AgCl depositadas sobre el microelectrodo de oro. El espesor de la capa es controlado a través del tiempo de reacción mediante la Ecuación 3-2 y la Ecuación 1-4:

$$th = \frac{Q \cdot M}{q \cdot N_A \cdot \rho \cdot A}$$

Ecuación 3-2

donde th es el espesor de la capa formada (cm), Q es la carga eléctrica (A·s), q es la carga de un electrón 1.602×10^{-19} C, N_A es el número de Avogadro $6.02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$, A es el área del electrodo de oro a cubrir; M es el peso molecular de las especies a depositar (107.87 y 143.32 g/mol para la plata y el cloruro de plata, respectivamente) y ρ la densidad (10.5 y 5.56 g/cm³ para la plata y el cloruro de plata, respectivamente).

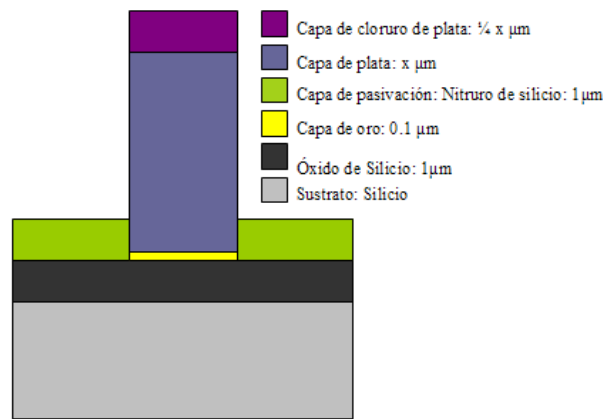


Figura 3-8. Esquema de la estructura del electrodo de Ag/AgCl fabricados sobre microelectrodos de oro.

El primer paso para la deposición electroquímica de las capas de Ag y AgCl es la formación de una primera capa de material muy delgada, típicamente de un espesor de unos $0.1 \mu\text{m}$, de gran calidad y adherencia al sustrato, que permitirá implementar las características de la capa final formada. En la Figura 3-9 a se muestra el voltamperograma lineal obtenido para la electrodeposición de plata sobre la superficie de oro, en la solución comercial de plata, en una ventana de potencial entre -1.3 V y 0 V a 0.3 V/s . Se observa como a un potencial aproximado de -1 V se empieza a depositar la capa de plata. En la Figura 3-9 b se muestra el voltamperograma lineal en $\text{HCl } 0.1 \text{ M}$ para la formación del cloruro de plata a partir de la plata ya depositada, en una ventana de potencial entre 0 V y 0.3 V a 0.3 V/s . En este caso se observa como a partir de un potencial por debajo de 0.05 V se empieza ya a formar la capa de cloruro de plata. De estos resultados se puede obtener información práctica del rango de potenciales y corrientes en los que está teniendo lugar la reacción de deposición, permitiendo relacionar ambas magnitudes y seleccionar sus valores adecuados para las técnicas de deposición estudiadas.

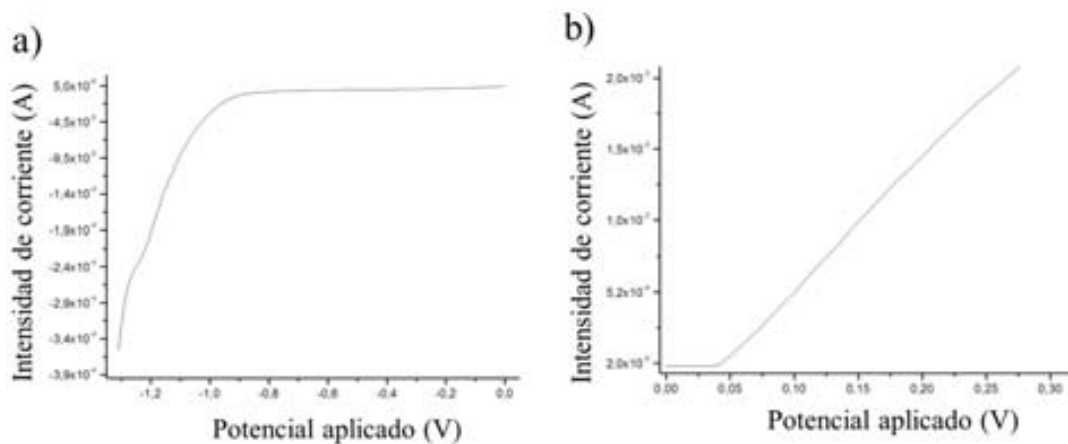


Figura 3-9. Voltamperogramas donde se muestra el estudio de la relación entre las magnitudes de corriente y potencial durante la electrodeposición: a) de plata sobre la superficie de oro y b) de cloruro de plata sobre la plata ya depositada.

Con el fin de determinar los parámetros óptimos del proceso de fabricación de los electrodos de pseudo-referencia se realizó un estudio teórico-experimental de los procesos de formación de las capas de Ag/AgCl en función de la técnica utilizada, la densidad de corriente y el tiempo de deposición. En la Tabla 3-5 y Tabla 3-6 se resumen los valores de potencial e intensidad utilizados para la fabricación de 18 microelectrodos. y sus correspondientes valores teóricos. Tal como puede observarse en la Tabla 3-5, para la deposición de la capa fina de Ag se utilizaron valores de potenciales próximos a -1 V (para la técnica de cronoamperometría) y corrientes entre -4×10^{-5} y -3.6×10^{-4} A (para la técnica cronopotenciometría galvanostática). La columna de Tiempo hace referencia al tiempo teórico necesario durante la electrodeposición para obtener los espesores deseados, entre 5 μm y 110 μm (descritos en la última columna).

La Tabla 3-6 recoge los valores para la formación de la capa de AgCl a partir de la capa fina de Ag. Se usaron valores de potenciales entre 0.02V y 0.11V (para la técnica de cronoamperometría) y corrientes entre 1.6×10^{-6} y 1.87×10^{-4} A (para la técnica cronopotenciometría galvanostática). La columna de Tiempo hace referencia a la duración de la electrodeposición necesaria para obtener los espesores deseados, entre 0.3 μm y 10 μm (descritos en la última columna).

En la Figura 3-10 a y Figura 3-10 b. se muestran, para tres electrodos, los registros obtenidos durante el proceso de electrodeposición de plata mediante CA y CPG, respectivamente. Las curvas de respuesta muestran la forma esperada: una variación inicial de la corriente o potencial que indica la formación de los núcleos de plata y un estado estacionario que indica el crecimiento homogéneo de esos núcleos para dar lugar a una capa uniforme. La relación entre potencial o corriente y la corriente o el potencial registrado siguen la tendencia esperada de acuerdo a la Figura 3-9 a.

En la Figura 3-11 a y Figura 3-11 b se muestran, para tres de los electrodos fabricados, los registros obtenidos durante el proceso de formación de la capa de cloruro de plata, mediante cronoamperometría y cronopotenciometría galvanostática, respectivamente. Al igual que para la formación de la capa de plata, los resultados registrados tienen la forma esperada y siguen la tendencia prevista de acuerdo a la Figura 3-9 b.

Tabla 3-5. Parámetros utilizados en el proceso de electrodeposición de la capa de plata sobre la superficie de oro de 18 microelectrodos.

Electrodo	Técnica	Densidad [A/cm²]	Potencial aplicado [V]	Intensidad aplicada [A]	Tiempo [s]	Espesor Estimado [μm]
F1	CA	2.15E-03	-1,05		7200	110
F2	CA		-1,05		7200	101
F3	CA	5.03E-03	-1,03		7200	88
F4	CA	1.87E-03	-1,05		7200	72
F5	CA	1.41E-03	-1,07		7200	66
F7	CA	5.00E-04	-0.95		7200	39
F8	CA	5.00E-04	-1.05		382	5
F9	CA	8.03E-04	-1.00		7200	70
F10	CA	5.00E-04	-0.98		2183	20
F11	CA	5.00E-04	-1.09		1043	20
F12	CA	5.00E-04	-0.96		2355	21
F13	CPG	1.00E-03		-4.00E-05	8000	10
F14	CPG	9.00E-03		-3.60E-04	1044	10
F15	CPG	9.00E-03		-3.60E-04	1044	10
F16	CA	5.00E-04	-0.89		9000	20
F17	CPG	9.00E-03		-3.60E-04	1044	10
RI01	CA	5.00E-03	-0.95		5220	34
RI02	CA	5.00E-03	-0.97		4120	29

CA: Cronoamperometría. CPG: Cronopotenciometría.

Tabla 3-6. Parámetros utilizados en el proceso de formación de la capa de cloruro de plata a partir de la capa de plata sobre 18 microelectrodos.

Electrodo	Técnica	Densidad [A/cm ²]	Potencial aplicado [V]	Intensidad aplicada [A]	Tiempo [s]	Espesor Estimado [μm]
F1	CA	4.53E-04	0.11		700	4.41
F2	CA	4.55E-04	0.08		300	1.94
F3	CA	5.00E-04	0.07		1797	8.42
F4	CA	5.00E-04	0.08		1800	7.28
F5	CA	5.00E-04	0.08		1800	6.55
F7	CPG			1.6e-5	468	
F8	CA	2.50E-05	0.02		400	0.3
F9	CA	5.00E-04	0.04		6755	10
F10	CA	5.00E-04	0.05		1379	5
F11	CA	5.00E-04	0.05		1618	5
F12	CA	5.00E-04	0.04		7200	9.56
F13	CPG	2.00E-04		8.00E-06	4677	2.50
F14	CPG			1.60E-06	137	
F15	CA	4.00E-05	0.04	1.60E-06	2338	2.50
F16	CA	2.50E-03	0.05		1027	5.00
F17	CPG	4.00E-05		1.60E-06	2338	2.50
RI01	CA	5.00E-04	0.05	2.00E-05	1740	7.23
RI02	CA	4.50E-03	0.05	1.87E-04	2010	7.13

CA: Cronoamperometría. CPG: Cronopotenciometría.

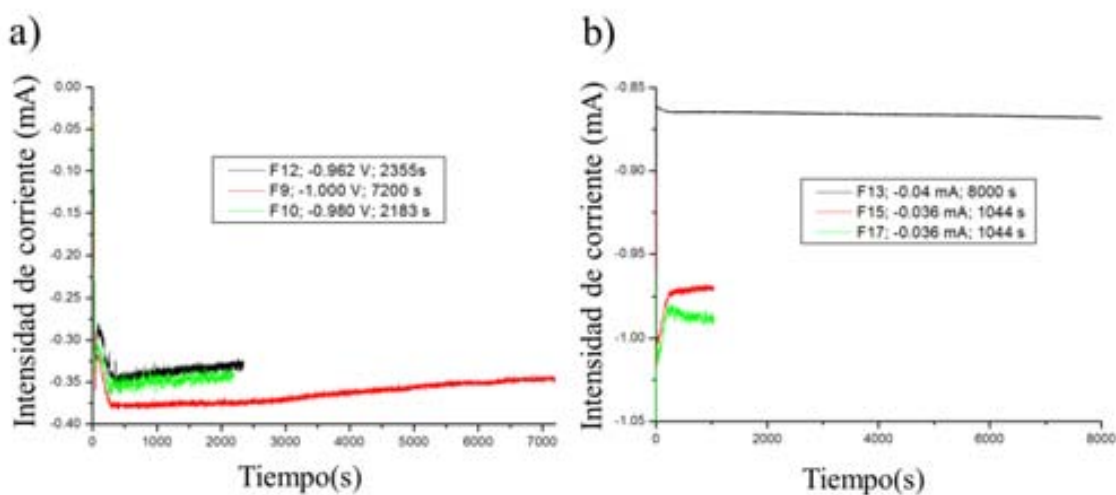


Figura 3-10. Respuesta registrada durante la deposición de la capa de plata a) mediante cronopotenciometría y b) mediante cronopotenciometría galvanostática

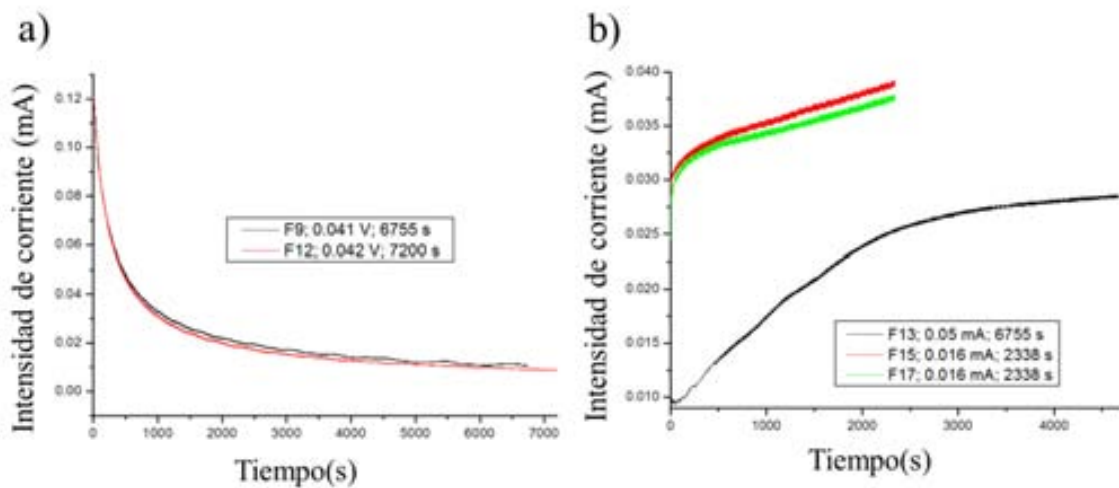


Figura 3-11. Respuesta registrada durante la deposición de la capa de cloruro de plata a) mediante cronoamperometría y b) mediante cronopotenciometría galvanostática

En la Tabla 3-7 se muestran valores del espesor, para dos electrodos, de la capa de plata formada y de la capa de plata más la de cloruro de plata, determinados mediante perfilometría. Los valores del espesor de las capas de Ag para estos dos electrodos concuerdan con los valores teóricos recogidos en la Tabla 3-5 en función del tiempo de electrodeposición utilizado en su formación. La disposición y la escala de las capas puede verse en la Figura 3-8. En la Figura 3-12 se muestran imágenes al microscopio de la capa de plata y de cloruro de plata fabricadas, en las cuales pueden apreciarse la homogeneidad de las mismas.

Tabla 3-7. Espesor teórico y experimental para los electrodos de la serie R

Electrodos	Valor Teórico		Valor Experimental	
	Espesor Ag [μm]	Espesor AgCl [μm]	Espesor Ag [μm]	Espesor Ag + AgCl [μm]
RI01	34	7	31	33
RI02	29	7	26	30

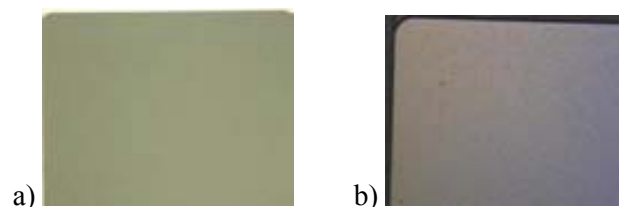


Figura 3-12. Imagen al microscopio a) de la capa de plata y b) de la capa de cloruro de plata.

3.3 METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN

Se realizó la caracterización y evaluación de todos los dispositivos en medios acuosos con el objetivo de determinar sus características de respuesta (sensibilidad, rango de concentración, límite de detección, reproducibilidad, etc.).

Adicionalmente, para los ISFETs de pH e ion potasio, electrodos de oxígeno disuelto y electrodos de pseudo-referencia se verificó que su señal (básicamente la estabilidad con el tiempo) no se veía afectada por un medio de cultivo (medio neurobasal). Finalmente, se realizaron medidas preliminares del medio extracelular con ISFETs de pH y de ion potasio en un cultivo de neuronas.

3.3.1 EVALUACIÓN EN MEDIOS ACUOSOS

ISFETS DE pH E ION POTASIO

La acidificación-basificación de un medio de cultivo dará información de la actividad metabólica no-oxidativa: la basificación del medio podría interpretarse como la inhibición de la producción de productos ácidos del metabolismo, como el ácido láctico y el dióxido de carbono, lo que podría interpretarse como una disminución o cese de la actividad metabólica.

La calibración de los ISFETs de pH se realizó en la *Solución A*, de composición similar al medio neurobasal, en un rango de pH propio de cultivos celulares (de pH desde 5 hasta 9). El pH fue fijado en los valores estudiados con ayuda de HAc 1 M y KOH 1M.

La solución externa de los electrodos de referencia comerciales usada es KNO_3 al 10 % w/v, salvo en los experimentos que involucraron ISFETs selectivos a ion potasio, que para evitar la posible contaminación del medio por flujo de iones potasio a la solución de medida se usó acetato de litio 0.1M.

La estabilidad con el tiempo de los ISFETs de pH se determinó a temperatura ambiente en la *solución A* frente a un electrodo de referencia de Ag/AgCl comercial.

Los dos iones principales en el medio celular son el sodio y el potasio, de vital importancia en la transmisión del impulso nervioso. La concentración intracelular de sodio en los mamíferos está comprendida entre 5 y 15 mM, mientras que la extracelular es mucho mayor (145 mM). Sin embargo, las concentraciones intra y extracelulares de potasio están comprendidas entre 140 mM y 5 mM, respectivamente [118, 119]. Esto nos indica que hay un fuerte gradiente electroquímico que

impulsa a las dos sustancias a moverse: el sodio hacia dentro de la célula y el potasio hacia fuera. En el medio neurobasal la relación de concentraciones entre el ion potasio y el ion sodio es de 0.08.

Para los ISFETs con membrana selectiva a iones potasio la calibración se realizó registrando la señal de salida al variar la actividad de ion potasio en una solución de 25 ml de agua desionizada con KNO_3 , entre 10^{-8} M y 10^{-2} M. Las curvas que se obtienen se pueden separar en dos zonas, la parte lineal (o región nernstiana) y la parte donde no hay respuesta del sensor al variar la actividad del ion. La proyección sobre el eje de abscisas de la intersección de las dos rectas correspondientes a cada una de las dos zonas de respuesta proporciona el valor límite de detección. Según las recomendaciones de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) [154] se define como la concentración a la cual el potencial medido se desvía del potencial medio de la región nernstiana en un múltiplo arbitrario del error estándar.

Para el caso de los ISFETs con membrana selectiva a iones potasio hay un parámetro adicional que hace falta tener en cuenta ya que es el que nos dará información sobre si las medidas son viables o no con el sensor de estudio. Este es la selectividad del sensor y es definido como la proporción de respuesta del sensor al analito o ion principal frente de la existencia de otros iones en la solución (iones interferentes). Como ya se ha comentado anteriormente se cuantifica mediante el coeficiente de selectividad (K_{ij}^{pot}). Hay diferentes metodologías para determinar este parámetro que se pueden dividir en dos grandes grupos: el método de las soluciones separadas y el método de las soluciones mixtas [155]. En todos los casos el coeficiente de selectividad potenciométricos se expresa de acuerdo con la Ecuación 3-3 de Nicolsky-Eisenman:

$$E = E^0 + \frac{RT}{z_i F} \log(a_i + K_{ij}^{\text{pot}} (a_j)^{\frac{z_i}{z_j}})$$

Ecuación 3-3

donde E , E^0 , R , T , z_i , F y a_i tienen el mismo significado que en la ecuación de Nernst y donde z_j es la carga del ion interferente, a_j la actividad del ion interferente en solución y K_{ij}^{pot} es la constante de selectividad potenciométrica. Cuando K_{ij}^{pot} es superior a 1 se considera que el ISFET responde más selectivamente al ion interferente que al propio analito.

En este trabajo se obtuvieron los valores de los coeficientes de selectividad utilizando uno de los métodos propuestos por la IUPAC: el método de las soluciones mixtas, en el que se mantiene constante la actividad del ion interferente (FIM: Fixed Interferent Method). Este es un método gráfico que se basa en hacer un calibrado del ion principal (analito) en una solución que contenga una actividad fijada y constante del ion interferente. Para ello se utilizó una solución 0.15 M de NaCl sobre la que se fueron adicionando volúmenes conocidos de KNO_3 para variar la actividad de ion potasio entre 10^{-8} M y 10^{-2} M. Se representa el potencial de respuesta frente a las actividades del

ion principal. La intersección entre la región nernstiana y la región no nernstiana indica el valor de la actividad del ion principal que deberá ser utilizada en la Ecuación 3-4 y así calcular el K_{ij}^{pot} .

$$K_{ij}^{pot} = \frac{a_i}{(a_j)^{z_j}}$$

Ecuación 3-4

La estabilidad con el tiempo de los ISFETs de potasio se determinó, a temperatura ambiente, en una solución de NaCl 0.15M frente a un electrodo de referencia de Ag/AgCl comercial.

SENSORES DE OXIGENO DISUELTO

En un medio abierto a la atmósfera la concentración inicial de oxígeno disuelto (O_2) en una solución acuosa será de unos 8 ppm. Una disminución en la concentración de oxígeno puede relacionarse con la respiración celular.

Los microelectrodos de oro sufren un proceso de pasivación de la superficie, lo que resulta en una disminución del área efectiva del microelectrodo. Como la intensidad de corriente de la reacción de reducción-oxidación es proporcional al área del microelectrodo, se hace necesario realizar una activación electroquímica cada vez que se utilizan estos electrodos. Para ello se realizaron 15 barridos de potencial en KNO_3 0.1 M, en una ventana de potencial de 0.8 a -2.2 V y a una velocidad de 0.1 V/s [156]. La determinación experimental del área electroquímica de los microelectrodos se determinó a través de la Ecuación 1-6 y la Ecuación 1-7, siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.2. En la Figura 3-13 se muestra la diferencia de dos barridos de potencial en presencia de ferricianuro de potasio antes y después de la activación electroquímica.

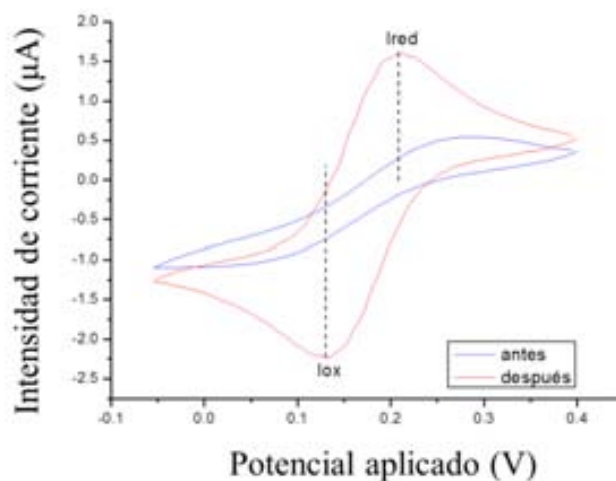
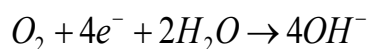


Figura 3-13. Voltamperogramas cíclicos en presencia de ferricianuro de potasio antes y después de la activación electroquímica de la superficie del microelectrodo de oro

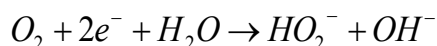
Una vez comprobado que el estado de los microelectrodos de oro es óptimo se procedió a realizar un calibrado para el oxígeno disuelto.

La Reacción 3-5 de reducción de oxígeno disuelto en un medio neutro o básico es:

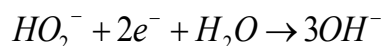


Reacción 3-5

aunque en realidad, el mecanismo es mucho más complejo y se divide en dos reacciones secuenciales que involucran cada una de ellas dos electrones, que se puede relacionar con la señal voltamperométrica (Reacción 3-6 y Reacción 3-7):



Reacción 3-6



Reacción 3-7

Al realizar un barrido lineal hacia potenciales negativos con los microelectrodos de oro en una solución acuosa y en una ventana de potencial comprendida entre 0.4 y -1.2 V a 0.1 V/s, se observan tres zonas en el voltamperograma (Figura 3-14). La primera, que va aproximadamente desde 0 hasta -0.6 V en la que tiene lugar la Reacción 3-6 y que involucra la reducción de O_2 y formación del ion hidróxido (OH^-). La segunda zona, en la que sucede la Reacción 3-7, que va

aproximadamente desde -0.6 a -1 V y en la que se consume la especie intermedia formada en la Reacción 3-6. Y la tercera zona, a partir de -1 V, que corresponde a la descomposición del agua para formar hidrógeno.

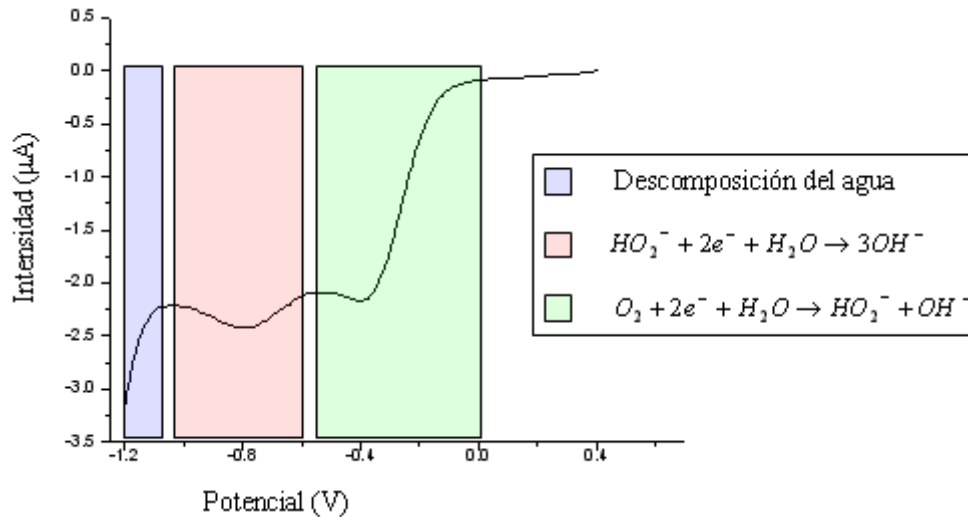


Figura 3-14. Voltamperometría lineal donde se observan los dos picos de reducción de oxígeno.

Como las reacciones de reducción de oxígeno disuelto tienen lugar en una amplia ventana de potencial, se eligió -0.8 V vs Ag/AgCl el valor del potencial de trabajo, ya que ese potencial es lo suficientemente negativo como para asegurar que la señal de salida (intensidad de corriente) es debida a la reducción total del oxígeno en disolución.

La recta de calibrado para las distintas concentraciones de oxígeno en el medio de estudio (*Solución B*) se obtuvo según la siguiente metodología. Se varió la concentración de oxígeno de 8 ppm a 0 ppm en el medio (valores medidos con una sonda óptica), mediante burbujeo de una mezcla de N₂/aire. Para cada concentración de oxígeno en el medio se realizó un barrido de potencial a 0.1 V/s de +0.4 a -1.2 V. De los datos registrados se obtuvo el valor de la intensidad de reacción a un potencial de -0.8 V y finalmente se representó el valor de intensidad frente a la concentración del oxígeno en el medio. El esquema del sistema utilizado para la variación de oxígeno se muestra en la Figura 3-15.

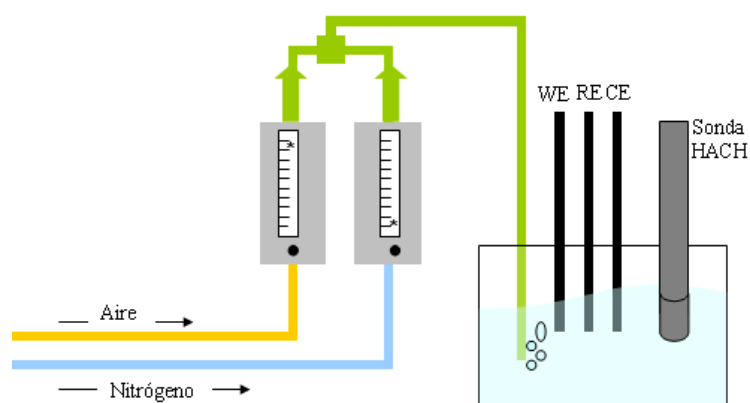


Figura 3-15. Esquema del sistema de medida para los electrodos de O_2 .

SENSORES DE GLUCOSA

En un medio de cultivo, como medio neurobasal, la concentración inicial de glucosa es de 25 mM. Una disminución en la concentración de glucosa puede relacionarse con el crecimiento celular.

La caracterización de los sensores de glucosa se realizó en base a detección amperométrica del subproducto de la reacción enzimática, peróxido de hidrógeno, en el electrodo de oro, (Reacción 3-1 y Reacción 3-2). Se realizó un estudio del potencial óptimo de trabajo para la detección amperométrica de la oxidación del H_2O_2 consistente en el registro de los barridos de potencial a $0.05Vs^{-1}$ de 0 V a 0.9 V para un rango de concentraciones de H_2O_2 en el medio de 0 mM a 8.7 mM. Se realizó un estudio para comprobar que la velocidad de reacción enzimática, Reacción 3-1, correspondía al valor aportado por el fabricante, teniendo en cuenta que 1U GOD oxida el O_2 a una velocidad de $0.1 mM \cdot min^{-1}$. Para ello, sobre una solución de glucosa 50 mM en PBS pH 7.4 se añadió en un determinado instante 50 U de GOD. Mediante cronoamperometría (aplicando el potencial de oxidación del H_2O_2) se determinó la variación en la intensidad de señal al añadir la GOD a los 55s del inicio del registro de datos. Se utilizó un electrodo de oro sin modificar para este ensayo.

Para los electrodos con enzima inmovilizada mediante enlace covalente se estimó el porcentaje de superficie de electrodo cubierta por la capa de DTSP formada (Γ) a partir de la Ecuación 3-5, donde n es el número de electrones puestos en juego en la reacción de desorción reductiva, 1 para el caso de este estudio y F es la constante de Faraday. El área electroquímica de los electrodos no modificados se determinó a través de la Ecuación 1-6 y la Ecuación 1-7 siguiendo la metodología expuesta en el apartado anterior. Se integró el área de los picos de desorción reductiva de la SAM

obtenidos mediante voltamperometrías del electrodo modificado, entre -0.3 V y -1.3 V a 50 mVs⁻¹, en una disolución desoxigenada de 0.5 M KOH [157, 158].

$$\Gamma_{experimental} = \frac{\text{Área}_{integrada}}{nF\text{Área}_{electroquímica}}$$

Ecuación 3-5

La calibración de los biosensores de glucosa fabricados de acuerdo a las distintas metodologías descritas en el apartado 3.2.2 (adsorción, electroadsorción y enlace covalente) se realizó mediante cronoamperometría, a un potencial de trabajo optimizado, en un medio tamponado (PBS, pH 7.4). La concentración de glucosa se fue variando añadiendo cantidades conocidas de una solución stock 0.1 M de glucosa sobre 10 ml de solución de fondo. Los resultados de los distintos métodos de inmovilización fueron comparados con el fin de escoger el método más adecuado de acuerdo a su sensibilidad, rango lineal, estabilidad y límite de detección. A partir de estos datos se calculó el valor experimental de la constante de Michaelis-Menten de la enzima inmovilizada según la Ecuación 1-9 y la Ecuación 1-10 y se comparó con el valor teórico que, en una solución tampón de fosfato sódico (25°C, pH 5.6) es 33 mM [159].

Tal como se comentó en la sección 3.2.2, se estudió la respuesta del sensor al depositar una membrana de difusión del polisiloxano APTMS sobre el electrodo. Se determinó el espesor de las membranas de difusión depositadas mediante perfilometría.

ELECTRODOS INTERDIGITADOS

La impedancia eléctrica se ha utilizado como herramienta para una gran variedad de procesos biológicos, siendo una de sus más recientes aplicaciones la monitorización automática en microbiología, permitiendo detectar, cuantificar e identificar cambios en el medio de estudio. En el caso de cultivos celulares provee información acerca de la variación de la conductividad con el tiempo, que puede relacionarse con cambios ocurridos en el medio de cultivo. La conductividad inicial de un medio de cultivo de neuronas, como el medio neurobasal, es del orden de 10⁻²M. Además, esta medida es sencilla ya que este tipo de electrodos no necesita la utilización de electrodos de referencia. La calibración de los IDE se realizó mediante medidas de impedancia en distintas disoluciones de KCl en un rango de concentración de 10⁻⁶M a 10⁻¹M. Se fijó una amplitud de señal de 10mV y un rango de frecuencias de 100 Hz a 10⁷ Hz y se obtuvieron los diagramas de Bode y Nyquist característicos. A partir de ellos, y conocida la conductividad de la solución, se determinó el parámetro característico de la constante de celda (k), relacionado con R_{sol} y ρ según la Ecuación 1-13. La conductividad es conocida y medida de antemano y la R_{sol} se determina del

diagrama de Nyquist. Una vez obtenida k , que es igual para todo electrodo independientemente del medio de ensayo, puede determinarse la conductividad de nuevos medios sustituyendo su valor y el de R_s en la Ecuación 1-13.

La constante de celda k fue calculada para 4 IDE idénticos, a fin de garantizar su correcta medida.

ELECTRODOS DE PSEUDO-REFERENCIA

Los electrodos de pseudo-referencia están formados por una capa de Ag/AgCl y por lo tanto son sensores selectivos a ion cloruro. En el medio neurobasal la concentración de ion cloruro es de 50 mM. No se espera que la concentración de ion cloruro cambie ya que este ion no está involucrado en ningún proceso celular [160]. Por lo tanto su potencial se puede mantener constante.

La caracterización de los electrodos de pseudo-referencia se realizó mediante técnicas potenciométricas [55, 150-152]. Ya se explicó en la Sección 3.2.4 que el electrodo de referencia de Ag/AgCl es en esencia un electrodo selectivo a iones cloruro, por lo que su potencial de respuesta varía, según la ecuación de Nernst, en función de la actividad del ion cloruro en el medio. Este hecho sirve para caracterizar la calidad de la capa de cloruro de plata fabricada.

La caracterización de la capa de Ag/AgCl formada se llevó a cabo mediante potenciometría partiendo de 25 ml de agua destilada y añadiendo volúmenes conocidos de KCl para variar la actividad del ion cloruro. Se realizaron también ensayos de la estabilidad en un periodo de 8 horas. Los datos registrados corresponden al potencial de circuito abierto.

Para verificar la validez de los electrodos de pseudo-referencia como tales, se realizaron pruebas, utilizando ISFETs de pH y de potasio como electrodos de trabajo. Para ello se mantuvo la concentración de iones cloruro constante en el medio y se varió el pH o la actividad de iones potasio. Para evaluar qué protocolo usado en la fabricación de los electrodos permitía obtener electrodos más estables para tiempos prolongados, se repitieron estos ensayos puntualmente durante 7 meses.

3.3.2 EVALUACIÓN EN MEDIOS DE CULTIVO

Una vez fabricados y caracterizados los dispositivos en medios acuosos se verificó que su señal (básicamente la estabilidad con el tiempo) no se veía afectada al medir en el medio de cultivo donde se realizan los estudios con neuronas. El medio de cultivo que utiliza habitualmente el Laboratorio de Reparación Neural del Hospital Nacional de Parapléjicos de Toledo para llevar a cabo cultivos neuronales recibe el nombre comercial de medio neurobasal (GIBCO #370-1103, GIBCO, Grand Island; NY), cuya composición se recoge en la Tabla 3-1 y que está optimizado para la supervivencia de neuronas. Este medio contiene vitaminas, ácidos grasos esenciales, hormonas y antioxidantes [161].

La evaluación para los ISFETs de pH e ion potasio consistió en registrar la señal con el tiempo durante 16 h. Para los ISFETs de pH se realizó además un estudio que consistió en sumergir los sensores en el medio neurobasal durante 1 hora, tras lo cual se realizó una calibración del sensor.

Para estudiar el efecto del medio neurobasal en los microelectrodos de oro se determinó la pasivación del área del microelectrodo durante 1 hora de exposición al medio. Para ello se sumergieron los electrodos en el medio neurobasal y se realizó una voltamperometría cíclica en $K_3Fe(CN)_6$ cada diez minutos.

Para los electrodos de pseudo-referencia fabricados se realizó un estudio de la variación de la respuesta mediante potenciometría durante 1 hora, frente a un electrodo de referencia comercial de Ag/AgCl.

Una vez evaluada la idoneidad de la respuesta de los sensores de pH e ion potasio para medir parámetros de cultivos celulares, se realizó un test preliminar. Las medidas con cultivos de neuronas se realizaron en el Laboratorio de Reparación Neural del Hospital Nacional de Parapléjicos de Toledo. Para ello se situaron los sensores de forma horizontal sobre un portaobjetos de vidrio. Para cerrar la zona donde se situaba la muestra de cultivo se diseñó una celda de silicona (PDMS) que se colocó encima del portaobjetos y se fijó mediante un adhesivo especial de silicona. Se realizaron las medidas con un ISFET de pH y uno de ion potasio (K^+) y un electrodo de referencia integrado. Una vez se colocó la muestra de cultivo de neuronas, obtenidas del córtex cerebral de embriones de ratas, se situó debajo del microscopio para observar el estado de las células marcadas previamente con un compuesto fluorescente para estudiar su viabilidad. Tras 90 minutos de registro se añadió Tritón X, causante de muerte de las células debido a la lisis celular, esperando observar variaciones en el medio extracelular debido a la liberación de moléculas. En el caso del ion potasio se espera una variación en su concentración en torno a 30 mM.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 MEDIDAS EN MEDIO ACUOSO

ISFETs DE pH E ION POTASIO

En la Figura 3-16 se muestran los calibrados de 3 ISFETs de pH en la solución A, en un rango de pH de 5.5 a 9. En la Figura 3-16 b se recogen los datos de estabilidad de dos ISFETs de pH durante un tiempo de 15 horas. En la Tabla 3-8 se muestran los datos de la pendiente, linealidad y estabilidad en el tiempo para los ISFETs de pH de la Figura 3-16. Las pendientes de los ISFETs tienen un valor de 50 mV/dec. Este valor es ligeramente menor que el obtenido para soluciones acuosas estándares debido al elevado contenido en sodio de la solución (0.07 M). Este efecto provocado por la presencia de sodio es conocido como error al calino o error del sodio, y se presenta en muestras con alto contenido de cationes monovalentes (en este caso el Na^+) debido al intercambio de otros cationes distintos al H^+ . Suele presentarse para pH por encima de 10.

Por otra parte, los ensayos realizados por triplicado para un mismo ISFET presentan una buena repetitividad. Los resultados obtenidos para distintos ISFETs también presentan una gran reproducibilidad. Tras los primeros minutos de estabilización, los valores de estabilidad en el tiempo obtenidos concuerdan con los reportados en la bibliografía para estos ISFETs [103].

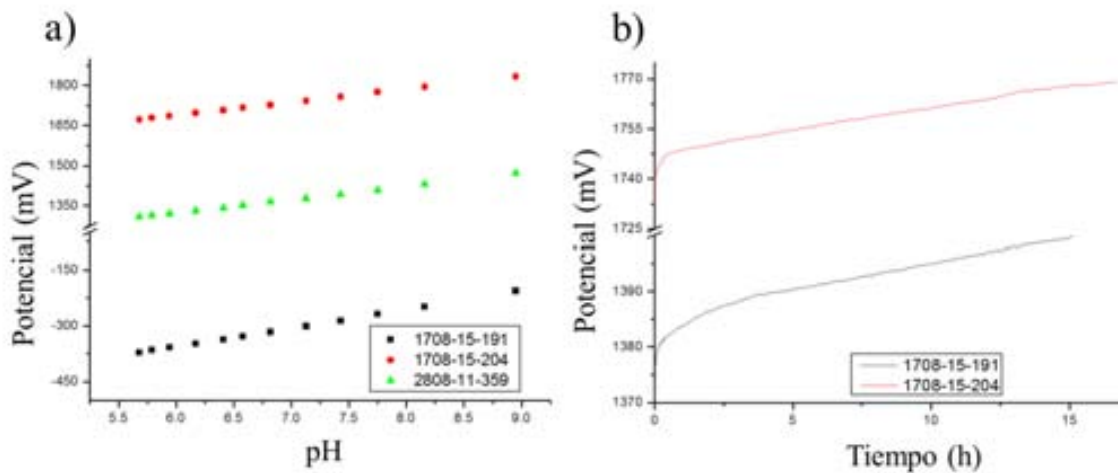


Figura 3-16. a) Curvas de calibrado para 3 ISFETs de pH. b) Registro de la estabilidad en el tiempo para 2 ISFETs de pH

Tabla 3-8. Características de respuesta de 3 ISFETs de pH, n = 3

ISFET	Pendiente [mV/pH]	R ²	Estabilidad en el tiempo (mV/h)
1708-15-191	50.43 ± 0.13	0.9999	1.1
1708-15-204	50.39 ± 0.22	0.9999	1.6
2808-11-359	50.69 ± 0.44	0.9999	1.3

En la Tabla 3-9 y en la Figura 3-17 se muestran los parámetros de respuesta de los ISFETs de potasio a los cambios de ion potasio en el medio. Los valores de la pendiente son reproducibles y repetitivos. El límite de detección medio es de 4×10^{-6} M. El valor medio de la $K_{Na,K}^{pot}$ obtenido es 5×10^{-4} , de lo que se concluye que el ion sodio no interferirá en las medidas del ion potasio en el medio extracelular. Los valores de estabilidad en el tiempo y límite de detección concuerdan con los reportados en la bibliografía [103].

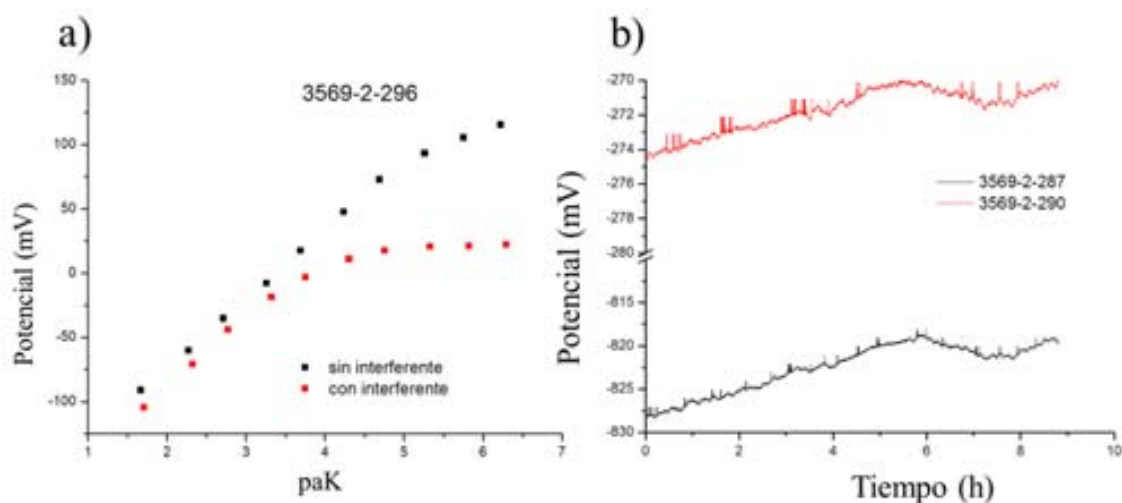


Figura 3-17. a) Calibrados de los ISFETs de potasio en función de la actividad del ion potasio, sin y con interferente (Na^+ 0.15 M). b) Estabilidad de los ISFETs en función del tiempo.

Tabla 3-9. Características de respuesta de los ISFETs con membrana selectiva a iones potasio, n = 3.

Unidad	Pendiente [mV/pa _{KCl}]	Rango de detección lineal [mol/l]	Límite de detección [mol/l]	Estabilidad en el tiempo [mV/h]
3569-2-290	54.3 ± 0.6	$2 \times 10^{-5} - 2.3 \times 10^{-2}$	3×10^{-6}	0.52
3569-2-287	53.8 ± 1.2	$2 \times 10^{-5} - 2.3 \times 10^{-2}$	4×10^{-6}	0.99
3569-2-296	55.3 ± 1.0	$2 \times 10^{-5} - 2.3 \times 10^{-2}$	5×10^{-6}	0.27

De estos resultados se puede concluir que tanto los ISFETs de pH como los de ion potasio son aptos para medir las variaciones esperadas de estos parámetros en los cultivos celulares.

SENSORES DE OXÍGENO DISUELTO

Una vez determinado el estado óptimo de la superficie de los microelectrodos de oro se procedió a evaluar estos para la detección de O_2 disuelto. En la Figura 3-18 a se muestran los voltamperogramas obtenidos a diferentes valores de concentración de O_2 en un rango de 0 ppm a 8.5 ppm de oxígeno. Se observa como el valor absoluto de la intensidad a -0.8 V va disminuyendo a medida que disminuye la concentración de O_2 en el medio. En la Figura 3-18 b se muestra la repetitividad de los calibrados para un mismo microelectrodo. Se pudieron realizar un mínimo de 3 calibrados antes de que se produjese la pasivación parcial de la superficie de oro, debido a la formación de óxidos sobre su superficie. La reproducibilidad y repetitividad de los experimentos es elevada, tal y como se muestra en la Tabla 3-10, donde puede observarse la desviación estándar de respuesta entre ensayos para un mismo electrodo y entre 3 electrodos. Los valores de límite de detección demuestran la buena sensibilidad de estos electrodos comparados con los comerciales (sonda de O_2 , Hach Lange). Aunque en los experimentos con cultivos de neuronas no se llega a concentraciones tan bajas de O_2 , permite asegurar una buena precisión en la detección de la variación del oxígeno disuelto.

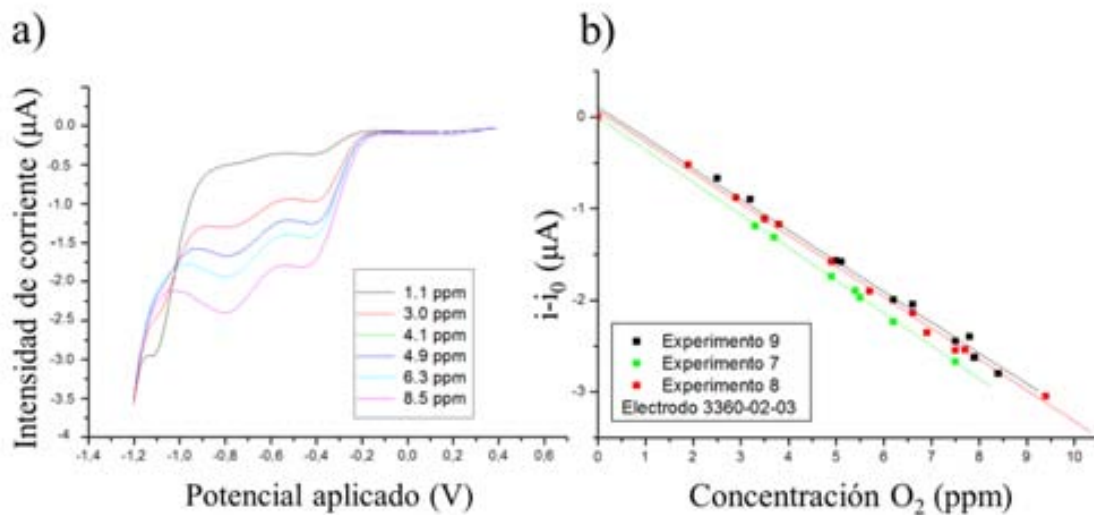


Figura 3-18. a) Respuesta Voltamperométrica lineal en función de la concentración de oxígeno disuelto. b) Rectas de calibrado Intensidad de corriente frente a Concentración de O_2 para un mismo microelectrodo.

Tabla 3-10. Características de respuesta de los microelectrodos de oro en función de la concentración de oxígeno disuelto, n = 3.

Unidad	Pendiente [$\mu\text{A/ppm}$]	Ordenada Origen [μA]	R^2	Límite de detección . (3σ) [ppm]
3360-02-01	-0.350 ± 0.001	0.056 ± 0.006	0.999	0.481
3360-02-03	-0.343 ± 0.012	0.058 ± 0.005	0.999	0.507
3360-02-05	-0.370 ± 0.037	0.050 ± 0.008	0.999	0.070

De estos resultados se puede concluir que los microelectrodos de oro son aptos para medir las variaciones de oxígeno disuelto esperadas en los cultivos celulares.

SENSORES DE GLUCOSA

Para evaluar la eficacia del sensor de glucosa se procedió a estudiar la respuesta de un electrodo de oro sin modificar, frente a cambios en la concentración de H_2O_2 , producto generado de la reacción enzimática. La Figura 3-19 a muestra los barridos de potencial entre 0 V y +0.9 V a 0.05 V/s realizados para distintas concentraciones de H_2O_2 en el medio en el rango de 0 mM a 8.7 mM. Como era de esperar, aparece un pico de oxidación a un valor de potencial próximo a +0.8 V relacionado con la oxidación del H_2O_2 . La intensidad del pico aumenta con la concentración de peróxido en el medio.

La Figura 3-19 b recoge la representación gráfica del valor de la corriente del pico frente a la concentración de H_2O_2 , valores obtenidos de los barridos de potencial. Se registra la respuesta de corriente frente a la concentración para distintos valores de potencial, con el fin de comprobar a qué valor de potencial se obtiene la mejor respuesta lineal en el rango de concentración estudiado. La mayor respuesta se obtiene a potenciales entre +0.8 V y +0.9 V. Pero a estos potenciales se da la oxidación del O_2 en el medio. Por lo tanto, a no ser que se trabaje en disoluciones desoxigenadas (que en el caso de los sensores de glucosa no se puede al ser el oxígeno un reactivo de la reacción enzimática), o que se haga una corrección de los datos teniendo en cuenta la intensidad debida a la oxidación del O_2 (lo que supondría una complejidad extra a los cálculos), no se puede trabajar a estos potenciales tan altos. Por ello se concluyó que el potencial de trabajo óptimo del microelectrodo de oro sin modificar para la detección de peróxido de hidrógeno a través de su reacción de oxidación del mismo es de +0.7 V. Este estudio se realizó con un electrodo tipo ER, utilizando el electrodo de 2.08 mm² de área.

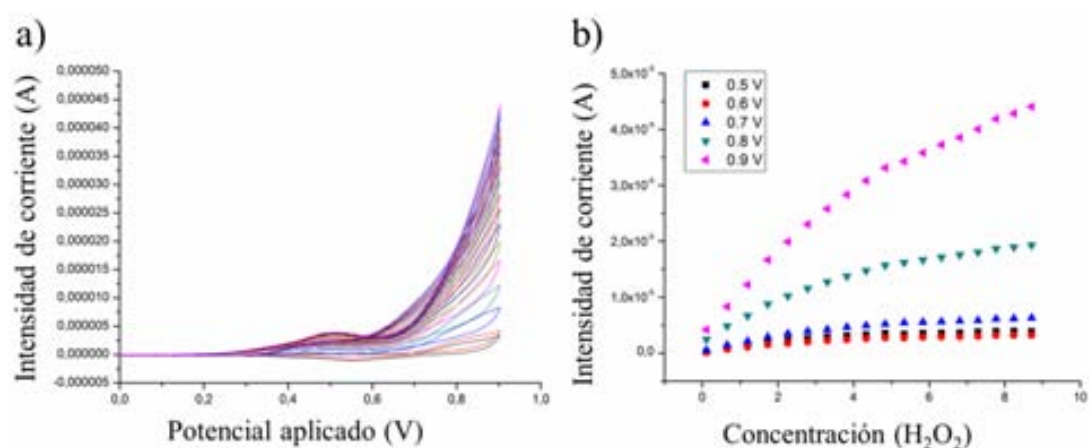


Figura 3-19. Determinación del potencial óptimo de trabajo para la medida de peróxido. a) Barridos de potencial en PBS variando la concentración de H₂O₂ en el medio. b) Intensidad de la reacción de oxidación de H₂O₂ en función de su concentración en el medio a diferentes potenciales.

Tabla 3-11. Características de respuesta de los microelectrodos de oro en función de la concentración de H₂O₂.

Potencial de trabajo	Rango Lineal [mM]	Pendiente [nA.mM ⁻¹]	R ²
+0.5 V	0.65 - 1.73	926.91	0.9996
+0.6 V	0.65 - 1.73	741.45	0.9991
+0.7 V	0.65- 2.26	1286.5	0.9976
+0.8 V	0.10- 1.73	3841.3	0.9979
+0.9 V	0.10- 2.78	7131	0.9970

Los resultados del estudio para comprobar que la velocidad de reacción enzimática correspondían al valor aportado por el fabricante se recogen en la Figura 3-20. En ésta figura se muestra el registro de la señal cronamperométrica a +0.7 V de un electrodo de oro sin modificar. A la disolución inicial de 50 mM glucosa se añadieron 50 U de GOD a los 55 s. Del salto en la intensidad de la señal $\Delta I = 6.92 \times 10^{-8}$ A y del valor de la pendiente de calibrado de H₂O₂, 2×10^{-5} A.mM⁻¹, se obtuvo el valor experimental de la reacción enzimática 0.109 mM.min⁻¹. Se corrobora que la velocidad de reacción enzimática corresponde con la teórica, que es de 0.1 mM.min⁻¹ para 50 U de GOD.

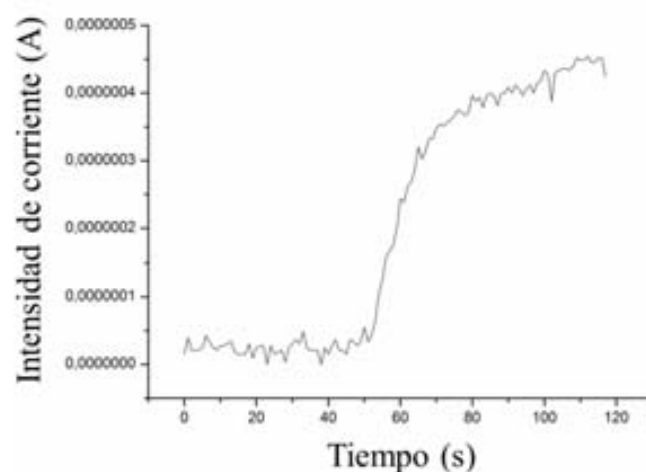


Figura 3-20. Cronoamperometría para determinación de la actividad GOD en disolución.

Para realizar la inmovilización de la GOD, el primer paso consiste en depositar una monocapa de DTSP, con grupo tiolado bifuncional que permite la unión a la enzima a través de enlaces covalentes por un extremo y por otro extremo a la superficie del electrodo.

En la Figura 3-21 puede observarse el barrido de potencial lineal obtenido durante la desorción de una monocapa de DTSP sobre un electrodo de oro tipo SER (área de 0.0016 cm^2). En la curva registrada pueden apreciarse dos picos de desorción a -0.66 V y -0.9 V , con una suma de las áreas integradas de $5.04 \times 10^{-7} \text{ C}$, valor en concordancia con los resultados publicados [47]. El valor teórico de la concentración superficial ($\Gamma_{\text{teórica}}$) para una monocapa densamente empaquetada de alcanotioles sobre oro policristalino es $4.5 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$. El valor experimental, calculado a través de la Ecuación 3-5 y del valor del área integrada, resultó ser $3.22 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$, lo que corresponde a una cobertura de la superficie total del electrodo del 71.5 %, en concordancia con la bibliografía [47, 162].

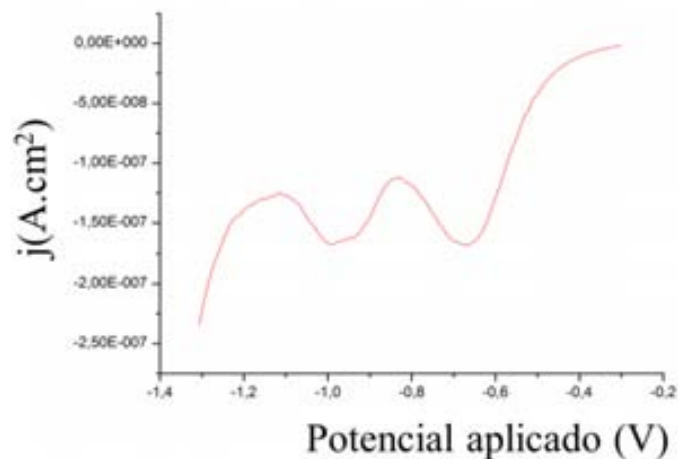


Figura 3-21. Voltametría lineal correspondiente a la desorción reductiva de una SAM de DTSP en un microelectrodo de oro.

Una vez estudiado el comportamiento de los electrodos de oro sin modificar y modificados con la monocapa de tiol, se procedió a evaluar los distintos sensores modificados con una membrana de GOD.

La Figura 3-22 recoge los resultados de los ensayos de cronoamperometría para los biosensores de glucosa fabricados por adsorción física, electroadsorción y enlace covalente. La Tabla 3-12 muestra un resumen detallado de los parámetros más interesantes a tener en cuenta cuando se habla de un biosensor: 1) rango lineal de respuesta, que es igual para todos los métodos de inmovilización; 2) sensibilidad (pendiente), que es significativamente superior para el caso de electroadsorción; 3) límite de detección, que es mejor para el método de electroadsorción; y 4) coeficiente de regresión, que es mayor de 0.99 para los tres casos.

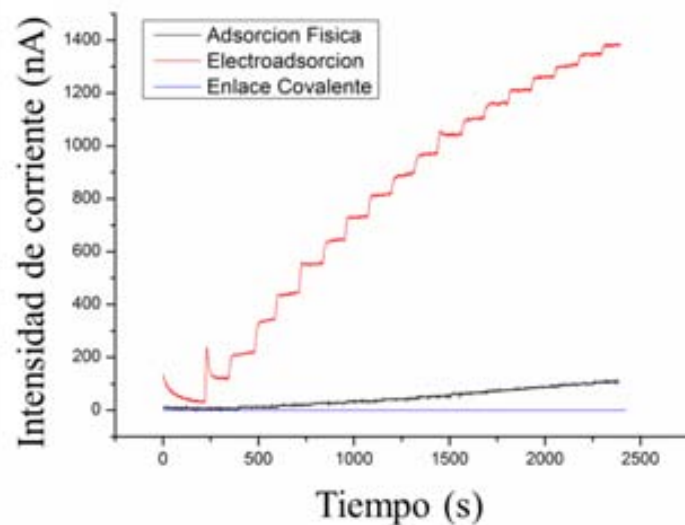


Figura 3-22. Respuesta cronoamperométrica para distintas concentraciones de glucosa en el medio en función del método de inmovilización de la enzima.

Tabla 3-12. Características de respuesta de los sensores de glucosa en función del método de inmovilización.

Método de Inmovilización	N	Área [mm ²]	Rango lineal [mM]	Límite de detección [mM]	Pendiente [nA.mM ⁻¹]	Pendiente relativa al área [nA.mM ⁻¹ cm ⁻²]	Ordenada origen. [nA]	R ²
Adsorción Física	5	4,5	0,2 – 2	0.17	29,27 ± 11,85	652,67	13,96 ± 12,80	0,995
Electroadsorción	6	4,5	0,2 – 2	0.15	588,48 ± 490,15	13077,33	38,70 ± 31,92	0,995
Enlace Covalente	3	1,62	0,2 – 2	0.18	1,22 ± 0,33	75,31	5,09 ± 6,83	0,998

Con los datos de las curvas de calibrado para electrodos modificados por electroadsorción se calcularon los valores de K'_m y de i_m (proporcional a V_m) mediante la ecuación de Lineweaver-Burk (Ecuación 1-9). Para ello se representó $1/i_{ss}$ frente a la inversa de la concentración de la glucosa en el medio. Del valor de la ordenada en el origen se obtuvo i_m y con el valor de la pendiente K'_m . Estos valores se compararon con los teóricos a partir de la Ecuación 1-9 y de la Ecuación 1-10, tal como se recoge en la Tabla 3-13. La similitud entre valores experimentales y

teóricos e s manifiesta, por lo que podemos concluir que se sigue una cinética característica de Michaelis-Menten.

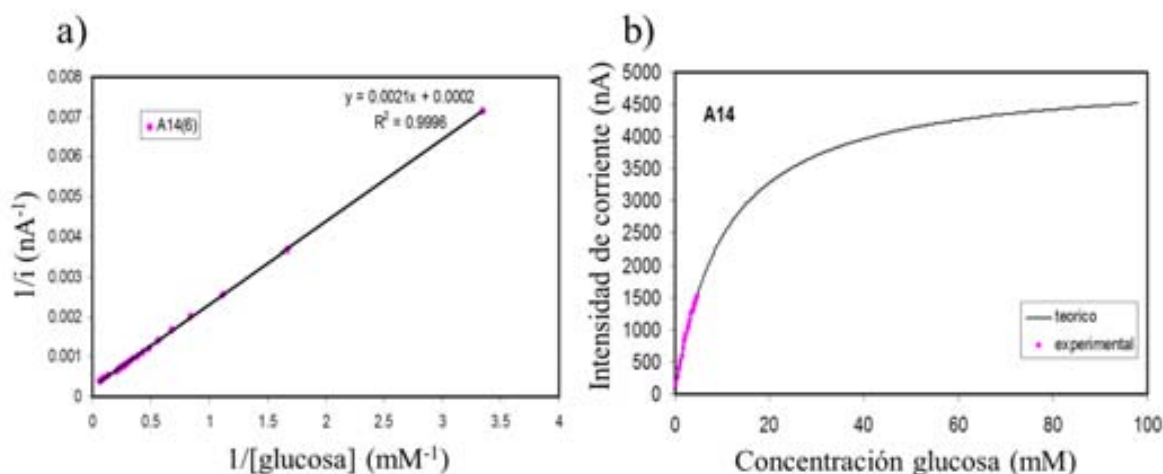


Figura 3-23. a) Representación de Lineweaver-Burk para un electrodo modificado mediante electroadsorción. b) Representación de los valores experimentales de la calibración de los electrodos y de los valores teóricos sustituyendo en la ecuación de Michaelis-Menten

Tabla 3-13. Valores comparativos obtenidos experimentalmente y a partir de la ecuación de Michaelis-Menten para tres electrodos modificados mediante electrodeposición, de 0.45 cm² de área.

		Experimental	Lineweaver-Burk		Michaelis-Menten
	Rango lineal [mM]	Sensibilidad glucosa en zona lineal [nA.mM ⁻¹]	im [nA]	k'm [mM]	Pendiente en zona lineal [nA.mM ⁻¹]
A14	0.30 – 2.63	350.47	5000	10.5	353.4
A15	0.30 – 2.91	882.34	25000	27.5	604.99
A16	0.30 – 3.19	334.25	5000	12	303.01

Como se explicó en la sección 3.2.2 para medir la glucosa en cultivos celulares se requiere tener un rango lineal mayor que el obtenido en los sensores de glucosa convencionales. Para ello, en este trabajo se planteó la deposición de una capa de siloxano que actúa como limitante de la difusión. La Figura 3-24 muestra la curva de calibrado de intensidad frente a concentración de GOD en el medio para el electrodo modificado por electroadsorción antes y de después de depositar una membrana de difusión de APTMS. Los parámetros característicos a tener en cuenta para evaluar la repercusión de usar la membrana se recogen en la Tabla 3-14. Tal como se esperaba, el rango lineal se ha extendido con la membrana de difusión (el límite superior pasa de 3.47mM a 8.67mM de glucosa), a expensas de la sensibilidad, que ha disminuido más de 3 veces.

El proceso de deposición de la capa de APTMS es compatible con la enzima ya inmovilizada, ya que no se requiere del uso de disolvente durante la inmovilización de la membrana. Además es un proceso que, al no necesitar acceso eléctrico a cada chip durante la formación de la membrana, puede realizarse a nivel de oblea.

En la Figura 3-25 se muestra el registro del grosor por perfilometría de la membrana de difusión, ya depositada sobre los electrodos modificados.

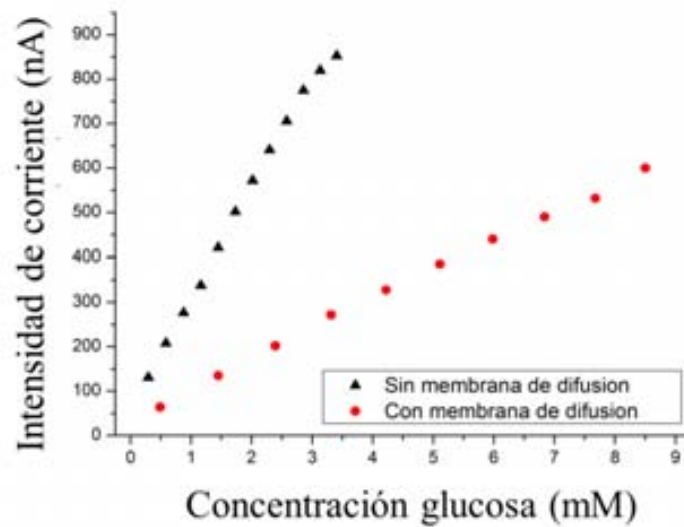


Figura 3-24. Respuesta amperométrica de un sensor de glucosa a) sin capa de difusión y b) con capa de difusión de APTMS.

Tabla 3-14. Característica de respuesta de un sensor de glucosa de 0.045 cm² modificado mediante electroadsorción antes y después de depositar la capa de difusión.

	Rango lineal [mM]	Pendiente [nA. mM ⁻¹ .cm ⁻²]	R ²
Sin membrana de difusión	0.29 – 3.47	241.2	0.9955
Con membrana de difusión	0.29 – 8.67	65.5	0.9977

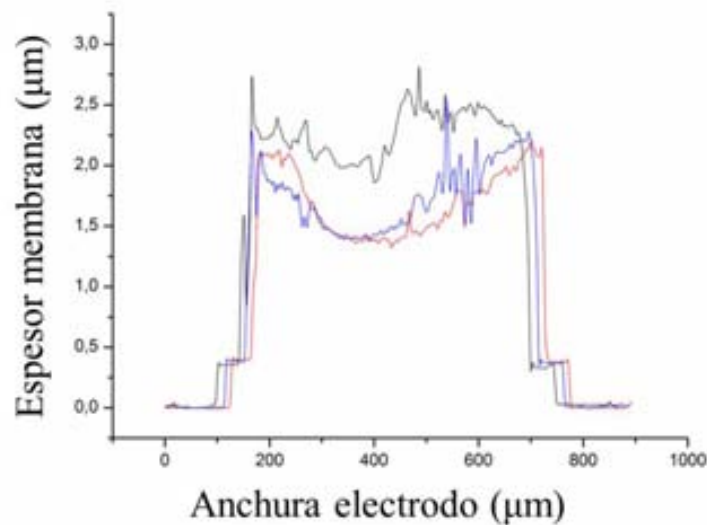


Figura 3-25. Perfilometría de la membrana de difusión de APTMS depositada sobre el electrodo

Los resultados obtenidos demuestran que el método de deposición de la enzima sobre la superficie del electrodo basado en electroadsorción es el que permite obtener unos biosensores más adecuados para la medida de glucosa, ya que se obtiene la mayor sensibilidad. El inconveniente que presenta este método es la dificultad de preparar biosensores reproducibles siguiendo el mismo protocolo. La deposición de la membrana de difusión de polisiloxano consigue alargar el rango lineal de la respuesta de los sensores, pero continúa siendo insuficiente para su aplicación en cultivos celulares, donde se tienen concentraciones de glucosa superiores a 10 mM. Además, la deposición de esta membrana no consigue que se obtenga un control del biosensor por difusión, el control sigue siendo enzimático.

Como posibles soluciones a la problemática encontrada en la construcción de los biosensores para glucosa se pueden seguir las siguientes estrategias: 1) aumentar todavía más el rango lineal de respuesta probando con nuevas metodologías de inmovilización de membranas de difusión o probando con nuevos materiales para construir la membrana; 2) integrar el electrodo en un sistema microfluídico que permita controlar la difusión del analito (glucosa) hacia la superficie del sensor.

ELECTRODOS INTERDIGITADOS

La Figura 3-26 recoge los resultados de los diagramas de Nyquist y Bode obtenidos para un IDE en una solución acuosa con una concentración de KCl entre 10^{-1} M y 10^{-6} M. Los resultados siguen a tendencia esperada. En la Figura 3-26 puede observarse en color negro la línea de respuesta característica del agua desionizada y las curvas de impedancia con un desplazamiento creciente hacia frecuencias mayores a menores conductividades de la solución (menos concentración de KCl). Del diagrama de Bode se obtienen los valores de R_{sol} para las distintas frecuencias. Como se observa, existe un rango de frecuencias en el que el valor de Z presenta una variación mucho menor para las distintas conductividades. Esta zona es la adecuada para realizar la medida de conductividad. Si se ajusta a un circuito equivalente –como el indicado en la Sección 1.1.3- se encuentran los valores de la resistencia de la solución (R_{sol}). Representando este valor frente al de la resistividad (inversa de la conductividad), se obtiene la Figura 3-26 c para 4 IDE idénticos en un rango de conductividades entre 10 y 1000 μScm^{-1} . Del valor de la pendiente se obtiene la constante de celda k , característica del electrodo que usamos. Puede observarse una gran reproducibilidad de la constante de celda ($0.03 \pm 0.01 \text{ cm}^{-1}$).

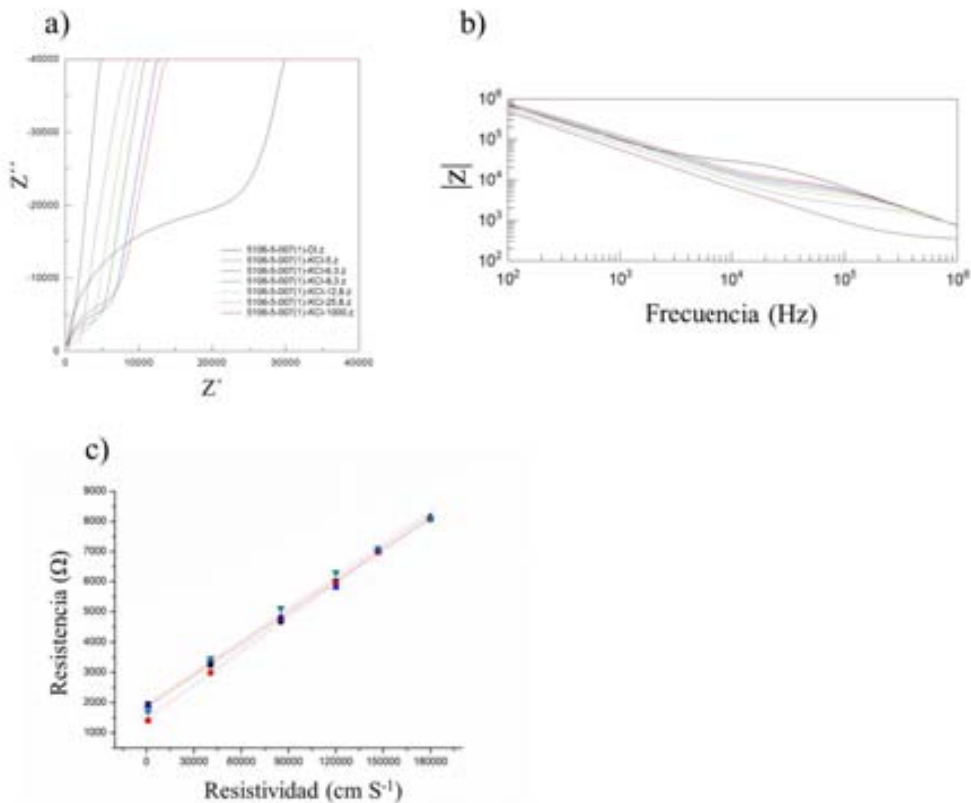


Figura 3-26. Diagramas de Nyquist (a) y Bode (b) para un IDE en medios de distinta conductividad. c) Representación de la resistencia de la solución frente a la resistividad para 4 IDE idénticos.

De estos resultados y de los obtenidos en el grupo con los IDEs se puede deducir que estos dispositivos son muy estables y reproducibles y aptos para la medida de conductividad en soluciones acuosas.

ELECTRODOS DE PSEUDO-REFERENCIA

La evaluación de la respuesta de los electrodos de pseudo-referencia frente a cambios de ion cloruro en el medio se muestra en la Figura 3-27 a) representa la curva de calibrado obtenida de los ensayos en circuito abierto para 3 electrodos (F13, F15 y F17), realizados en un medio acuoso con crecientes concentraciones de KCl. La Tabla 3-15 recoge los valores de los parámetros característicos del ajuste lineal de potencial frente a pCl para 6 electrodos (F1, F2, F9, F13, F15 y F17) medidos por triplicado. Como puede observarse, los valores de la pendiente oscilan entre 55 y 59 mV/dec, ajustándose a un comportamiento nerstiano y demostrando una buena calidad de las capas depositadas. Estos valores demuestran que los electrodos son sensibles a la concentración de cloruros en el medio, como era esperado, siendo necesario por tanto una concentración constante del ion Cl^- en el medio para poder aplicar estos sensores como electrodos de pseudo-referencia.

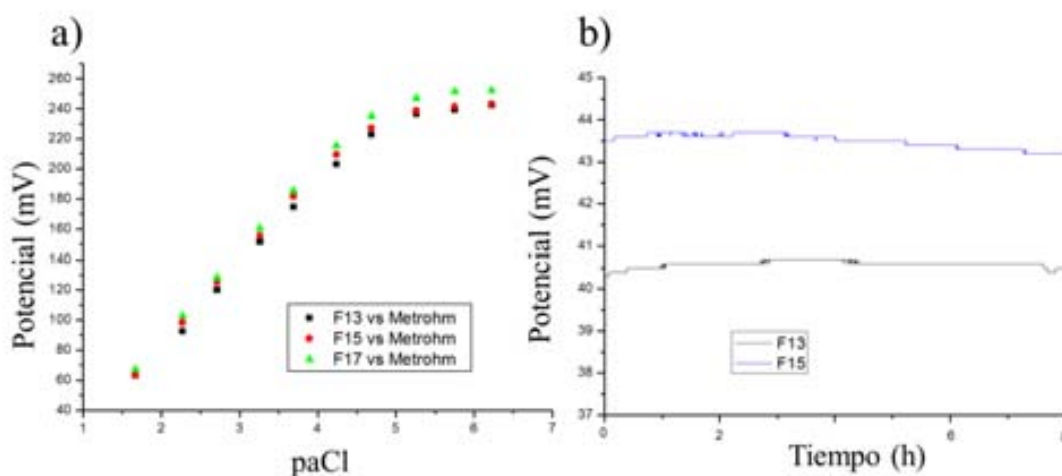


Figura 3-27. a) Respuesta de los electrodos de Ag/AgCl a variaciones de la actividad ion cloruro. b) Estabilidad de los electrodos de pseudo-referencia integrados con el tiempo

Tabla 3-15. Características de respuesta de 6-electrodos de pseudo-referencia fabricados mediante cronoamperometría, frente a cambios de la actividad de iones cloruro en el medio, n = 3.

	Pte [mV/paCl]	O.O. [mV]	R2	LOD
F1	55.47 ± 3.09	-27.17 ± 6.3	0.9983	4.34 ± 0.38
F2	58.07 ± 1.35	-32.97 ± 1.40	0.9993	4.70 ± 0.10
F9	56.73 ± 2.61	-28.97 ± 5.84	0.9984	4.49 ± 0.33
F13	56.70 ± 1.06	-32.77 ± 2.40	0.9995	4.74 ± 0.08
F15	57.93 ± 0.47	-32.30 ± 2.68	0.9998	4.56 ± 0.12
F17	58.47 ± 0.15	-31.23 ± 2.39	0.9996	4.68 ± 0.18

La Figura 3-27 b muestra la estabilidad de dos electrodos de referencia durante 8 horas sumergidos en una solución acuosa, mostrando que no hay cambios de potencial durante todo el período del ensayo. [55, 150].

Uno de los objetivos de este trabajo era reducir el tamaño del electrodo de referencia que acompaña un ISFET. En la Figura 3-28 a se muestra la caracterización de dos ISFETs frente al pseudo-electrodo de referencia F13. Los valores de la pendiente (Tabla 3-16) en torno a 50 mV/pH son similares a los valores obtenidos para los mismo electrodos utilizando un electrodo de referencia comercial (Tabla 3-8). En la Figura 3-28 b se muestra la caracterización de dos ISFETs de potasio frente al electrodo de pseudo-referencia F13. Los valores de la pendiente (Tabla 3-17) en torno a 54 mV/paCl son similares a los valores obtenidos para los mismo electrodos utilizando un electrodo de referencia comercial (Tabla 3-9).

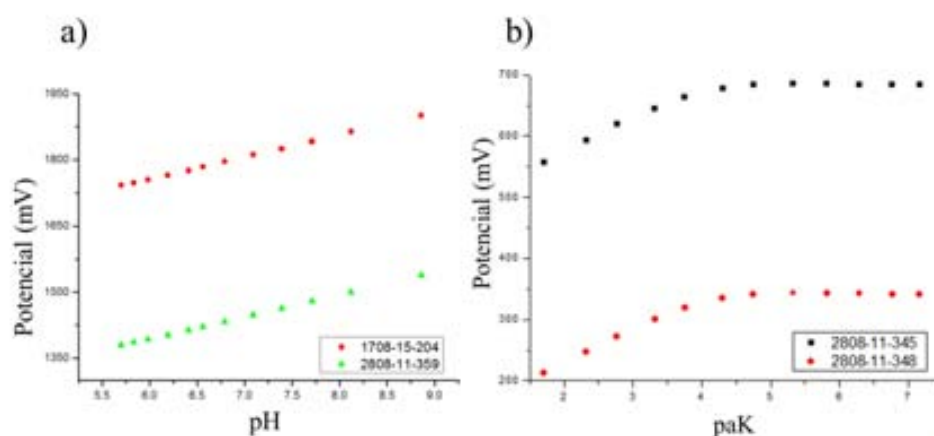


Figura 3-28. Calibrado para a) dos ISFETs de pH y b) para dos ISFETs de potasio, utilizando el electrodo de pseudo-referencia F13.

Tabla 3-16. Características de respuesta de tres ISFETs de pH con el electrodo de pseudo-referencia F13, n = 3.

Unidad	Pte [mV/pH]	R ²
1708-15-191	50.0 ± 0.2	0.9999
1708-15-204	50.1 ± 0.4	0.9999
2808-11-359	50.2 ± 0.0	0.9999

Tabla 3-17. Características de respuesta de 3 ISFETs de potasio con el electrodo de pseudo- referencia F13.

Unidad	Pendiente [mV/pa _K]	Límite de detección [mol/l]
3569-2-290	54.30	1x10 ⁻⁴
3569-2-287	53.40	4x10 ⁻⁵
3569-2-296	54.36	5x10 ⁻⁵

La evaluación para determinar que protocolo de fabricación de los electrodos de pseudo-referencia resultaba electrodos más estables para tiempos prolongados permitió concluir que la metodología de formación de capas Ag/AgCl más adecuada es la CPG, ya que 7 meses después de haberse fabricado seguían dando respuestas similares al caracterizarlos, no así para el protocolo de CA.

3.4.2 MEDIDAS EN MEDIOS DE CULTIVO

Una vez comprobada la idoneidad de los dispositivos desarrollados para medir las variaciones de los parámetros deseados en los medio de cultivo se verificó que su señal (básicamente la estabilidad con el tiempo) no se veía afectada al medir en el medio neurobasal, donde se realizan los estudios con células.

En la

Figura 3-29 a se muestra la respuesta de dos ISFETs de pH, durante 16 horas en el medio neurobasal. Los ISFETs presentaban una variación de potencial con el tiempo o deriva de unos 4-5 mV/h. Se midió el pH al inicio y al final de este estudio y se observó que la variación era de casi una década de pH (pH inicial 7.7; pH final 8.7). Esta variación se debe al hecho de que la solución neurobasal tiene una concentración de ion bicarbonato (HCO₃⁻) elevada para mantener las células vivas. Esta solución se enriquece con tampón bicarbonato con lo que la concentración de dióxido de carbono (CO₂) es de un 5% mientras la concentración ambiental es de aproximadamente 0.2%. En contacto con la atmósfera, la solución se equilibra con esta y pierde HCO₃⁻ (en forma de CO₂) con lo cual el pH aumenta. Si realizamos una corrección de la variación de la señal de los ISFETs considerando este aumento del pH (aumento del potencial) obtenemos que el valor de la deriva esta

entre 1-2 mV/h. Este valor nos indica que la estabilidad de los ISFETS en el medio neurobasal está dentro de lo esperado (los ISFETs en medio acuoso tienen una deriva de 1 mV/h).

La Figura 3-29 b recoge la respuesta para un ISFET de potasio durante 16 horas en el medio neurobasal. Durante los primeros 160 min la variación de la respuesta es de -9 mV/h y a partir de entonces se reduce considerablemente hasta -0,2 mV/h. Estos valores nos indican que la membrana se ve inicialmente afectada por la matriz de la solución y que se llega a un equilibrio al cabo de varias horas. Por tanto, a la hora de hacer cualquier ensayo será suficiente con hacer un acondicionamiento del ISFET, sumergiéndolo durante 3 horas en el medio de estudio.

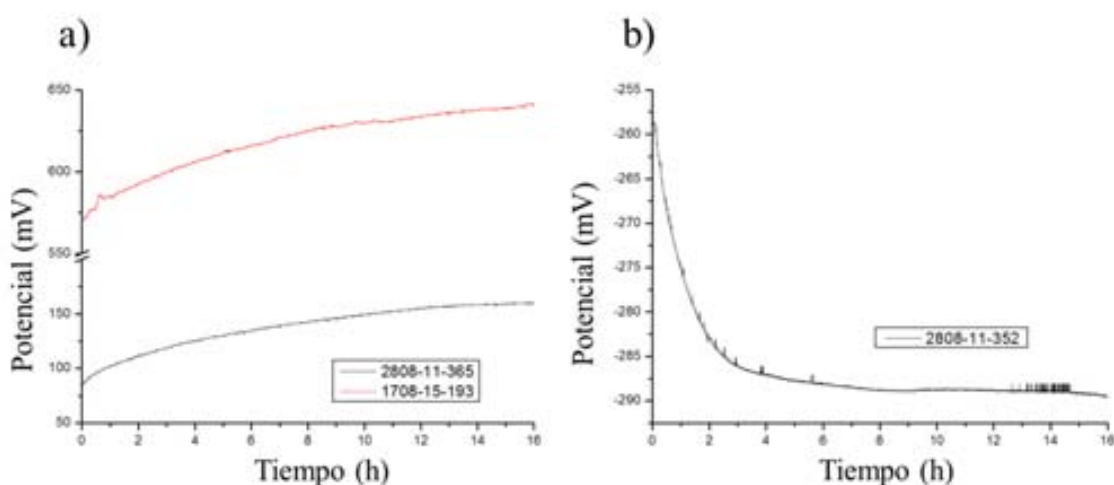


Figura 3-29. Registro de la señal de los ISFETs con el tiempo en el medio neurobasal a) dos sensores de pH y b) un sensor de potasio.

En la Figura 3-30a se muestran las rectas de calibración para un ISFET antes y después de la exposición, durante 1 hora al medio neurobasal. El valor de la pendiente, de 49 mV/dec, no se vio influenciado por la exposición al medio, confirmando que las características de respuesta de los ISFETs de pH no se ven afectadas por el medio neurobasal.

En la Figura 3-30 b se muestran los resultados del estudio del efecto del medio de cultivo en la superficie de los microelectrodos de oro. Se observa como la intensidad de los picos de oxidación-reducción del hierro sufren solo una ligera variación entre ensayos, llegándose a la conclusión de que el medio de cultivo no afecta a la respuesta de los microelectrodos de oro. Este experimento se realizó para varios microelectrodos no observándose diferencias significativas en su comportamiento.

La Figura 3-30 c muestra el registro de la respuesta de dos electrodos de pseudo-referencia a lo largo de 1 hora. Las variaciones son de -1 y 0.5 mV/h para las unidades F15 y F13, respectivamente. Esta variación aunque ligeramente mayor que la obtenida en un medio acuoso

puede concluirse que el medio no interfiere excesivamente en la respuesta de los electrodos de pseudo-referencia.

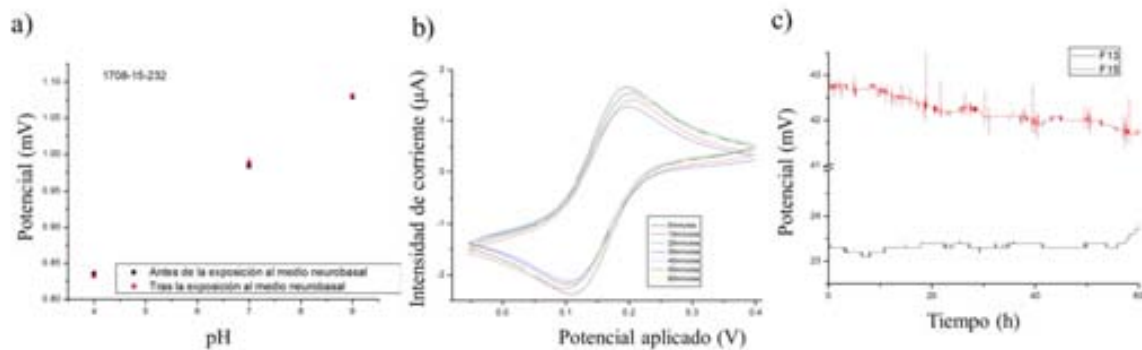


Figura 3-30. a) Rectas de calibrado para un ISFET de pH antes y después de ser expuesto al medio neurobasal. b) Voltamperogramas cíclicos en $K_3Fe(CN)_6$, durante 1 hora de exposición al medio neurobasal, registrados cada 10 minutos. c) Potencial medido con el tiempo para dos electrodos de pseudo-referencia en el medio neurobasal.

Una vez se comprobó la estabilidad de los sensores en el medio neurobasal, se realizó un experimento en un medio de cultivo en el Laboratorio de Reparación Neural del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo. En la Figura 3-31 a se muestra la celda de medida experimental utilizada para la medida del cultivo neuronal con un ISFET de pH, un ISFET de potasio, un electrodo de O_2 y un electrodo de pseudo-referencia. En la Figura 3-31 b se observa el detalle de la puerta del ISFET de pH y un conjunto de células neuronales situado cerca de esta.

En la Figura 3-31 c se muestran el resultado obtenido para el ensayo realizado en un cultivo de neuronas. Durante el experimento se registró la variación de pH durante 90 min y se añadió una solución al 1% de Tritón X en el minuto 45. Se observó una disminución de la señal los primeros 58 minutos. Realizando las correcciones adecuadas de la estabilidad en el tiempo del ISFET obtenida en el medio neurobasal (considerando la descarbonatación del medio en equilibrio con la atmósfera, y por lo tanto el aumento del pH), en este tiempo se estimó una disminución de pH de -0,72 unidades de pH. Esta variación se podría atribuir a la acidificación del medio debido a la respiración de las células [115-117]. La adición de Tritón que causa la muerte de las células debido a la lisis celular, se reflejó en una clara variación de la tendencia de la señal, siendo entonces la variación de pH registrada de -0,23 hasta el minuto 93 cuando se terminó de registrar la señal.

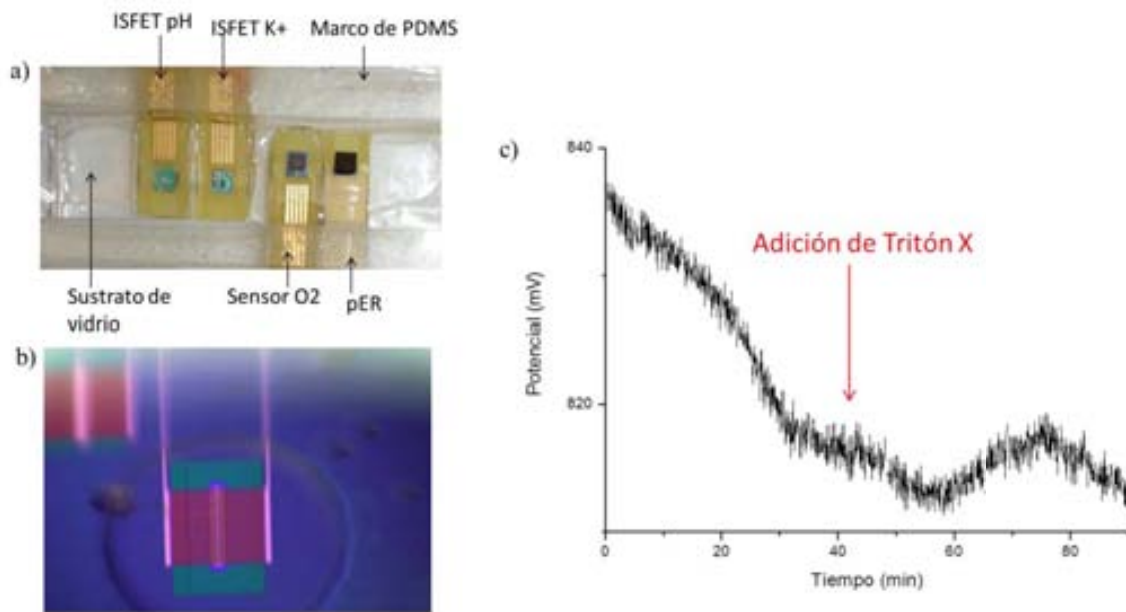


Figura 3-31. a) Imagen de la celda de medida fabricada en PDMS con los electrodos localizados en el fondo de la misma b) Imagen de la puerta del ISFET de pH con un conjunto de células neuronales. c) Registro de la respuesta del ISFET de pH en un cultivo de neuronas.

En este estudio se vio que la celda de medida utilizada tenía varios inconvenientes. En primer lugar era difícil la evaluación simultánea con microscopía confocal, ya que los electrodos, sobre los que estaban cultivadas las células, son opacos e imposibilitaban la medida. La esterilización de los electrodos no fue todo lo exhaustiva que se necesitaba para estar en contacto con las células, ya que se requería de su autoclave a 100 °C, y el material encapsulante de los electrodos no resiste a estas temperaturas. Fue imposible realizar las medidas en condiciones de ambiente controlado, ya que la necesidad de tener acceso eléctrico a los electrodos imposibilita su introducción en una incubadora. Las medidas con los ISFETs de potasio no fueron posibles debido a la formación de burbujas de aire en el cultivo por el carácter jabonoso del tensioactivo Tritón X, que aislaban eléctricamente la puerta del ISFET. La introducción de objetos extraños en el cultivo, como los electrodos, genera una incertidumbre sobre la influencia que puedan tener en la actividad de las células.

3.5 CONCLUSIONES

Estos experimentos, aunque muy preliminares, demuestran que si bien los sensores fabricados y evaluados son electroquímicamente factibles para monitorizar parámetros químicos en medios biológicos, su configuración no es la adecuada para ser utilizados en cultivos. Su diseño, en forma de tiras individuales los hace incompatibles con los equipos utilizados en biología (microscopio, incubadora, autoclave). Además la deposición del cultivo encima de los electrodos no es viable ya que las células pueden bloquear los sensores. Otro aspecto importante a considerar es la calibración de los sensores, imposible cuando se miden directamente en el cultivo.

Estas conclusiones, unidas a las ya realizadas durante la fabricación y evaluación de los sensores de glucosa, establecen unas directrices a seguir para conseguir un sistema de sensores para medidas de cultivos celulares. 1) El desarrollo de una tecnología de integración de los sensores en un mismo sustrato, que permita fabricar un dispositivo multiparamétrico en el mínimo espacio posible. 2) El desarrollo de una tecnología de integración de los microsensores y un sistema microfluídico que permita dirigir el medio extracelular hacia una celda de medida y se evite así el contacto directo entre los electrodos y las células. La utilización de un mínimo volumen de muestra es necesaria para garantizar la integridad del cultivo durante toda la experimentación. Este sistema microfluídico debe permitir el acceso directo a los electrodos durante los experimentos, para poder realizar tareas de acondicionamiento, limpieza y calibración para garantizar las características analíticas del sistema. El sistema debe ser automático y compacto para poder ser utilizado junto con otro instrumental (microscopio) o dentro de incubadoras.

En el Capítulo 4 de esta tesis se desarrolla una tecnología de integración de chips de silicio y estructuras microfluídicas con el objetivo de fabricar, como se presenta en el Capítulo 5, un sistema de monitorización electroquímica de cultivos celulares.

4 TECNOLOGÍA DE INTEGRACIÓN DE ICs Y MICROFLUÍDICA

En este capítulo se describe el desarrollo y caracterización de una nueva tecnología de encapsulado de circuitos integrados, que permite la definición de las áreas del chip expuestas a los fluidos; el pegado de estructuras microfluídicas de gran área sobre uno o más chips de silicio; y asegura unas aperturas mucho menos profundas que las tecnologías previas, minimizando la perturbación del flujo laminar sobre el área expuesta de los chips. Paralelamente se ha desarrollado un proceso de pegado irreversible a baja temperatura de estructuras microfluídicas al material encapsulado. En la Figura 4-1 se muestra un dibujo esquemático del sistema ensamblado. El trabajo desarrollado en este capítulo fue publicado en 2012 en la revista *Journal of Micromechanics and Microengineering* [163].

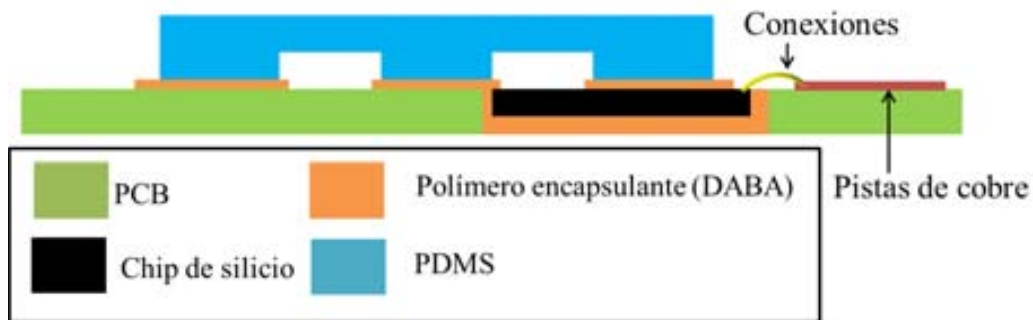


Figura 4-1. Diagrama (no a escala) de la sección transversal de la integración de estructuras microfluídicas con chips de silicio. Aperturas definidas mediante fotolitografía sobre la delgada capa de polímero encapsulante que permiten la exposición del área sensible del chip de silicio al fluido.

4.1 REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN

REACTIVOS Y DISOLUCIONES

Todos los reactivos utilizados, tanto en la preparación de los sensores como en su evaluación son de calidad “para análisis” o similar. Los reactivos generales fueron de las casas Fluka, Sigma-Aldrich y Panreac. Las soluciones acuosas usadas en este trabajo se prepararon con agua desionizada (18 M Ω cm).

Para proteger la soldadura de las conexiones se usó la silicona 3140 RTV de curado a temperatura ambiente (Dow Corning Corporation).

Para fabricar las estructuras microfluídicas se usó una mezcla del elastómero Sylgard 184 (PDMS) y agente entrecruzante (Dow Corning Corporation), en un ratio en peso 10:1. Para unir químicamente la estructura microfluídica y el polímero encapsulante se modificó la superficie de PDMS con una solución al 5 % v/v de 3- Aminopropyl) trimethoxysilane (APTMS) en etanol absoluto (EtOH) ligeramente acidificado con HAc 16 mM. Se realizó un tratamiento del molde fabricado consistente en una silanización en fase gas con 1H, 1H, 1H, 2H, 2H-Perflurooctyltriethoxysilane (PFOTS), (ABCR GmbH & Co.) durante toda una noche.

Para llevar a cabo ensayos de fugas dentro del sistema microfluídico pegado se utilizaron tintas alimenticias comerciales de diferentes colores.

Para las medidas impedimétricas, se usó agua desionizada para cambiar la conductividad, de 0.8 μ Scm⁻¹ to 101.6 μ Scm⁻¹, de una solución stock de KCl Para las medidas de pH, se usó una disolución de KOH 0.01 M para cambiar el pH, de 2 a 12, de una solución salina tamponada (40 mM ácido fosfórico, HAc and ácido bórico)

INSTRUMENTACIÓN

Para la deposición de capas delgadas de DABA se utilizó un Spinner POLOS MCD TFM indeck, con portamuestras de hasta 1cm² u obleas de hasta 6”. Para la encapsulación de los chips se usó una Alineadora de contacto Süss MA1006 con resolución de 2 μ m. Para la determinación del espesor de capa de polímero encapsulante DABA se usó un perfilómetro KLA-Tencor P15 con cabezal de baja fuerza.

Para la fabricación de los moldes a replicar en PDMS se usó un plotter de corte CAMM-1 Servo GX-24 (Roland DG Corporation), en las siguientes condiciones de trabajo: Velocidad de corte: 1 cm.s⁻¹; Fuerza: 50

La activación de la superficie de PDMS se realizó con un equipo de plasma de oxígeno PR Asher Tepla 300E.

La composición de las superficies de PDMS y de DABA se estudió mediante espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier en reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) con un equipo Bruker Tensor 27 equipado con un sistema MKII golden gate single reflection ATR; y mediante medidas de ángulo de contacto, OCA, con un equipo Easy drop y un software de análisis DS1 (Krüs GmbH).

Se usó una bomba de jeringa Nemesis (Cetoni) asistida por ordenador para el control de los fluidos dentro del sistema, tanto para los experimentos de caracterización del pegado entre las superficies de DABA y PDMS, como en los experimentos de la caracterización electroquímica del sistema.

Se usó un sensor de presión MPX5700 (Freescale Semiconductor Inc) para monitorizar la presión aplicada en el canal durante los experimentos de fugas.

Para las medidas de impedancia de los IDE se usó un potencióstato/galvanostato tipo III μ -Autolab (módulo FRA32M en modo analizador de impedancias) a una frecuencia de 316 kHz. Las curvas eléctricas características de puerta del ISFET se midieron con un Analizador de parámetros semiconductores HP4155 (Agilent Technologies).

Para la caracterización del ISFET se usó un electrodo de referencia Ag/AgCl en una celda de flujo continuo conectada a la salida del canal microfluídico del sistema.

4.2 TECNOLOGÍA DE INTEGRACIÓN DE SENSORES Y MICROFLUÍDICA

A modo de demostrador de la tecnología de integración se fabricó un prototipo de 5 cm × 6 cm que incluye una estructura microfluídica y dos chips de detección electroquímica encapsulados en una PCB, que permite la detección simultánea de pH y conductividad de pequeños volúmenes de muestra, así como su pre-tratamiento.

ESTRUCTURA MICROFLUÍDICA

Mediante la técnica de moldeo en PDMS, se fabricó un canal en serpentin, que contiene una estructura mezclador, con dos entradas y una salida y un volumen total de 3.5 μl (500 μm ancho, 60 μm alto and 115 mm largo). Para ello los dos componentes del kit comercial Sylgard 184 fueron mezclados en un radio 10:1 en peso y desgasificados en una cámara de vacío para eliminar toda burbuja de aire de la mezcla. El prepolímero fue vertido sobre el molde y se dejó polimerizar a 65 °C durante 1 h.

El máster se fabricó mediante un prototipaje rápido de un film de PSA (*pressure sensitive adhesive*, Scotch tape, 3M) adherido sobre una oblea de silicio de 6'' sobre el que se cortó un patrón con la estructura a replicar con un plotter de corte [164]. Previamente a depositar el film de PSA se ha de limpiar la oblea con isopropanol para eliminar cualquier resto de suciedad que pueda distorsionar las dimensiones finales de la estructura. Una vez se han realizados los cortes con los motivos, y previamente a la eliminación de las partes de PSA no deseadas, se realiza un tratamiento térmico del máster a 80°C durante 30 minutos para favorecer la adhesión del film a la oblea y su integridad durante sucesivos procesos de réplica. En la Figura 4-2 se muestra un máster fabricado con la técnica de prototipaje rápido de PSA. Para favorecer el despegue de finas membranas de PDMS se realizó un tratamiento del molde consistente en una silanización en fase gas con PFOTS durante toda una noche a temperatura ambiente.

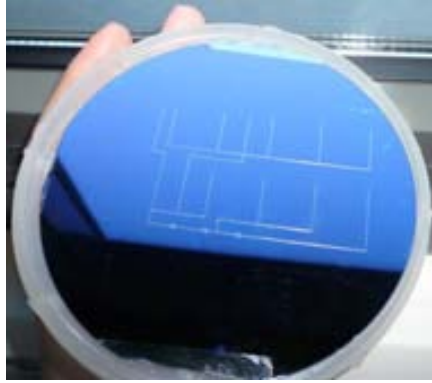


Figura 4-2. Imagen de un molde fabricado sobre una oblea de 6'' mediante la técnica de prototipaje rápido de PSA con un plotter de corte.

Las conexiones fluidicas de los canales al exterior se practicaron con una aguja de punta roma, permitiendo el ajuste de los tubos externos de plástico.

CHIPS TRANSDUCTORES

Se usaron dos chips de silicio de $3\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ con dos tipos diferentes de transductores: 1) un ISFET con la puerta de Si_3N_4 y 2) un IDE.

El objetivo general de la tecnología de integración desarrollada es embeber los chips de silicio en una PCB que proporcione conexión eléctrica a la instrumentación externa a la vez que sirva de sustrato lo suficientemente plano sobre el cual sellar herméticamente la estructura microfluidica. Para ello se utiliza la resina DABA, que permite acabados lisos y sin grietas. En la Figura 4-3 se muestra una descripción completa del proceso de encapsulado.

El proceso de encapsulación comienza realizando unos orificios en una PCB, con las mismas dimensiones que el chip, más un margen de $200\ \mu\text{m}$. (Figura 4-3.a.). La PCB se coloca boca abajo (con las tiras de cobre en la parte no expuesta) en una superficie plana cubierta con una fina lámina de PDMS. Los chips de silicio son colocados con la cara componentes no vista en sus respectivos agujeros y cada orificio es rellenado con el polímero fotocurable DABA. A continuación el DABA es fotocurado por luz UV, desde la parte posterior, asegurando que no se produce curado del polímero en la cara componentes del chip. Una buena adhesión entre la lámina de PDMS y el chip de silicio durante el proceso de curado del DABA garantiza que se forme una capa plana en la parte delantera, con el chip y la PCB exactamente al mismo nivel (Figura 4-3.b). Seguidamente se recubre por centrifugación con una capa delgada de DABA a 2000 rpm durante 40 segundos sobre la superficie plana de la PCB (cara componentes). La adhesión de DABA a la superficie del chip se mejora con una silanización previa, consistente en 1 h deshidratación del chip empaquetado a 80

°C, se guido del depósito por centrifugación una solución de TPM y una hora más a 80 °C para permitir la reacción de la molécula de silano con los grupos silanol de la superficie del chip. Finalmente, se lleva a cabo una exposición selectiva del DABA con luz ultravioleta a través de una máscara (Figura 4-3. c) y el revelado con etanol para crear las aperturas sobre el área sensitiva de los chips y los pads de conexión (Figura 4-3. d). Para evitar que el oxígeno inhiba la reacción de polimerización la capa de DABA es cubierta con un film de polietileno tereftalato, Mylar®, durante la exposición. El film Mylar® es fácilmente retirado antes del revelado [142]. En este trabajo, se han usado PCBs de 1.6 mm de grosor y chips de silicio de 500 µm de grosor. Las aperturas sobre los chips son circulares para la puerta de IISFET, de 1 mm de diámetro y rectangular para la zona interdigitada del IDE, 1.5 mm x 1.7 mm de tamaño.

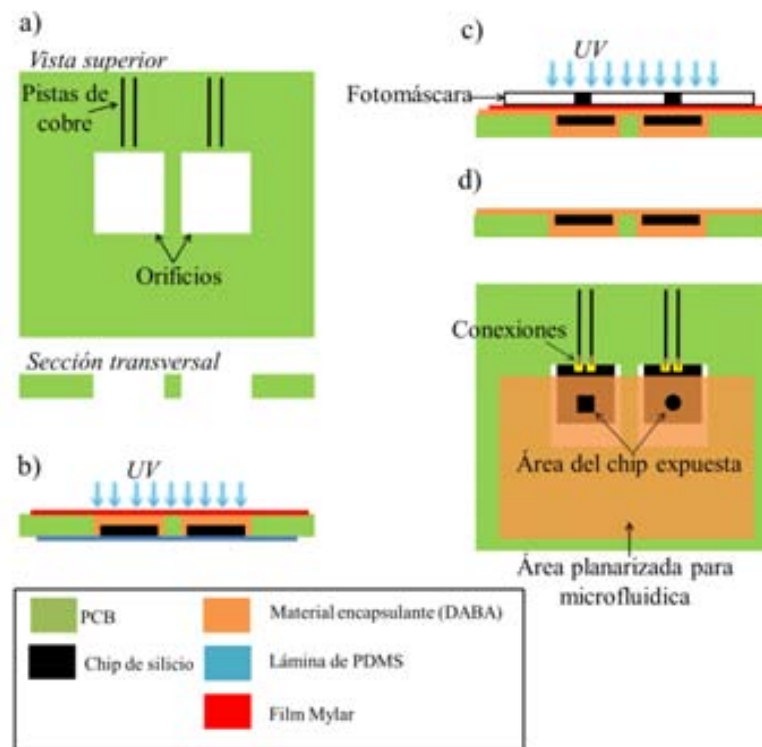


Figura 4-3. Descripción esquemática del proceso de encapsulado a) Los orificios fresados en la PCB. b) Los chips de silicio son localizados con la cara componentes no vista en los orificios y pegados con DABA fotocurado. c) Una delgada capa de DABA es depositada por centrifugación y se abren ventanas sobre los chips mediante exposición selectiva a luz UV a través de una máscara. d) Se hace la soldadura de las conexiones de los chips a las pistas de cobre.

Una vez se realiza la soldadura de las conexiones de los pads del chips a las pistas de cobre de la PCB, estos hilos son protegidos con una silicona quedando el sistema preparado para ser pegado a la estructura microfluidica, siguiendo el proceso que se describe en la siguiente sección.

PEGADO DE LA ESTRUCTURA MICROFLUÍDICA Y LOS CHIPS ENCAPSULADOS

Una vez obtenida la estructura de PDMS se ha de pegar a los chips encapsulados. Para ello se ha desarrollado un proceso de pegado, que permite la unión irreversible de ambos materiales, a una temperatura moderada, 80°C, sin necesidad de hacer tratamientos superficiales al chip encapsulado. Se ha seguido la estrategia, ampliamente utilizada en la bibliografía, de utilizar moléculas de silano como promotoras de la unión de PDMS a diferentes superficies.

El pegado de las dos superficies se basa, según se muestra en la Figura 4-4 b, en la reacción nucleofílica de grupos carbonilo α,β -insaturados, presentes en la superficie del polímero encapsulante DABA (Figura 4-4 a), y grupos amino libres introducidos en la superficie de PDMS a través de un tratamiento con un aminosilano. El protocolo de pegado se basa en la generación de grupos silanol en la superficie de PDMS, mediante un tratamiento en plasma de oxígeno, a 500 W durante 12 segundos. Posteriormente, estos grupos silanol se hacen reaccionar con una solución al 5 % de APTMS, durante 1 hora, tras lo cual la superficie de PDMS contiene grupos amino libres susceptibles de reaccionar con los grupos carbonilo de la superficie de DABA. Esta reacción covalente tiene lugar poniendo las dos superficies en contacto directo durante 1 hora a 80°C.

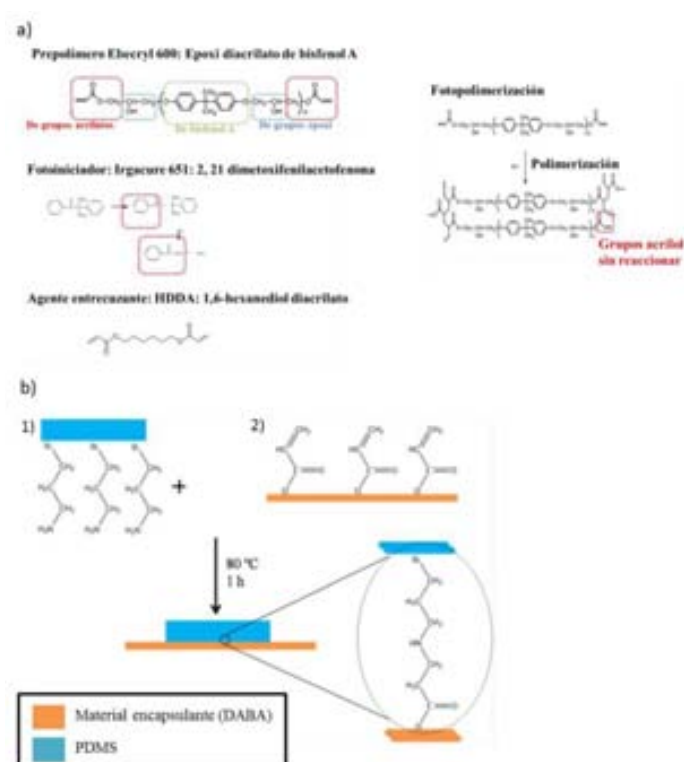


Figura 4-4. a) Reacción de fotopolimerización del polímero DABA [165]. Ilustración esquemática de la unión irreversible de las superficies de PDMS y DABA, mediante una polimerización nucleofílica. 1) grupos aminosilanos introducidos en la superficie de PDMS tratada con plasma de O₂, 2) grupos carbonilo α,β -insaturados presentes en la superficie de DABA.

4.3 METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN

Una de las novedades de la tecnología de encapsulado desarrollada es la minimización del espesor de la capa de polímero encapsulante fotopolimerizado sobre el chip, por lo que se determinó este valor mediante perfilometría. Se comprobó la integridad del sistema mediante medidas de corrientes de fuga del ISFET encapsulado. Defectos en el material encapsulante fotopolimerizado y/o una pobre adhesión entre el chip y el polímero encapsulante darían resultados de corrientes de fugas altas para un potencial aplicado entre los terminales del chip (Drenador, Fuente, y Sustrato) y la solución.

La evaluación de la calidad del pegado de las superficies de PDMS y DABA es un parámetro crítico a la hora de determinar la integridad estructural del sistema fabricado. Mediante técnicas indirectas (ángulo de contacto y FTIR-ATR) se han analizado las superficies de PDMS y DABA, contrastado la existencia de los grupos químicos necesarios en la reacción covalente de pegado. La exposición de la superficie de PDMS a plasma de oxígeno genera grupos silanol a la expensa de grupos metilos, haciendo la superficie altamente hidrofílica [70]. El tratamiento de esta superficie con el silano APTMS provoca la condensación de estos grupos silanol con grupos silanol de la molécula de APTMS, volviendo la superficie de PDMS más hidrofóbica [166]. La técnica de ángulo de contacto permite estimar el grado de modificación de la superficie de PDMS tras cada modificación superficial en función del ángulo de contacto entre una gota de agua desionizada de 3 μ l de volumen, y la superficie de PDMS. La técnica FTIR-ATR permite obtener información sobre los grupos funcionales presentes en las superficies lo que da idea de los grupos libres y por lo tanto susceptibles de reaccionar, grupos acrilol en la superficie de DABA y grupo amino en la superficie de PDMS.

Se evaluó la fuerza de unión entre las superficies mediante técnicas directas, determinándose los valores de resistencia a la tracción, fuerza de adhesión y presión crítica del sistema. La resistencia a la tracción se determinó mediante la técnica de *pull-out*, uniendo 1 cm^2 de PDMS entre dos sustratos de DABA y aplicando una fuerza perpendicular hasta el fallo de unión. La fuerza de adhesión se determinó mediante la técnica de blister, consistente en aplicar presión en una membrana de PDMS pegada a la superficie del polímero DABA. Esta membrana, de 200 μm de espesor se pegó a una superficie de DABA con áreas circulares de 10, 5 and 2.5 mm de diámetro, respectivamente, dónde no hay DABA. Al inyectarse aire entre las dos superficies, el PDMS forma una ampolla o blister hasta una presión tal que se produce el desenganche de la membrana de la superficie de DABA. En la Figura 4-5 se muestra un esquema del montaje del experimento. La presión crítica se determinó mediante experimentos de fuga, aplicando rampas de presión en canales cerrados en un extremo. La monitorización de la presión en el interior de los canales

permite determinar la presión a la cual se producen fugas como consecuencia de un fallo en la unión. Las dimensiones de los canales utilizados son $20\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m} \times 30\ \text{mm}$ (alto x ancho x largo), espaciados a tres distancias diferentes cada uno del otro (100, 200 and $400\ \mu\text{m}$).

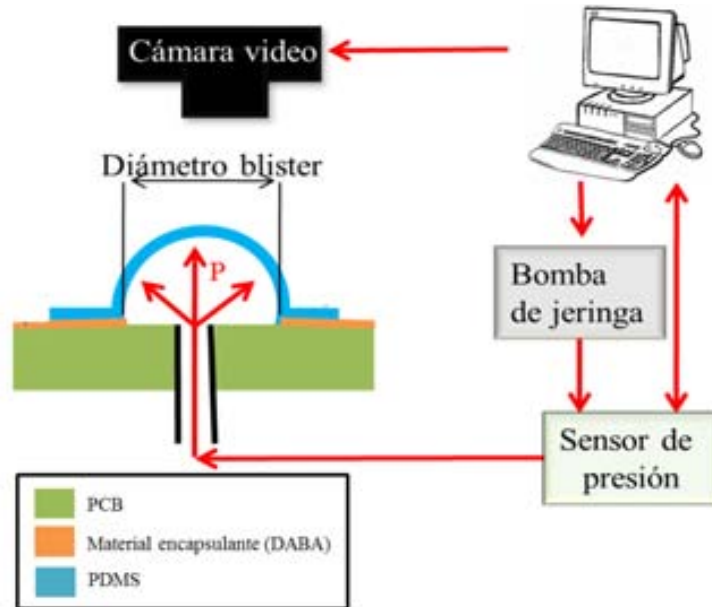


Figura 4-5. Esquema del montaje para realizar el experimento de blister.

Durante la caracterización electroquímica del sistema se utilizó una bomba de jeringas controlada por ordenador para regular las corrientes de los líquidos de medida en las dos entradas del sistema microfluídico, manteniendo una velocidad de flujo de $60\ \mu\text{l}\ \text{min}^{-1}$ mientras se varió la proporción de cada flujo individualmente.

4.4 RESULTADOS

En la Figura 4-6 se muestra el resultado del proceso de encapsulación de los dos chips incluidos en el prototipo. Los orificios de la PCB fueron fresados en forma de T para que el posicionamiento de los chips fuera más fácil y más preciso, requerimiento para obtener un buen alineamiento. Se realizaron aperturas mediante fotolitografía simultáneamente sobre los chips, de 1 mm de diámetro circular y de 1.5 mm x 1.7 mm cuadrado, respectivamente para el ISFET y para el IDE. En la Figura 4-6 b se observa la transición entre la zona con DABA y sin DABA, que deja libre los pads del chip para realizar la soldadura de las conexiones a las tiras de PCB.

El espesor de las capas de encapsulado obtenidas con esta tecnología de empaquetado, medidas sobre las aperturas de los chips con un perfilómetro, resultó de $43.7 \pm 13.6 \mu\text{m}$ ($n = 3$). Se consiguió una reducción en el espesor de 1/3 comparado con tecnologías previamente reportadas [90]. La variabilidad en el espesor ($13.6 \mu\text{m}$) es probablemente debida a un defecto en el nivel del chip con la PCB. Debido a la presencia de las tiras de cobre en la PCB, con una altura de $35 \mu\text{m}$ de altura, resulta en un recubrimiento por centrifugación del DABA no homogéneo a espesores tan bajos como los obtenidos. Este problema podría minimizarse usando PCBs con un grosor de cobre menor, como el estándar de $17.5 \mu\text{m}$. Resultados preliminares sobre el mínimo tamaño de la apertura que se puede conseguir con esta tecnología se determinaron utilizando una máscara de test con diversos motivos de tamaño mínimo de $100 \mu\text{m}$. Los motivos con tamaños superiores a las $130 \mu\text{m}$ se abrieron fiablemente, mientras que los motivos más pequeños sólo resultaron parcialmente abiertos. En la Figura 4-6 se demuestra cómo el proceso de polimerización de DABA da como resultado superficies libres de fisuras y burbujas.

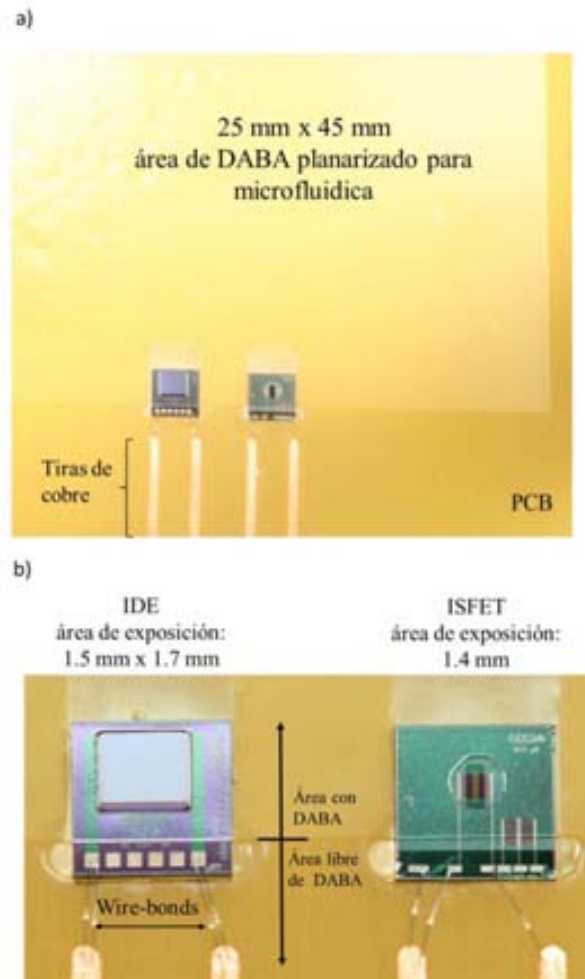


Figura 4-6. a) Chips de silicio encapsulados en una PCB y b) ampliación de la zona de los chips, dónde puede observarse el límite entre la zona con y sin DABA.

La Figura 4-7 muestra la curva característica de puerta de un ISFET, corriente de drenaje (I_{DS}) frente a voltaje de puerta (V_{GS}), incluyendo la corriente de fugas de la puerta (I_G), después del paso de unión del PDMS al DABA. Las corrientes de fuga permanecen en todo momento inferiores a 1 nA. Esta baja corriente de fuga es un indicador de la integridad del chip encapsulado [93] demostrando que el líquido de medida no penetra entre los contactos eléctricos de los pads del chip y los bordes del chip

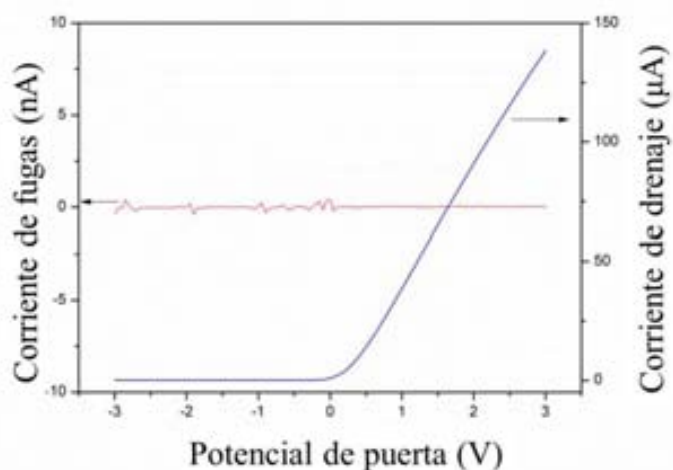






Figura 4-7. Curva característica de la puerta de ISFET y de la corriente de fugas.

En la Tabla 4-1 se muestran los valores de ángulo de contacto de una gota de agua desionizada sobre las superficies, antes y después los tratamientos superficiales necesarios para el proceso de pegado. El ángulo de contacto sobre la superficie de PDMS decrece de 95.5° a 32.2° tras la exposición a plasma de oxígeno, confirmando que se ha vuelto más hidrofílica como era de esperar tras la generación de grupos silanol. Un tratamiento posterior con APTMS aumenta el ángulo de contacto hasta los 65.9°, confirmando que se ha vuelto más hidrofóbica como cabía de esperar para las superficies grupos amino terminales ($-NH_2$) [167].

Tabla 4-1. Valores de ángulo de contacto de una gota de 3 µl de agua desionizada sobre superficies de DABA y PDMS con diferentes tratamientos.

Tratamiento superficial	Superficie	
	DABA	PDMS
Sin tratamiento	66.5 ± 0.25 	95.5 ± 0.07 
Plasma de O ₂	-	32.2 ± 0.37 
Plasma O ₂ + APTMS	-	65.9 ± 0.27 

La Figura 4-8 muestra el espectro de FTIR-ATR de la superficie de PDMS, antes y después de ser modificados, y de la superficie de DABA. Se demuestra la existencia de grupos amino en la superficie de PDMS después del tratamiento con APTMS por la existencia de un pico de absorción en el espectro a una longitud de onda alrededor de 3100 cm^{-1} (pico A). Los picos a 2962 cm^{-1} y 2902 cm^{-1} (picos B and C) se atribuyen a grupos $-\text{CH}_2$ and $-\text{CH}_3$ de la cadena polimérica [168]. Los picos alrededor de 1633 y 1564 cm^{-1} (picos D and E) se han asociado a la deformación por vibración del grupo $-\text{NH}_2$. Se evidencia la existencia de los grupos no reactivos en la superficie de DABA involucrados en la reacción de unión PDMS-DABA en el espectro de FTIR-ATR. El pico alrededor de 1720 cm^{-1} (pico J) se asignó a la vibración de tensión del enlace $\nu(\text{C}=\text{O})$ del grupo α, β insaturado éster. Otro pico característico en el espectro fue asignado a la vibración de tensión del enlace $=\text{C}-\text{H}$ (3037 cm^{-1} , pico G) y a la vibración de tensión simétrica y asimétrica de la unión $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ del éster con bisfenol A (1236 cm^{-1} , 1040 cm^{-1} and 1011 cm^{-1} , picos K, L y M, respectivamente). Un ancho pico centrado sobre 3436 cm^{-1} es asignado a la vibración de tensión del enlace $-\text{OH}$ polimérico (pico F) [165].

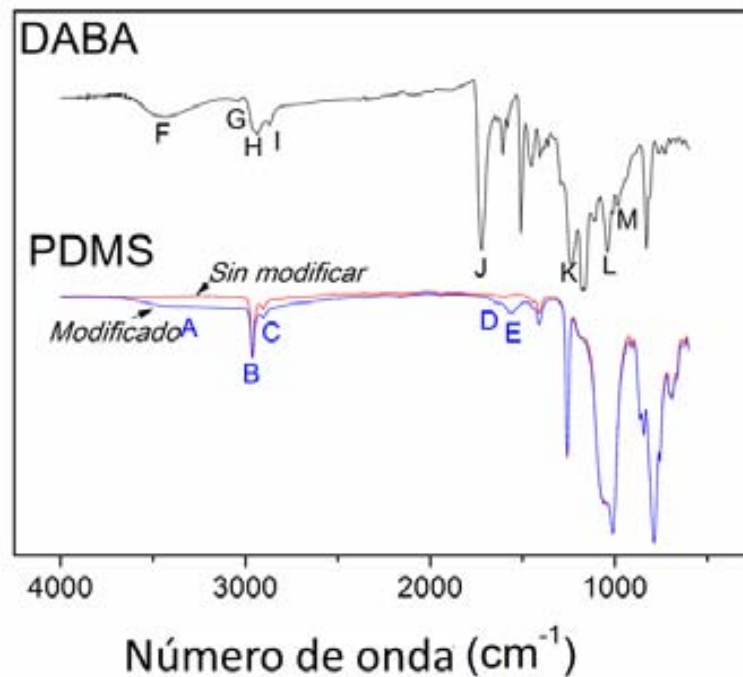


Figura 4-8. Espectro de FTIR-ATR de la superficie de PDMS antes y después de su modificación con APTMS y de la superficie del polímero encapsulante DABA.

La fuerza de unión entre las superficies DABA y PDMS a través del tratamiento con APTMS, con un valor de resistencia a la tracción de $550 \pm 137\text{ kPa}$ ($n = 3$), es comparable con la fuerza obtenida para uniones PDMS-PDMS a través del tratamiento convencional de plasma de oxígeno [65], y

mayor que las obtenidas para uniones PDMS-teflón a través de promotores de adhesión [169] y las uniones PDMS-PDMS a través de tratamientos con aminosilanos [66]. La fuerza de adhesión de la superficie PDMS-DABA, con integridad de la unión hasta presiones de 308 ± 28 kPa, 201 ± 4 kPa y 138 ± 10 kPa ($n = 3$) para los blisters de 2.5, 5 y 10 mm de diámetro, respectivamente, son del mismo orden de magnitud que los obtenidos para uniones PDMS-policarbonato a través de tratamiento con aminosilanos [170] y para aquellas uniones PDMS-PDMS a través de tratamientos por plasma de oxígeno [72, 171]. En la Figura 4-9 a se muestran imágenes secuenciales de un experimento de blíster, donde se muestra el lugar por donde rompe la membrana de PDMS por presión interna en el sistema y por falta de adhesión. Los resultados de los experimentos de fugas mostraron que este proceso de pegado soporta presiones críticas superiores a 360 kPa (separación entre canales de $100 \mu\text{m}$), presión a la cual el tubo de plástico se desconecta físicamente de la entrada microfluidica del sistema. Este valor es del mismo orden de magnitud que el obtenido para uniones covalentes PDMS-PDMS a través de tratamientos por plasma de oxígeno [70] y para uniones de membranas poliméricas-PDMS mediante modificación superficial a través de tratamientos con grupos aminosilanos [67] y significativamente superiores a las obtenidas para uniones PDMS-parileno mediante tratamiento por plasma [172] y para las uniones a través de grupos epoxi entre PDMS y superficies poliméricas [67]. La Figura 4-9 b muestra la imagen de los canales utilizados donde no se observan fugas.

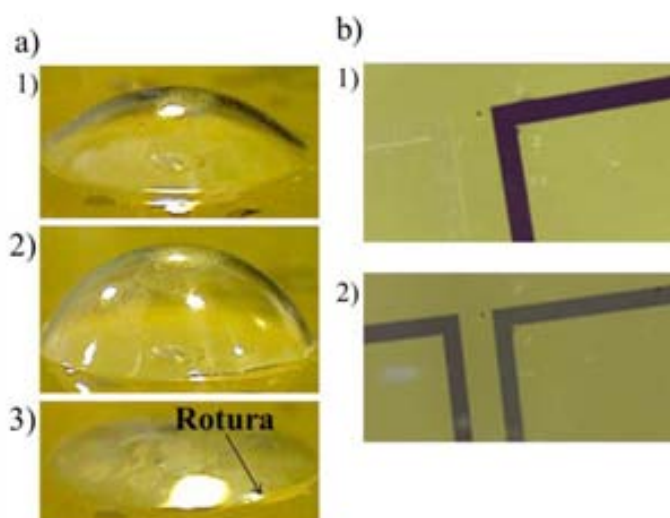


Figura 4-9. a) Imágenes secuenciales de un experimento de blíster con diámetro de 10 mm. 1) momento inicial, membrana de PDMS no tensionada, 2) membrana de PDMS tensionada y 3) rotura del PDMS debido a la tensión interior en el blíster. b) Imagen de los canales utilizados para el experimento de fugas, 1) un canal lleno de tinta junto a un canal paralelo vacío, y 2) dos canales paralelos llenos de tinta.

La ausencia de fugas en el dispositivo microfluidico, como se muestra en la Figura 4-10 cuando se hace pasar líquido por el canal microfluidico demuestra de nuevo la calidad del pegado DABA-

PDMS a través de tratamiento con APTMS. Considerando que la presión aplicada a los microcanales para experimentos fluidicos normalmente es alrededor de 40 kPa y que rara vez esa presión supera los 200 kPa [173], el proceso propuesto para pegar las superficies de PDMS y DABA es altamente aceptable para la mayoría de las aplicaciones microfluidicas.

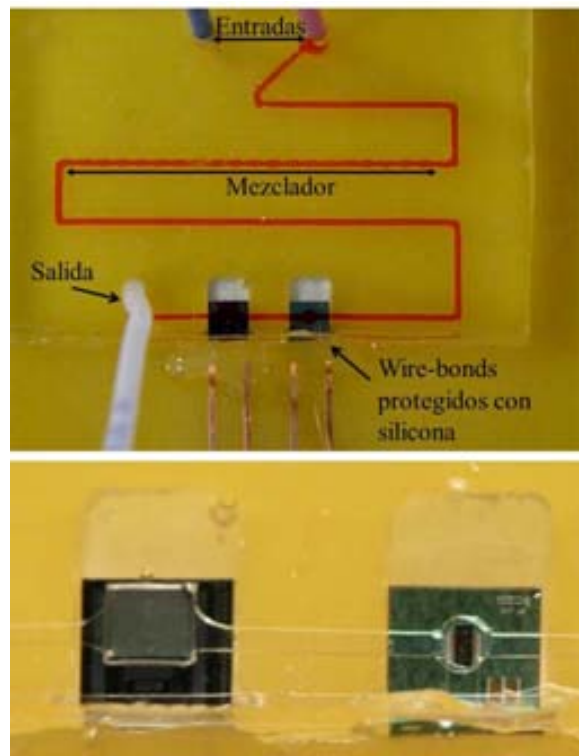


Figura 4-10. La imagen superior muestra el prototipo ensamblado con la estructura de PDMS. En la imagen inferior se muestra una ampliación de la zona de los chips donde se observa el canal sobre las zonas activas de los chips.

La evaluación electroquímica del sistema, mediante la respuesta dinámica del IDE y del ISFET en el dispositivo fabricado se muestra en la Figura 4-11. En la figura superior se muestra la variación en la parte real de la admitancia del IDE, para variaciones de conductividad en el sistema de 40.8 a 101.6 $\mu\text{S cm}^{-1}$ y para la disminución de esta hasta el valor original de 40.8 $\mu\text{S cm}^{-1}$. La constante de el electrodo de celda calculada de estos experimentos fue 0.03 l cm^{-1} , en concordancia con la literatura [51]. En la figura inferior se muestra la respuesta del ISFET al variar el pH en el interior del sistema desde pH 1.9 a 11.9, con una sensibilidad de 56 mVpH^{-1} , como se esperaba para este tipo de transductores según bibliografía [174].

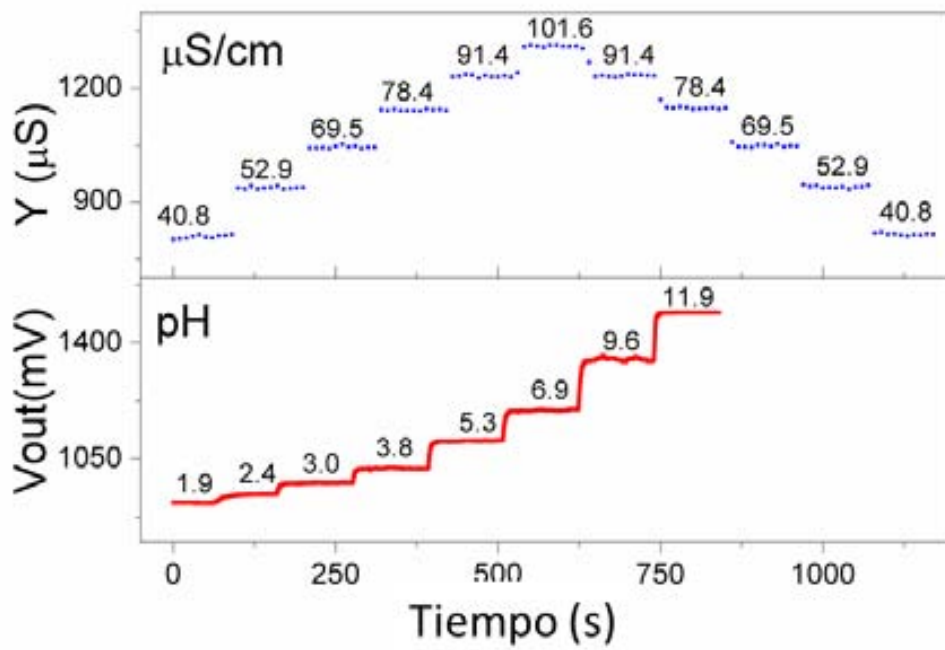


Figura 4-11. Respuesta dinámica del IDE (superior) y del ISFET (inferior), ante variaciones de conductividad y pH, respectivamente, en la disolución en el sistema microfluídico.

4.5 CONCLUSIONES

Se ha desarrollado una tecnología de integración de sensores fabricados con tecnología microelectrónica y estructuras microfluídicas en sustrato PCB que da respuesta a las necesidades planteadas en el capítulo 3, tras la evaluación de sensores electroquímicos para aplicación en cultivos celulares. Esta tecnología de integración permite integrar múltiples sensores en un mismo sustrato, posibilitando el análisis multiparamétrico de muestras de volumen reducido. El proceso de pegado desarrollado proporciona una unión de calidad entre los sensores encapsulados y la estructura microfluídica, permitiendo el pre-tratamiento de muestras, dentro del mismo sistema, antes de ser enviadas a la zona de medida. Este proceso además es compatible con la incorporación de componentes en los sensores, como son las membranas selectivas a analitos, nanopartículas catalíticas o ADN, ya que no necesita tratamientos superficiales del sensor y se realiza a una temperatura moderada, de 80°C. El proceso de integración desarrollado puede ser fácilmente automatizado y escalado para trabajar en áreas grandes, abriendo así las puertas a la fabricación de microsistemas analíticos complejos que combinen el extraordinario potencial de ambas tecnologías: la microfluídica y la microelectrónica. Aspectos como la integración de electrodos de referencia en el sistema, la automatización de los modos de trabajo y la posibilidad de calibración de los sensores entre experimentos se abordan en el capítulo 5 aplicándose en la fabricación de tres dispositivos LOC para aplicaciones biológicas.

5 APLICACIONES DE LA TECNOLOGÍA DE INTEGRACIÓN DE SENSORES Y MICROFLUÍDICA

En este Capítulo se describe la fabricación de tres dispositivos demostradores de la tecnología de integración de ICs y microfluídica presentada en el Capítulo 4, que responden a las necesidades recogidas en el Capítulo 3 para aplicar de manera práctica los sensores fabricados con tecnología microelectrónica en medidas de parámetros biológicos:

- Dispositivo inalámbrico para el análisis de pH
- Dispositivo de autodiagnóstico para el control de litiasis renal
- Sistema de monitorización de cultivos celulares.

Un aspecto crítico a la hora de miniaturizar sensores es la dificultad de integrar electrodos de referencia. Para eliminar la necesidad de utilizar electrodos de referencia, los tres sistemas fabricados se basan en la metodología ISFET/REFET diferencial. Para volver un ISFET insensible a los cambios de pH, y por tanto convertirlo en un REFET, se pegó un canal microfluídico sobre la puerta del ISFET. Este canal permite el contacto eléctrico entre el ISFET y la disolución de medida sin que el pH de la disolución de referencia en su interior varíe sustancialmente. El desarrollo de esta estrategia, reivindicada en una patente en mayo de 2014 [38], ha permitido al Grupo de Transductores Químicos participar en la fabricación de un dispositivo comercial que ha superado la fase de aprobación regulatoria y se espera su comercialización para finales de este año 2014.

5.1 REACTIVOS E INSTRUMENTAL

REACTIVOS

Para la evaluación de los dispositivos se utilizaron disoluciones tampón fosfato comercial (PBS, Crison) de diversos pH. Las soluciones acuosas usadas en este trabajo se prepararon con agua desionizada (resistividad mayor de 18 M Ω).

En la caracterización del dispositivo inalámbrico de pH y el sistema de monitorización de cultivos celulares se utilizó una disolución comercial de PBS (Crison) de pH 7 como líquido de referencia, y de pH 2, 4, 7, 9, y 10 como disoluciones de caracterización. Para el dispositivo de autodiagnóstico para el control de litiasis renal se utilizó una disolución PBS comercial de pH 6 como líquido de referencia y una solución PBS de HAc y ácido fosfórico en KNO₃, variando su pH de 1.8 a 9.9 con KOH.

INSTRUMENTACIÓN

Para la caracterización de la respuesta del dispositivo inalámbrico para el control de pH se utilizó un analizador Agilent EXA N9010A y una antena de dipolo 930 MHz para recepción de la señal.

Para el control fluidoico del sistema de monitorización automática de cultivos se utilizó una μ -bomba peristáltica (Dolomite Microfluidics) y se fabricaron 10 válvulas de presión utilizando unos solenoides de 300 gr/f biestables (BLP Components Ltd.) con unos imanes. Para generar los pulsos de actuación de las válvulas se utilizó un circuito electrónico controlado por una interfaz de LabView para PC. Esta interfaz permite controlar el sistema de medida y registrar y visualizar las medidas realizadas. La comunicación del circuito con el software usado se realizó a través de una tarjeta de adquisición de National Instruments (NI USB 6259). La estructura del circuito está basada en 16 amplificadores operacionales con capacidad de corriente de salida de 3A, conectados a las salidas analógicas de la tarjeta a través de multiplexores. La corriente necesaria para que actúen los solenoides es de 300 mA durante 25ms, pero dado que estos actuadores son biestables y solo requieren energía para cambiar de posición el consumo promediado en el tiempo es muy reducido. Se usó un sensor de presión MPX5700 (Freescale Semiconductor Inc) para monitorizar la presión generada en el sistema microfluidico. Se usaron componentes estándar (conectores, válvulas, etc...) (Teknokroma S.C.C.L.) y tubos de Teflón de 1.59 mm de diámetro externo y de 1.01 mm de diámetro interno, para conectar los distintos dispositivos entre sí.

5.2 DISPOSITIVO INALÁMBRICO PARA EL ANÁLISIS DE pH

La medida de parámetros químicos en medios de difícil acceso y/o cerrados es de gran interés para muchas aplicaciones, como por ejemplo sensores implantables, la monitorización de alimentos envasados o la medida de cultivos celulares. En esta sección se presenta un dispositivo inalámbrico para el análisis de pH en cultivos celulares, que permite realizar medidas remotas sin necesidad de tener acceso directo y continuo al medio, evitando la pérdida de integridad del cultivo. Además, el pequeño tamaño del sistema, que no necesita de electrodo de referencia externo, permite realizar la medida en volúmenes de muestra muy pequeños y en lugares de difícil acceso, como en una placa multipocillos tipo MTP (Micro Titre Plate).

En esta sección se describe la implementación y evaluación de un depósito y un canal microfluídico sobre un chip que contiene un sistema tipo RFID (Radio Frequency Identification) permitiendo trabajar en modo ISFET/REFET diferencial (Figura 5-1), a modo de demostrador de una de las reivindicaciones de la patente [38]. El chip RFID totalmente integrado, contiene el par de ISFETs, fue diseñado y fabricado en el contexto del trabajo de tesis del Dr. F. Segura [175].

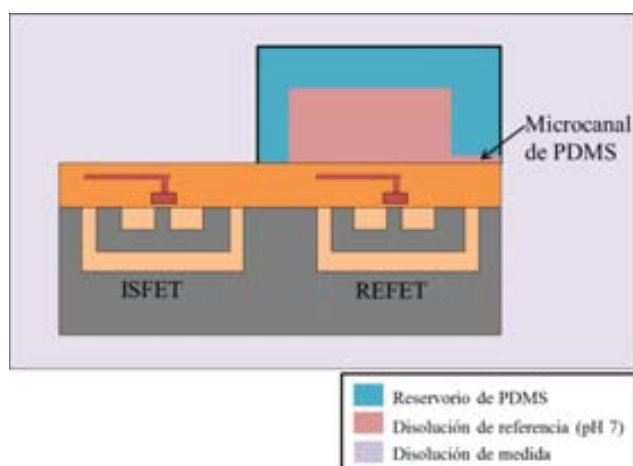


Figura 5-1. Diagrama, no a escala, del sistema, incluyendo el chip RFID con el par ISFET/REFET tras la implementación del depósito de PDMS.

La encapsulación de este tipo de sistemas, que no necesita realizar conexiones eléctricas del chip hacia componentes externos, se simplifica mucho, lo que posibilita la encapsulación a nivel de oblea, con la consecuente reducción de coste de fabricación. Como primera aproximación y con el objetivo de tener una flexibilidad en el diseño del sistema, los post-procesos para la realización del sensor se realizaron a nivel individual, desarrollándose una metodología de trabajo que permite la manipulación de chips de tamaño pequeño sin necesidad de estar insertados en un sustrato. Este post-proceso es fácilmente extrapolable a nivel de oblea.

CHIP ELECTROQUÍMICO INALÁMBRICO

El chip RFID utilizado (1.5 mm x 1.5 mm) incluye la integración de componentes y circuitos para la recepción de la alimentación, la generación de tensión de alimentación, medida del sensor y transmisión de datos (Figura 5-2). La fabricación del chip, que contiene también dos transductores tipo ISFET se realizó de acuerdo a la tecnología CMOS (*Complementary metal oxide semiconductor*) 0.13 μm de la compañía UMC (*United Microelectronics components*) ([175]. Se usó la capa de pasivación de óxido y nitruro de silicio como capa dieléctrica sensible a pH [176]. Cabe destacar que la novedad del dispositivo desarrollado reside, no tanto en la implementación de circuitos de medida y comunicaciones en tecnologías CMOS estándar, de realización ya conocida, sino en la integración del par ISFET/REFET utilizando el sustrato en contacto con la solución como electrodo de puerta, así como la integración de la bobina, que permite realizar la alimentación y envío de datos por medio de acople inductivo, usando los metales estándar de la tecnología. Gracias a ello se consigue un sistema sensor de pH inalámbrico totalmente integrado, y por lo tanto fabricado enteramente a nivel de oblea con una tecnología estándar de bajo coste y un post-proceso sencillo.

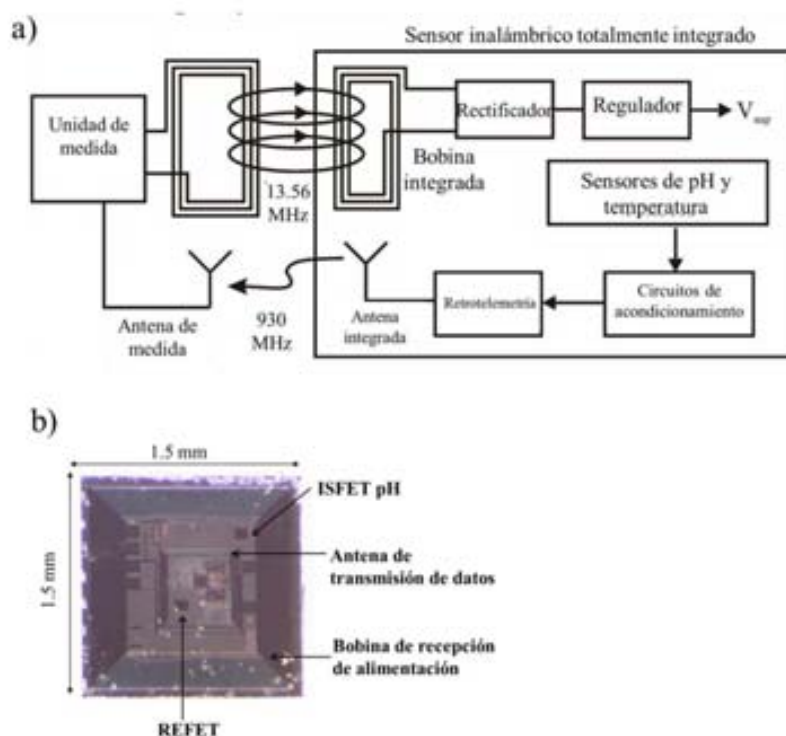


Figura 5-2. a) Diagrama del sensor RFID. b) Imagen del chip fabricado mostrando el ISFET de pH y el REFET.

Una vez fabricado el chip, se prosigue con una etapa de encapsulación del chip que consiste en crear dos aperturas en el material encapsulante, sobre el ISFET y el REFET, respectivamente, que permitan el contacto del medio acuoso con los sensores. Como polímero encapsulante se utilizó DABA, resina fotocurable ya utilizada en este trabajo para encapsular sensores no inalámbricos.

Esta metodología se simplifica respecto a la desarrollada en la Sección 4.2 al no ser necesario realizarse conexiones eléctricas de cada chip hacia componentes externos, pero se complica al tratarse de chips individuales, no insertados en sustrato alguno, viéndose dificultada su manipulación.

En la Figura 5-3 se muestra una descripción completa del proceso de encapsulado desarrollado. Para facilitar la manipulación del chip se fija, cara componentes hacia arriba, mediante un pegado reversible a un soporte rígido, por ejemplo un portaobjetos de vidrio, que da estabilidad al sistema durante el proceso de encapsulado. Se utilizó un marco fabricado en PDMS para retener el prepolímero DABA, en estado líquido antes de su polimerización. Una vez cubierto el chip con DABA, se alinearon los motivos de una máscara, cuadrados de 0.2 mm de lado, sobre la puerta de cada ISFET. Se dejó descansar la máscara sobre el marco de PDMS, aplicando una pequeña presión. La altura del marco delimita el espesor de la capa de encapsulante resultante sobre el chip. Para un chip de 300 μm de espesor se utilizó un marco de 325 μm de altura para obtener una capa final de polímero encapsulante de 25 μm (Figura 5-3 a). La máscara se cubrió con un film Mylar® para evitar la polimerización de DABA sobre la misma y la inhibición de la polimerización por oxígeno. La adhesión de DABA a la superficie del chip se mejora con una silanización previa, consistente en 1 h deshidratación del chip a 80 °C, seguido de una gota de una solución de TPM y una hora más a 80 °C para permitir la reacción de la molécula de silano con los grupos silanol de la superficie del chip. Tras irradiar con luz ultravioleta durante 10 segundos a través de la máscara, se revela la resina no polimerizada sobre la puerta de los ISFETs con EtOH y se vuelve a irradiar, durante 60 segundos, esta vez sin máscara, para mejorar el curado de la capa (Figura 5-3.b y Figura 5-3 c).

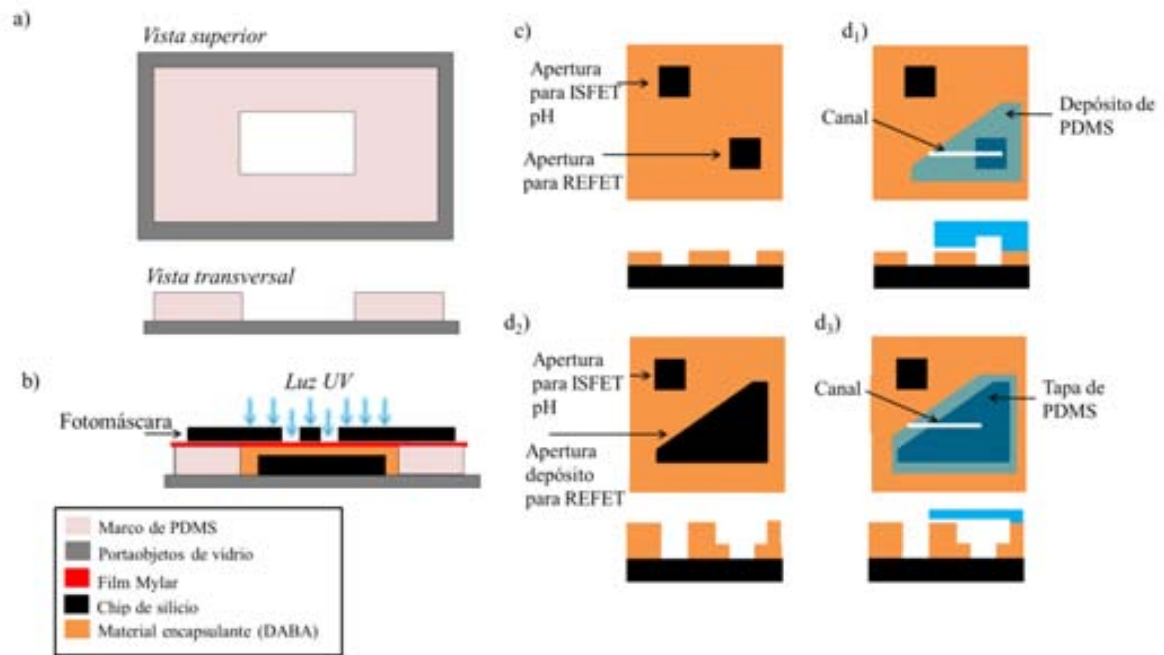


Figura 5-3. Descripción esquemática del proceso de encapsulado a) Chip de silicio pegado reversiblemente sobre un sustrato con un marco de PDMS rodeándolo b) Chip de silicio, cara componentes hacia arriba cubierto con polímero encapsulante DABA. Se irradia con luz UV a través de la máscara para abrir las ventanas sobre las puertas de los ISFETs. El espesor del encapsulante viene determinado por la diferencia de alturas entre el chip y el marco de PDMS sobre el que descansa la máscara. c) Una vez se revela el polímero, las puertas de los ISFETs quedan accesibles al medio líquido. Metodología de fabricación del depósito. d₁) pegado de un depósito con un canal en PDMS. d₂) Segunda fotopolimerización para definir el depósito sobre el REFET. d₃) pegado de una tapa de PDMS con un canal.

DEPÓSITO MICROFLUÍDICO

La fabricación del depósito sobre uno de los ISFETs del chip, para volverlo insensible a pH, se realizó siguiendo dos estrategias: 1) réplica en PDMS tanto del canal como del depósito y 2) fotolitografía del depósito en la resina DABA y canal replicado en PDMS.

Ambas metodologías parten del chip con las ventanas ya definidas sobre las puertas de los ISFETs (Figura 5-3 c). Para la estrategia 1, el siguiente y único paso consiste en pegar el depósito sobre la puerta del REFET. En la Figura 5-4 se muestra el molde, fabricado en SU-8, que sirve de molde para su fabricación. Con unas medidas de 0.4 mm de diámetro y 100 μm de altura, el volumen total del depósito es de 17.5 nL, a lo que hay que añadir 0.3 nL del microcanal de 400 μm de largo, 25 μm de alto y 30 μm de ancho que lo conecta con el medio exterior. Se calculó mediante análisis de elementos finitos y usando un coeficiente de difusión genérico de $10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ que la disolución dentro del depósito tardará, aproximadamente 14 horas en perder el 50 % de su concentración por difusión hacia la disolución externa.

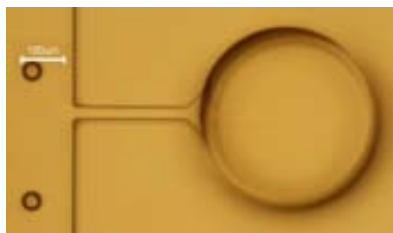


Figura 5-4. Molde del depósito en SU-8 para réplica en PDMS.

Para llevar a cabo la fabricación del depósito siguiendo la estrategia 2), una vez definidas las ventanas sobre las puertas sobre los ISFETs, se han de realizar dos pasos adicionales, consistentes en la definición del depósito en DABA sobre el REFET y el posterior pegado sobre éste de una tapa de PDMS con el canal microfluídico. En la Figura 5-3 d₂ se muestra un esquema del chip de silicio tras la segunda fotopolimerización. La metodología a seguir es la misma que la descrita en la sección anterior solo que esta vez, la altura del marco de PDMS ha de ser de 350 μm , para obtener otra vez un espesor total de material encapsulante polimerizado de 50 μm , y un volumen total del depósito es de 16.5 nL. Se utilizó un molde de SU-8 para fabricar el microcanal, de 400 μm de largo, 25 μm de ancho y 30 μm de ancho (Figura 5-3 d₃). La fotolitografía extra de esta metodología la vuelve tediosa, haciendo necesario utilizar equipamiento no convencional a nivel de laboratorio.

5.2.1 METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN

Para caracterizar el sistema electroquímicamente el chip se sumergió en tres disoluciones tampón de pH 4, 7 y 9, y se leyó la señal diferencial. Se realizó un estudio de la respuesta del sensor de temperatura, también incluido en el chip RFID, en un rango de temperaturas comprendido entre 0°C y 50 °C. Previamente el depósito se llenó con PBS de pH 7, sumergiéndolo en la disolución y aplicando vacío durante 1 hora.

Para realizar la medida, el sustrato de silicio se utiliza como electrodo de polarización de puerta. Éste queda expuesto a la solución en los laterales del chip. Los sensores son alimentados por el acoplamiento inductivo a 13,56 MHz. Mientras es alimentado, el sistema está transmitiendo continuamente una señal de radiofrecuencia en la banda ISM (*Industrial, Scientific and Medical*) de 930 MHz. La señal consiste en un código de identificación seguido por los valores de temperatura y pH en forma de ancho de pulso (Figura 5-5), todo ello en modulación tipo OOK (On Off Keying). La unidad de lectura consiste en una bobina para la transmisión de potencia conectada a un amplificador de 13,56 MHz y una antena de dipolo 930 MHz conectada a un analizador de señal Agilent EXA N9010A para la recepción de la señal. La señal recibida se procesa y se decodifica en

un ordenador con un software especialmente desarrollado. Con esta configuración se ha conseguido una distancia de lectura de hasta 3 mm.

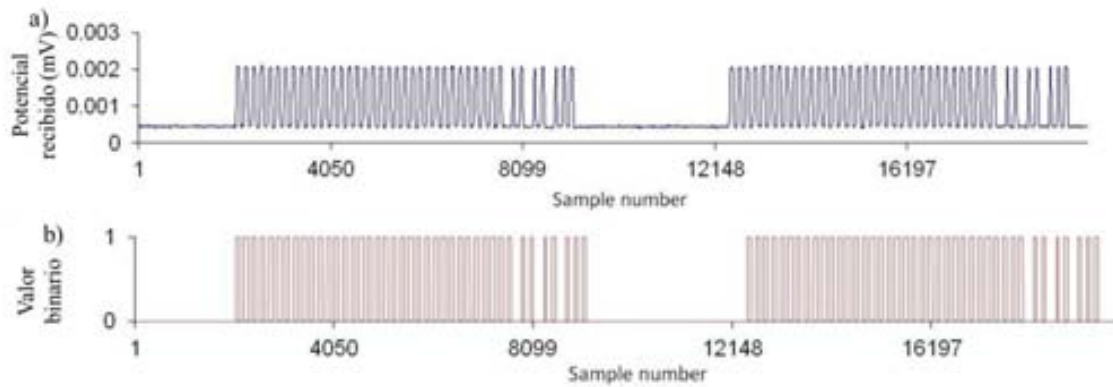


Figura 5-5. Señal recibida a) de la envolvente y b) de la señal decodificada.

5.2.2 RESULTADOS

En la Figura 5-6 se muestra el proceso de encapsulación del chip y la implementación del depósito sobre éste. En la Figura 5-6 a se muestra la imagen del chip tras la primera fotopolimerización de DABA para definir las ventanas sobre los ISFETs. En la Figura 5-6 b₁ se muestra la imagen del chip según la estrategia 1), con el depósito de PDMS pegado y listo para ser llenado con disolución referencia. Siguiendo la estrategia 2) en la Figura 5-6 b₂ se muestra el depósito definido en DABA tras una segunda fotolitografía, y en la Figura 5-6 b₃ la imagen del chip con la tapa de PDMS y el depósito ya lleno de solución de referencia pH 7 a través del microcanal.

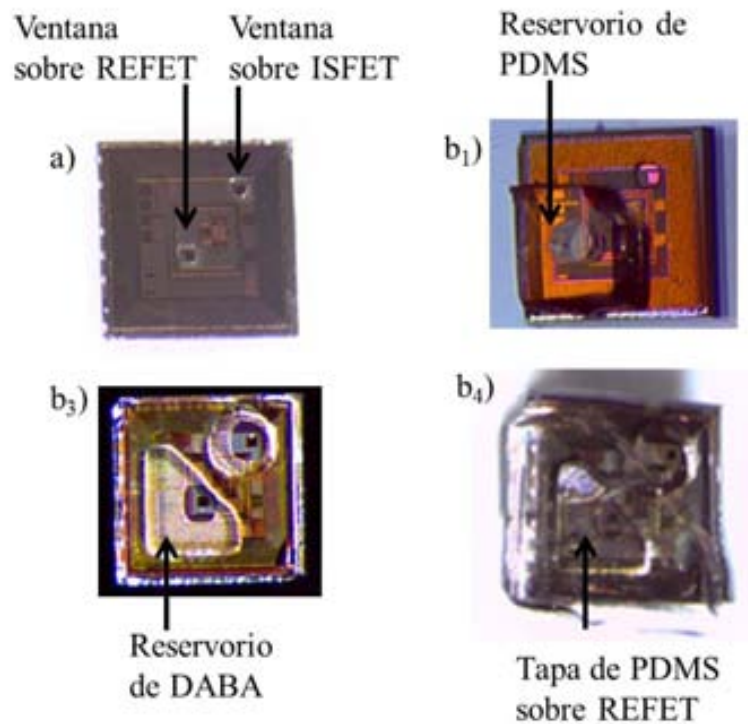


Figura 5-6. Imágenes del chip. a) Tras la fotopolimerización para definir aperturas sobre ISFETs. Estrategia 1) b₁) Tras pegar el depósito de PDMS sobre el REFET. Estrategia 2) b₂) tras una segunda fotopolimerización para definir el depósito y b₃) tras pegar el canal de PDMS que hace de tapa.

La Figura 5-7 a muestra la respuesta característica del sistema a cambios en la temperatura entre 0 °C y 50 °C. En la Figura 5-7 b se muestra la respuesta de dos chips a variaciones de pH en el medio (pH 4, 7 y 9). Se observó una buena reproducibilidad de la señal recibida en los sistemas.

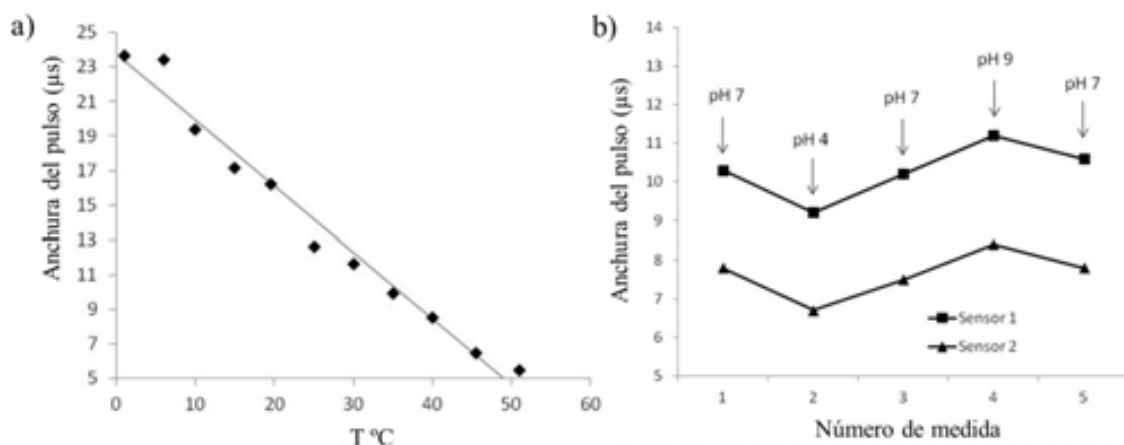


Figura 5-7. Respuesta característica del chip RFID a) medida de temperatura y b) medida del pH del medio.

Estos resultados, aunque preliminares, demuestran la viabilidad del dispositivo inalámbrico ISFET/REFET de pH diferencial reivindicado en la patente [38]. El pequeño tamaño de los chips y

la implementación de membranas selectivas a iones sobre la puerta del ISFET permitirá la detección multiparamétrica y simultánea de muestras de acceso difícil, como los cultivos celulares, introduciendo en cada pocillo de las placas tipo MTP tantos chips individuales como analitos quieran registrarse.

5.3 DISPOSITIVO DE AUTODIAGNÓSTICO PARA EL CONTROL DE LITIASIS RENAL

La implementación de sensores en sistemas de autodiagnóstico y control de enfermedades está supeditada a varios retos. Para que el dispositivo tenga un gran auge comercial y alcance el interés de pacientes, debe de ser fiable, pequeño, barato, portátil y de funcionamiento sencillo.

Recientemente se ha descubierto que mantener el pH de la orina en el rango de 5.6 a 6.2 puede prevenir la formación de piedras en el riñón (Litiasis) [37]. En este contexto, la empresa Devicare S.L. está desarrollando un dispositivo para la medida de pH en orina destinado a pacientes con litiasis recurrente en colaboración con el Grupo de Transductores Químicos del IMB-CNM. El desarrollo del primer prototipo de sensor de pH para dicho dispositivo se ha realizado, en parte, en el marco de la presente tesis doctoral. En esta sección se presenta el sensor ISFET/REFET diseñado para cumplir con los requerimientos de esta aplicación, cuya invención está reivindicada en la patente a [38]. Actualmente el dispositivo, que lleva por nombre comercial Lit-Control pH meter ®, ha superado la fase de aprobación regulatoria y se espera su comercialización para finales de este año 2014.

DISPOSITIVO FABRICADO

En una primera aproximación del sistema ISFET/REFET diferencial fabricado se utilizaron chips individuales sensibles a pH con la puerta de Si_3N_4 . El dispositivo fabricado consiste en dos chips tipo ISFET, pegados sobre una PCB, con tiras de cobre para permitir el contacto eléctrico de los chips hacia componentes exteriores (Figura 5-8). Se fabricó un electrodo de oro mediante electrodeposición sobre la placa PCB como elemento de referencia del sistema sensor. La encapsulación de los chips se realizó mediante metodología estándar fotolitográfica de la resina DABA. Se realizó una protección con la misma resina de todo el sistema, chips y tiras de cobre incluidas, dejando libre una apertura de 1 mm de diámetro sobre las puertas de los ISFETs. Se pegó un depósito de PDMS con un canal microfluídico, como el presentado en la sección anterior, con un volumen de 17.5 nL.

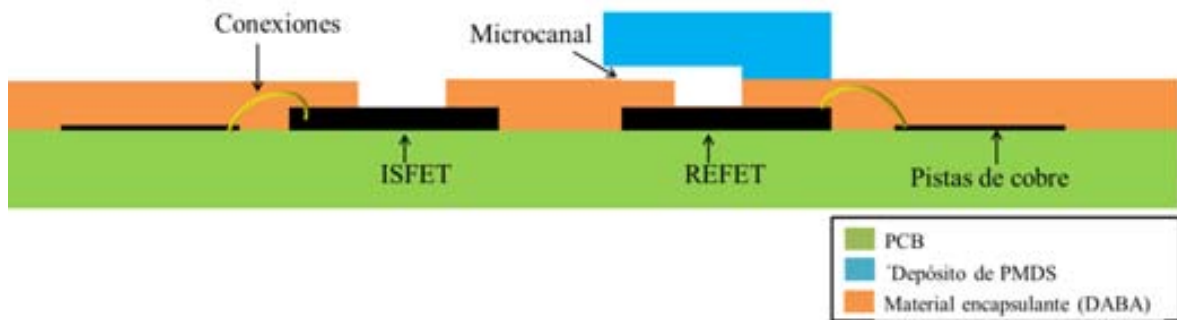


Figura 5-8 Diagrama (no a escala) de la sección trasversal del dispositivo ISFET/REFET pegado sobre una PCB y encapsulado con DABA. Se muestra el depósito en PDMS pegado sobre el REFET con el microcanal.

Los dispositivos sensores que se exponen en esta sección fueron desarrollados para la fase de prueba de concepto del dispositivo Lit-Control pH meter®. Para la fase de ensayos de validación y prueba de concepto, el GTQ puso a punto una metodología de encapsulación e implementación del REFET a nivel de oblea, con el fin de reducir costes y tiempo de fabricación. Se está trabajando también en la simplificación del proceso de encapsulado manteniendo los ISFETs aislados del sustrato, bien usando obleas tipo SOI, o bien formando transistores dentro de una región de semiconductor aislada del resto del sustrato mediante una unión tipo p-n.

El dispositivo de autodiagnóstico fabricado por la empresa Devicare S.L. se implementó en un vaso de muestras de orina estándar, con una tapa especial. Esta tapa incluye, además del dispositivo sensor de pH que sobresale hacia el líquido contenido en el vaso, circuitos electrónicos para la lectura de la señal del sensor y el cálculo de pH. El esquema del prototipo Lit-Control pH meter® se muestra en la Figura 5-9. La superficie superior externa de la tapa incluye un botón y una pantalla que muestra el pH medido y mensajes que indican al paciente la forma de proceder en relación con el pH medido. El vaso de muestras de orina estándar contiene disolución tampón de pH 6.00, la misma solución contenida en el depósito de PDMS sobre el REFET. El objetivo de mantener el dispositivo sensor en este líquido mientras no es usado es favorecer la renovación por difusión de la solución dentro del depósito a través del microcanal, de manera que se alargue el tiempo de vida del sensor indefinidamente. Además, este tampón sirve para realizar una calibración automática a un punto cuando se enciende el dispositivo, de manera que se le evita al usuario cualquier tipo de operación de mantenimiento.

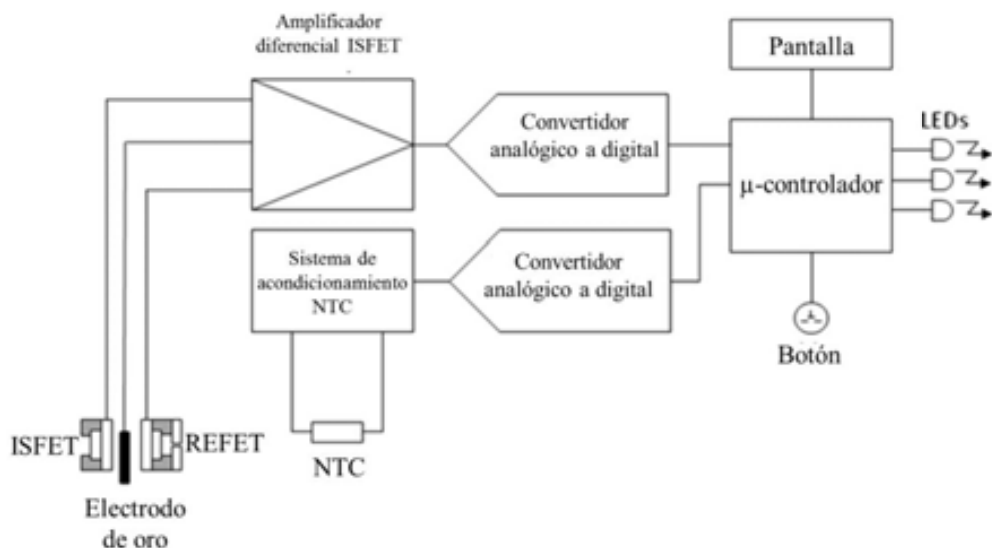


Figura 5-9. Esquema eléctrico del dispositivo Lit-Control pH meter ® fabricado.

5.3.1 METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN

La caracterización electroquímica del sistema ISFET/REFET fabricado se determinó mediante la evaluación de la respuesta a cambios de pH del ISFET frente al REFET. La estabilidad con el tiempo del dispositivo se evaluó determinando la variación en la sensibilidad a cambios de pH del ISFET frente al REFET, realizando una medida semanal durante 5 semanas.

Además de la caracterización realizada en el IMB-CNM, para determinar la validez del dispositivo Lit-Control pH meter ®, el Laboratorio de Litiasis Renal de la Universidad de las Islas Baleares analizó la orina de 30 voluntarios humanos. Para ello se recogió la orina en recipientes estériles y se analizaron inmediatamente, por duplicado y de manera aleatoria, por dos operadores plenamente capacitados, utilizando tres métodos: mediante un pH-metro calibrado, tiras reactivas de orina y dispositivo Lit-Control pH Meter ®. Cada voluntario firmó el consentimiento y el protocolo de estudio fue aprobado por la junta de revisión institucional de la Comunidad de las Islas Baleares (IB no. 2029/13 PI).

5.3.2 RESULTADOS

En la Figura 5-10 a y b se muestra la imagen del dispositivo sensor y del dispositivo Lit-Control pH meter ® fabricados, respectivamente.

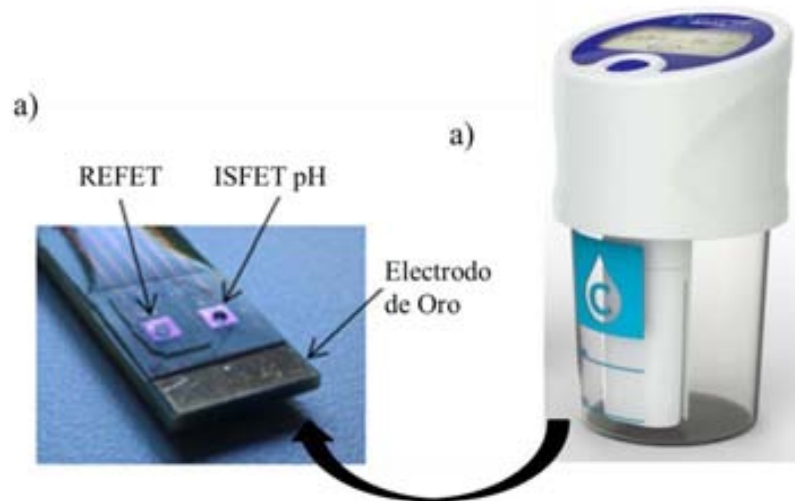


Figura 5-10. a) Imagen del dispositivo sensor fabricado. b) Imagen del Lit-Control pH meter ®, con su tapa especial.

En la Figura 5-11 se muestran los calibrados de 3 ISFETs de pH frente a REFETs en un rango de pH de 1.8 a 9.9. En Tabla 5-1 se recogen los datos de sensibilidad y linealidad obtenidos. Los valores de repetitividad y reproducibilidad de la sensibilidad de los sistemas ISFET/REFET evaluados son comparables con los reportados utilizando electrodos de referencia comerciales [26], confirmando la validez analítica del dispositivo fabricado. Se evaluó la variación de la sensibilidad de la respuesta de tres sistemas ISFET/REFET durante 5 semanas realizando una calibración a dos puntos, pH 4 y 7 una vez por semana, obteniéndose pendientes con valores de 54.72 mV/dec, 55.11 mV/dec y 54.71 mV/dec, respectivamente. La desviación estándar de las medidas, inferior a 1 mV/dec en los tres sistemas, demuestra la estabilidad de los sistemas fabricados en el tiempo.

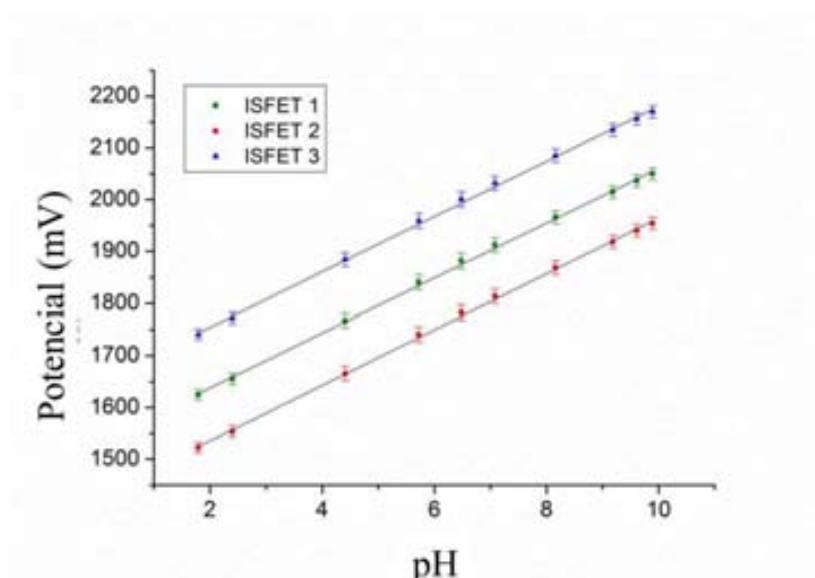


Figura 5-11. Curvas de calibración para tres sistemas ISFET/REFET.

Tabla 5-1. Características de respuesta de 3 ISFETs de pH, n = 3, vs REFET.

ISFET	Pendiente [mV/pH]	R ²
1	53.30 ± 0.51	0.9989
2	55.79 ± 0.49	0.9991
3	53.56 ± 0.45	0.9989

En la Figura 5-12 a se muestra la respuesta característica en muestras de orina fresca para un pH-metro comercial y para tiras de pH en la orina fresca y en la Figura 5-12 b para el dispositivo Lit-Control pH meter ®. Los coeficientes de correlación de Pearson para la tira de pH y el nuevo dispositivo fueron 0,922 y 0,993, r respectivamente. El dispositivo Lit-Control pH meter ®, con errores máximos de 0.1 unidades de pH, es suficientemente preciso para permitir el control de la litiasis.

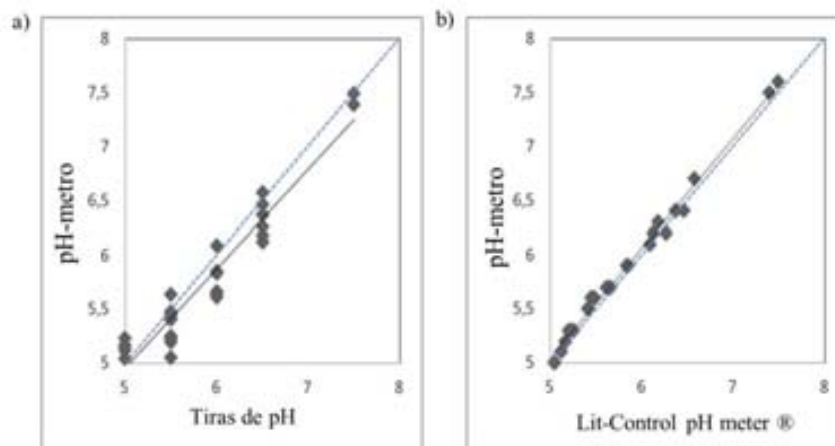


Figura 5-12. Respuesta característica en muestras de orina fresca entre a) el pH-metro comercial y las tiras de pH y b) el nuevo dispositivo en la orina fresca.

La alta prestación analítica del dispositivo fabricado, demuestra la viabilidad del sistema ISFET/REFET de pH con chips individuales integrados en un mismo sustrato reivindicado en la patente [38].

La sencillez de manipulación del dispositivo fabricado y larga vida del mismo, favorecida por la posibilidad de regeneración automática del líquido de referencia interno y la calibración automática antes de cada medida, lo hace una herramienta adecuada para el control y prevención de la formación de piedras en el riñón.

Las posibilidades de detección multiparamétrica con este tipo de sistema diferencial abren las puertas a la fabricación de dispositivos de autodiagnóstico simultáneo de diversas enfermedades.

5.4 SISTEMA DE MONITORIZACIÓN AUTOMÁTICA DE CULTIVOS CELULARES

Como ya se comentó en el Capítulo 3, los sensores electroquímicos evaluados en el marco de esta tesis son analíticamente adecuados para determinar parámetros de interés en cultivos celulares, pH, O₂, glucosa, ion potasio y conductividad, pero su configuración en forma de tiras individuales los hacen incompatibles con los equipos y metodologías utilizados rutinariamente en biología. En el Capítulo 4 se mostró el desarrollo de una tecnología de integración de estos sensores con estructuras microfluídicas, que abre la posibilidad de dirigir pequeños volúmenes de la muestra hacia los sensores, evitando así el contacto directo de éstos con las células.

En esta sección se presenta la fabricación de un sistema compacto que permite la monitorización del medio extracelular de cultivos celulares, durante periodos de tiempo relativamente largos (días), de manera autónoma, mediante una metodología mínimamente invasiva del cultivo, compatible con las metodologías y dispositivos usados habitualmente en biología y con una alta prestación analítica.

El dispositivo fabricado consiste en un sistema ISFET/REFET basado en el concepto *in-situ sampling/ex-situ sensing* [177]. En la Figura 5-13 se muestra un esquema, no a escala, del sistema propuesto, donde se aprecian los dos chips individuales integrados sobre la PCB y los canales de muestreo que conectan flúdicamente el sistema de medida con un plato MIT con 6 pozos de cultivo. Con la ayuda de componentes externos miniaturizados, bombas y válvulas, permite recoger muestras del cultivo automáticamente *in-situ*, realizar la medida y calibrar el sistema entre medidas *ex-situ*.

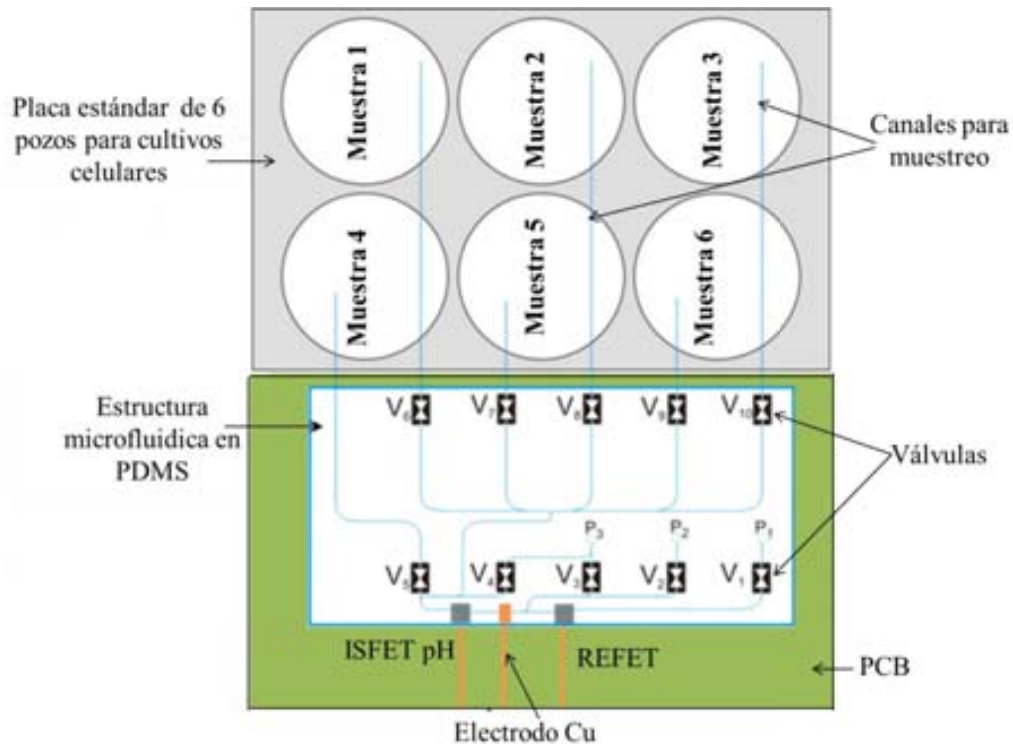


Figura 5-13. Esquema del sistema propuesto para el control de cultivos celulares. Se muestra la PCB con el par ISFET/REFET, la estructura microfluidica implementada sobre este sustrato, las válvulas externas sobre los canales (V₁ – V₁₀) y los canales de muestreo que conectan fluidicamente el sistema de medida con un plato con 6 pozos de cultivo.

SISTEMA ELECTROQUÍMICO Y ESTRUCTURA MICROFLUÍDICA INTEGRADA

Se han utilizado dos chips tipo ISFET con la puerta de nitruro de silicio (Si₃N₄). El proceso de integración y encapsulación de los chips en el sustrato PCB desarrollado en la sección 4.2, asegura la minimización del volumen interno del sistema, permitiendo realizar muchas tomas de muestras de los cultivos sin variar prácticamente su volumen y por tanto asegurando su integridad. Como elemento de referencia del sistema se utilizó un electrodo de cobre (Cu) fabricado sobre la placa PCB mediante grabado químico al mismo tiempo que las pistas de conexión de los chips.

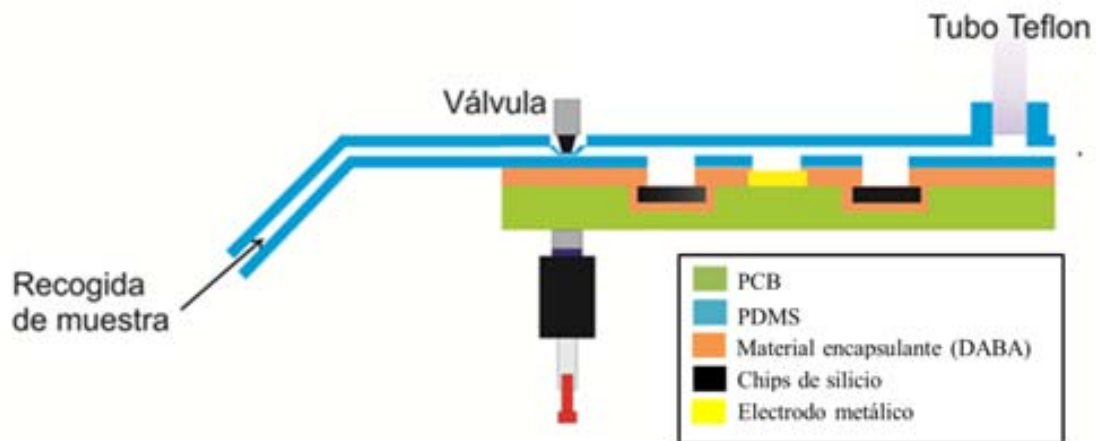


Figura 5-14. Diagrama (no a escala) de la sección transversal del dispositivo ISFET/REFET integrado sobre una PCB y encapsulado con DABA. Se muestran los canales microfluídicos en PDMS pegados sobre ambos chips, un canal de recogida de muestra, una válvula para el control del líquido, y el tubo de teflón para entrada y salida de fluido.

El diseño de los canales de la estructura microfluídica permite trabajar en un modo ISFET/REFET diferencial. Con ayuda de las válvulas de presión se consigue mantener invariante el líquido de referencia sobre el REFET, mientras se varía el líquido de medida sobre el ISFET y el elemento de referencia de Cu. La estructura fabricada consta de dos capas, la capa microfluídica, que contiene los canales del sistema según el diseño mostrado en la Figura 5-15, y la capa sustrato, sobre la que se pega la capa anterior cerrando los canales. En la capa sustrato se crearon aperturas circulares de 1 mm de diámetro, que permiten el contacto entre el líquido de medida y los ISFETs y el electrodo de Cu. El ensanchamiento en el canal mostrado en la Figura 5-15, coincide con estas aperturas de la capa sustrato, y se denomina cámaras de medida de la capa microfluídica. Para el diseño de la estructura microfluídica se determinó la distancia óptima entre chips, atendiendo a un compromiso entre la necesidad de mantener los chips alejados para disminuir la contaminación de las soluciones sobre los sensores sin aumentar la resistencia en el canal por encima de 1.5 M Ω . Para canales de 250 μm de ancho y 60 μm de alto se calculó una distancia máxima entre chips de 8.5 mm para soluciones PBS estándar. El tamaño final del sistema de 20 cm x 10 cm, viene delimitado por el tamaño de las válvulas de presión, limitando la distancia mínima entre canales. El espesor máximo de la capa de PDMS de sustrato, de 60 μm , atiende a la necesidad de reducir el volumen de la cámara de medida, para facilitar la renovación total del líquido y minimizar el volumen interno del sistema. El espesor máximo de la capa microfluídica, de 180 μm de espesor, responde a la necesidad de flexión y colapso de la pared superior de los canales bajo la acción de la válvula de presión.

El molde con la estructura a replicar en PDMS se fabricó en PSA con un plotter de corte, para tener una mayor flexibilidad para modificar el diseño. El pegado de las capas microfluidica y sustrato se realizó mediante oxidación de la superficie de PDMS con plasma de O_2 . El pegado de la capa sustrato al polímero encapsulante DABA que recubre la PCB y los chips se realizó a través de APTMS, tal y como ya se ha explicado en secciones anteriores. La alineación entre las capas al ser pegadas es un aspecto crítico en la fabricación del sistema, ya que, para tener un flujo correcto en el sistema, las cámaras de medida de la capa microfluidica y las aperturas en la capa sustrato deben coincidir correctamente entre ellas y con los chips encapsulados. Este proceso se ve dificultado por la complicada manipulación de áreas grandes de PDMS de reducido espesor.

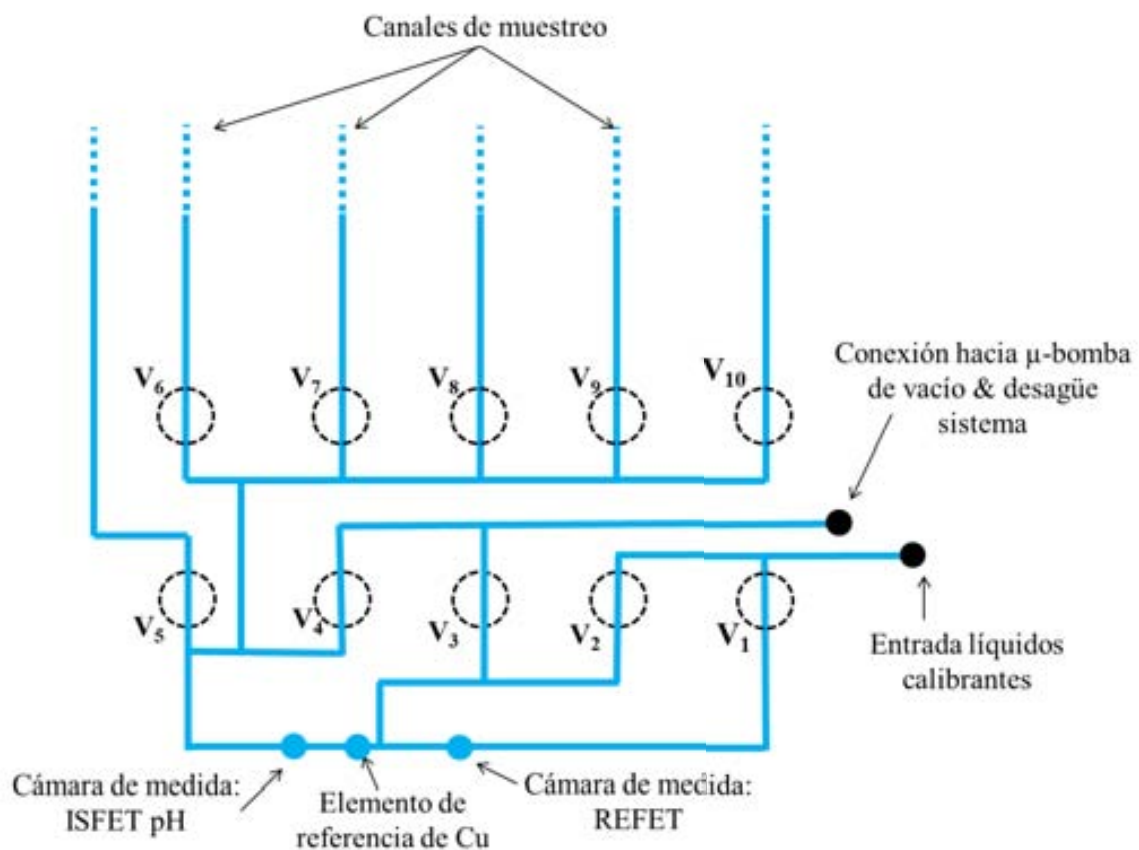


Figura 5-15. Diagrama, no a escala, de la estructura microfluidica. Se muestran los canales de medida, los canales de muestreo, las cámaras de medida para el ISFET de pH y para el REFET, la posición del elemento de referencia de Cu y la entrada de líquidos calibrantes y la conexión hacia la μ -bomba de vacío y desagüe del sistema. También se ha representado la posición de las válvulas (V_1 - V_{10}) sobre los canales.

Las conexiones fluidicas de los canales se realizaron con tubos de plástico insertados a presión en orificios practicados en los extremos de los canales con un punzón. Este tipo de conexiones son muy prácticas por su sencillez, pero imposibles en estructuras de PDMS de espesores de pocas micras, incapaces de mantener mecánicamente estables los tubos. Para solucionar este problema, una vez fabricada la estructura de PDMS, y antes de practicar los orificios de entrada sobre los

canales, se añadió mezcla prepolimérica de PDMS alrededor de la zona de entrada de los canales, delimitándose mediante un molde cilíndrico de 5 5 mm² y 5 mm de altura, que se retira una vez polimerizada la mezcla. La altura de este bloque de PDMS, a través del cual se practica el orificio al canal, proporciona la suficiente estabilidad mecánica al tubo de plástico insertado para realizar las conexiones microfluídicas al sistema. En la Figura 5-14 se muestra un detalle de estas conexiones. Este tipo de conexiones generan volúmenes muertos en las interfaces tubo-canal. Es por ello que se utilizaron para el acoplamiento del sistema microfluídico a la μ -bomba peristáltica y a las soluciones de calibrado, pero no así para la conexión hacia el cultivo celular, donde el requerimiento de minimización del volumen de muestra es indispensable para mantener la integridad del cultivo. La conexión del canal microfluídico y el cultivo se realizó mediante extensiones de los propios canales de PDMS, denominados canales de muestreo en la Figura 5-15, que forman parte de la estructura microfluídica y salen directamente de ésta y conectan los cultivos celulares con el sistema sensor. En la Figura 5-13, Figura 5-14 y Figura 5-15 se muestran detalles desde diferentes perspectivas de estos canales de muestreo.

El pegado irreversible de la estructura de PDMS a los sensores encapsulados, si bien proporciona una muy buena estabilidad mecánica al sistema, no es un proceso práctico durante el desarrollo de un diseño iterativo, ya que no permite la reutilización de los diferentes componentes del sistema una vez ensamblados. Es por ello que para agilizar el proceso de puesta a punto del sistema se desarrolló una metodología de integración alternativa, que permitía disponer de los sensores individuales, pudiendo ser pegados y despegados de la estructura microfluídica según fuese necesario. Para ello los chips de silicio preencapsulados a nivel de oblea con una fina capa de 18 μ m de DABA se fijaron sobre tiras de PCB individuales estándar. Se realizó la soldadura de las conexiones de los chips hacia las pistas y se protegió con silicona. El electrodo de referencia de Cu se grabó sobre la tira de PCB con grabado químico y se encapsuló con una fina capa de DABA de x μ m de espesor. El pegado de la estructura microfluídica de PDMS a las tiras de PCB se realiza con PSA de doble cara al film de PDMS, alineando la parte sensora de los chips con unas aperturas circulares de 1 mm de diámetro practicadas en el film de PDMS bajo las cámaras de medida. La reversibilidad de esta unión permite la reutilización o recambio de los sensores y la estructura microfluídica, según sea necesario.

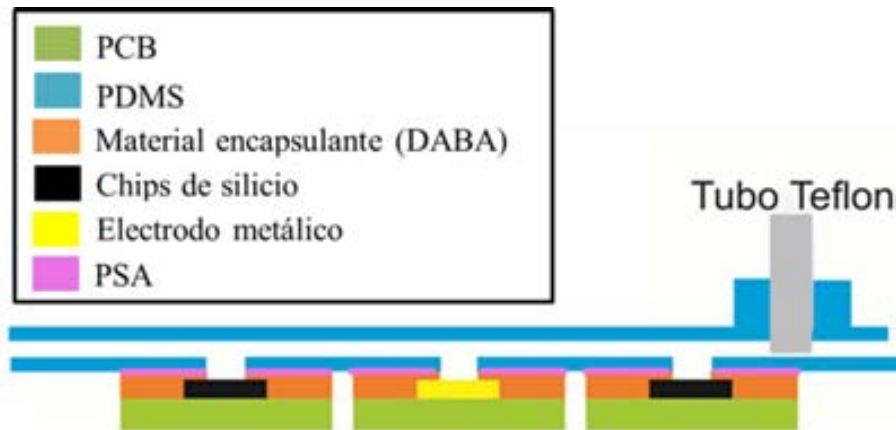


Figura 5-16 Diagrama (no a escala) de la sección transversal del ISFET y del REFET, pegados individualmente sobre tiras de PCB, y pre-encapsulados con DABA. Se muestra el film de PDMS con las aperturas sobre cada sensor que sirve de base para la estructura microfluídica y el film de PSA de doble cara que permite mantener el sistema sellado.

CONTROL AUTOMÁTICO DE LOS FLUIDOS

El sistema fabricado permite, con la ayuda de componentes externos miniaturizados como μ -bombas de vacío y válvulas, recoger muestras del cultivo automáticamente *in-situ* y realizar la medida y calibrar el sistema entre medidas *ex-situ*.

El movimiento de los líquidos en el interior de los canales se controló con una μ -bomba de vacío conectada a la salida de un canal de la estructura y 10 válvulas que permiten o impiden el paso de fluidos según sea necesario (Figura 5-15). Para minimizar el volumen del sistema se utilizaron válvulas fabricadas especialmente para la aplicación que no añaden volúmenes muertos y tienen un consumo eléctrico muy bajo. Se trata de válvulas de presión del tipo *siempre abiertas*, sobre las que se actúa únicamente cuando se necesita cerrar el paso del líquido, colapsando la pared de PDMS sobre el canal. En la Figura 5-17 se muestra el modo de funcionamiento de las válvulas, que consisten en un solenoide bi-estable con un imán sobre el émbolo móvil, colocadas estratégicamente en cada punto de la estructura en el que se quiera tener control del fluido (Figura 5-15). En la superficie superior de la estructura microfluídica, sobre estos puntos estratégicos, se colocaron imanes con punta que al activar el solenoide se ven atraídos por el imán inferior, colapsando el canal en ese punto al ejercer presión. Se fabricaron estructuras de PMMA que soportan tanto los solenoides como los imanes con punta en su posición.

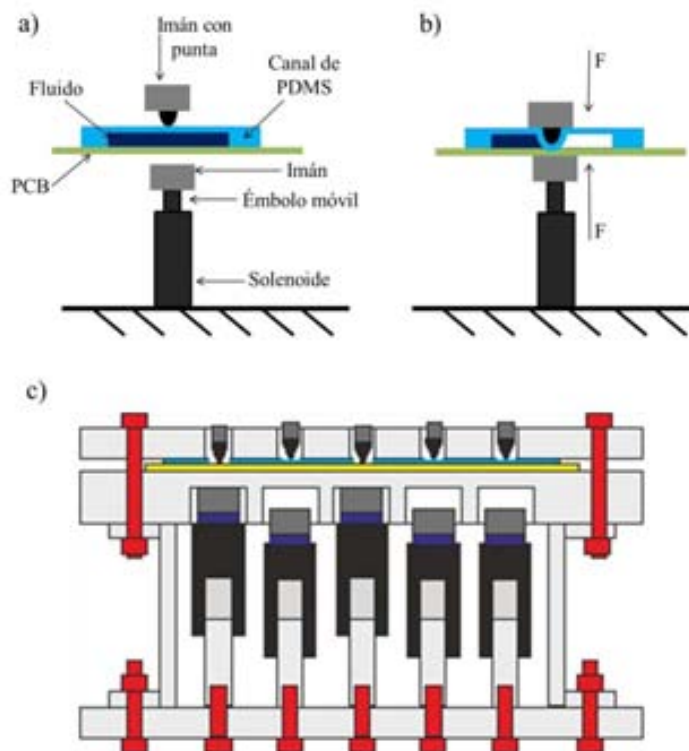


Figura 5-17. Esquema de funcionamiento de las válvulas de presión. a) canal abierto. b) canal cerrado. c) montaje final de las válvulas en la estructura de PMMA.

METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN

La conexión diferencial entre el ISFET sensible a pH y el REFET se realizó a través de un canal microfluido común que conecta ambos dispositivos. Las válvulas fabricadas permiten el control del líquido dentro del canal, posibilitando el flujo independiente de dos disoluciones dentro del sistema.

Se han desarrollado dos modos de trabajo del sistema, esquematizados en la En la Figura 5-18: el modo calibrado y el modo medida. En la Tabla 5-2 se muestran valores teóricos de tiempo y volumen necesarios para estos modos de trabajo del sistema diseñado. Así por ejemplo, para un cultivo celular de 5 ml de volumen, se podría realizar una monitorización del medio a la hora durante 3 días consecutivos, consumiendo tan solo el 5 % del volumen inicial de la muestra. Son condiciones comunes para ambos modos de trabajo la solución de referencia sobre el REFET, PBS de pH 7, y la presión que ejerce la μ -bomba sobre el sistema a través del canal de salida, -10 kPa.

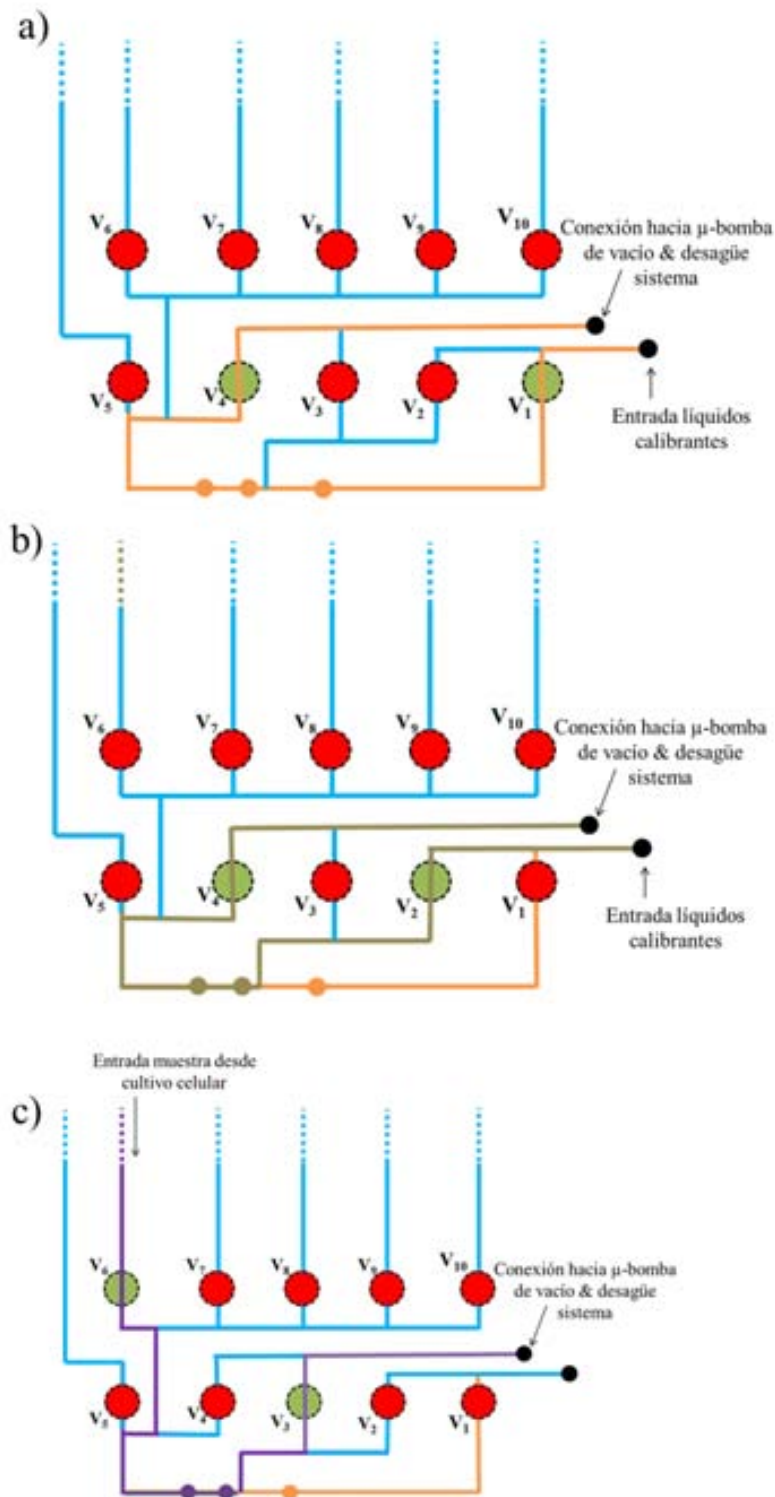


Figura 5-18. Esquema de modos de funcionamiento del sistema microfluídico fabricado. a) Modo Calibrado 1, b) Modo Calibrado 2; c) Modo Medida.

Tabla 5-2. Valores teóricos de tiempo y volumen para cada modo a – 10 kPa.

Presión = -10 kPa								
	Calibración 1	Calibración 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
Q (μl/s)	1.0	1.1	1	0.6	0.9	0.6	0.8	0.7
Volumen (μl)	2.1	1.8	2.1	3.3	2.3	2.5	3.5	3
Time (s)	2.0	1.7	2.0	5.9	4.0	4.9	3.3	4.5

MODO CALIBRADO

Para asegurar la fiabilidad de las medidas realizadas en experimentos de varias horas o días de duración, como es el caso de los cultivos celulares, es necesario tener conocimiento del estado de los sensores durante ese tiempo [178]. Se ha desarrollado una metodología de trabajo en modo calibrado, que permite determinar los parámetros de los sensores sin interferir en el cultivo celular bajo monitorización.

Para ello se realiza una calibración a dos puntos del ISFET, a pH 7 y pH 4, manteniendo el REFET constantemente a pH 7. Para el primer punto de calibrado (Figura 5-18 a) se hace pasar 2.1 μl de PBS pH 7 por los dos chips, activando la μ-bomba durante 2 s, mientras se mantienen abiertas las válvulas 1 y 4. Para el segundo punto de calibrado (Figura 5-18 b) se hace pasar 1.8 μl de PBS pH 4 por el ISFET, mientras se mantiene la solución de pH 7 sobre el REFET. Para ello se activa la μ-bomba durante 2 s mientras se mantienen abiertas las válvulas 2 y 4.

MODO MEDIDA

El sistema fabricado es compatible con placas de 6 pozos, por lo que pueden llevarse a cabo medidas simultáneas del pH extracelular de hasta 6 cultivos. Una vez calculada la recta de calibración del sistema se analizaron muestras de pH comprendidos entre 2 y 10, valores que se midieron simultáneamente con un pH-metro comercial. Las medidas se realizaron manteniendo abierta la válvula 4 mientras se fueron abriendo secuencialmente las válvulas 5 a 10, en función de la muestra a analizar. El tiempo de actuación de la μ-bomba y el volumen de muestra varía según el canal utilizado, como se indica en la Tabla 5-2.

5.4.1 RESULTADOS

En la Figura 5-19 se muestra una imagen del sistema de monitorización automática de cultivos celulares fabricado, con sus componentes principales.

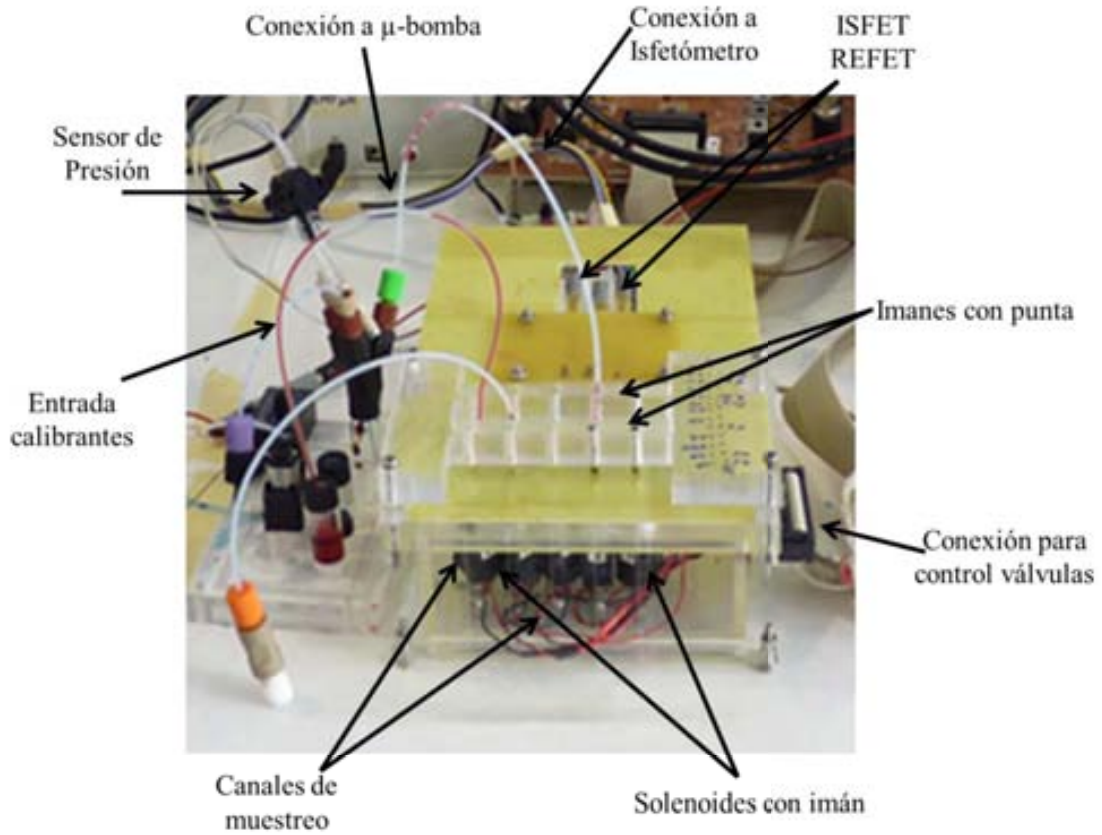


Figura 5-19. Imagen del sistema para control de cultivos celulares, donde se muestran los principales componentes.

La Figura 5-20 muestra simulaciones de los modos calibrado y medida. En la Figura 5-20 a superior se observa el modo de calibrado 1, donde tanto el ISFET como el REFET están en contacto con el líquido de calibrado 1 (color rojo). En la Figura 5-20 a inferior se muestra el modo calibrado 2, donde el REFET sigue en contacto con el líquido de calibrado 1 mientras el ISFET se encuentra en contacto con el líquido de calibrado 2 (color verde). No se observa mezcla de las soluciones, lo que demuestra la viabilidad del diseño del sistema para conseguir un sistema diferencial ISFET/REFET con control dinámico de las muestras. En la Figura 5-20 b se muestra la independencia fluidica de los canales de muestreo durante el modo de medida.

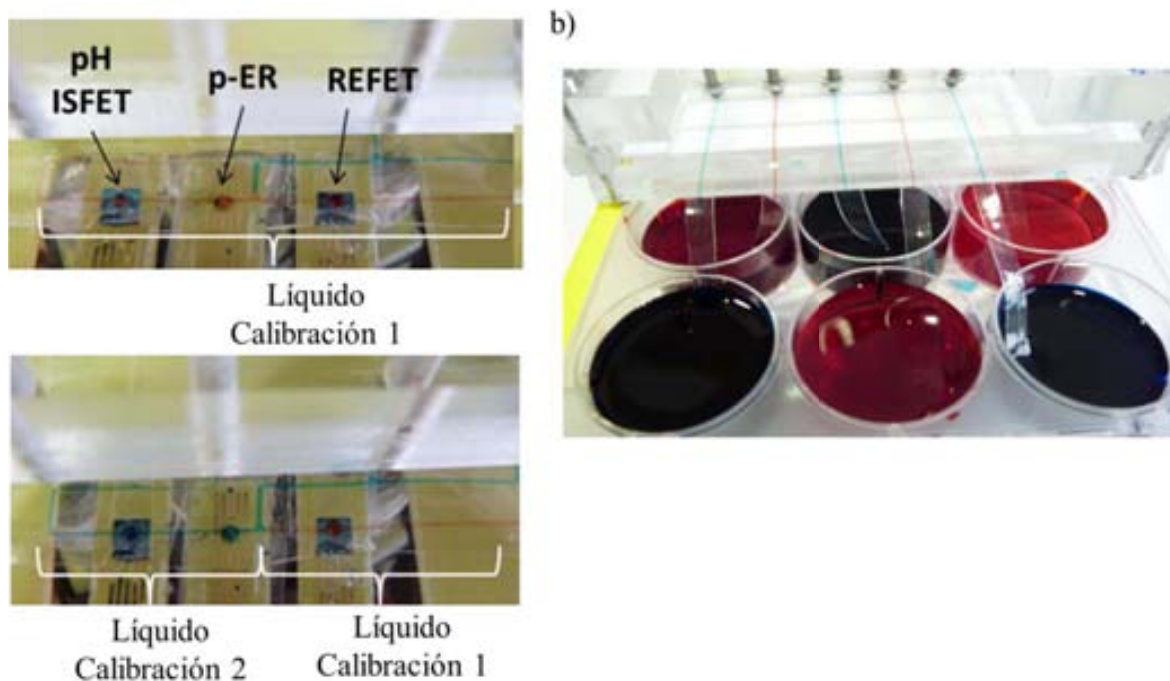


Figura 5-20. Imágenes de los modos calibrado y medida del sistema. a) Imagen superior, sistema funcionando en modo calibrado a) calibrado 1, ISFET y REFET en contacto con la misma disolución (tinta roja). Imagen inferior: modo calibrado 2 ISFET en contacto con la solución de calibrado 2 (tinta verde) e ISFET en contacto con la solución calibrado 1 (tinta roja). b) Imagen de los canales de muestreo en funcionamiento.

En la Figura 5-21 a se muestra la caracterización del sistema para el modo calibrado a dos puntos, con una pendiente de 47.7 ± 2.0 mV/pH ($N = 3$), cuya extrapolación coincide perfectamente con los valores experimentales obtenidos en modo medida para una muestra de pH 9. La caracterización del modo de medida se realizó registrando la respuesta del sistema en muestras con valores de pH entre 2 y 10. En la Figura 5-21 b se observa la alta correlación de la señal obtenida para la caracterización de las variaciones del pH de la muestra, entre el sistema ISFET/REFET y un pH-metro comercial, con una relación de 0.963. Figura 5-21 c se muestra el registro simultáneo de variaciones en el pH entre 1.8 y 9.9, en 6 muestras, a través de los 6 canales de muestreo. Se observa la buena reproducibilidad en tres medidas. En la Figura 5-21 d se muestra el registro dinámico de las variaciones de pH en la muestra. Cabe destacarse el ruido en la señal, debido a la formación de burbujas de aire en los canales. Esto es debido a la permeabilidad del PDMS al oxígeno y al hecho de trabajar aplicando presiones negativas sobre el sistema. Resolver este problema es imprescindible para trabajar en modo autónomo, ya que estas burbujas pueden llegar a aislar eléctricamente los ISFETs durante el experimento. Otro aspecto a mejorar es la fiabilidad de las válvulas, cuyo funcionamiento simultáneo no es sencillo debido a la necesidad de ajustar la altura de cada una en el montaje. Este hecho hizo necesario en algunos experimentos realizar un

control manual del cerrado de los canales, con tornillos que fueron presionados contra los canales para colapsarlos y cerrados.

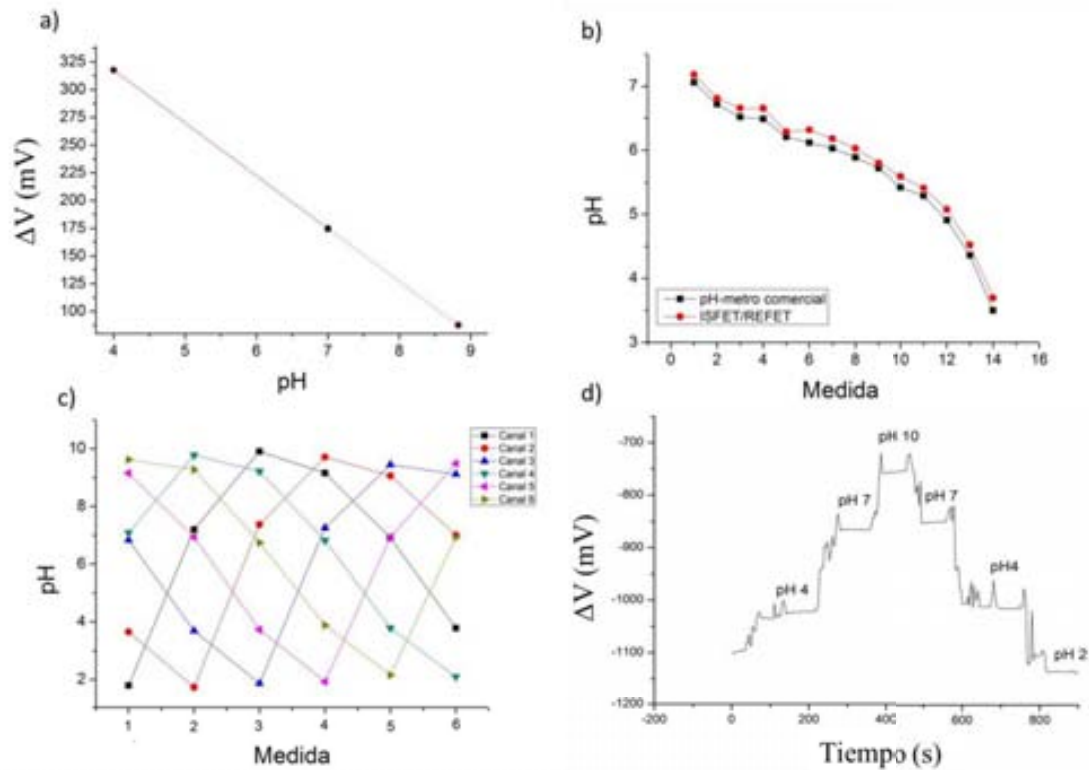


Figura 5-21. a) Recta de calibrado a dos puntos para el modo de calibrado. b) Respuesta comparativa entre el sistema ISFET/REFET y un pH-metro comercial. c) Registro simultaneo de variaciones de pH en 6 muestras, a través de los canales de muestreo. se muestra la caracterización simultánea de 6 muestras, con valores comprendidos entre 1.8 y 9.9, a través de los 6 canales de muestreo. d) Registro dinámico de las variaciones de pH en la muestra.

El sistema fabricado responde a las necesidades expuestas en el Capítulo 3 para poder aplicar sensores fabricados con tecnología microfluidica en cultivos celulares. El diseño realizado, con una serie de canales de muestreo, que minimizan el volumen de muestra por medida, permite monitorizar muestras sin necesidad de tener contacto directo con las células, evitando así la contaminación de los sensores y la alteración de los cultivos. El sistema permite la monitorización durante tiempos largos (horas o días), ya que el sistema de válvulas implementado permite tener acceso directo a los electrodos durante el tiempo que dura el experimento y posibilitando así el calibrado de los sensores entre medidas. Para conseguir un sistema plenamente automático se hace necesario mejorar la fiabilidad y robustez de las válvulas y evitar la formación de burbujas de aire en el interior del sistema. Se está estudiando la implementación de servomotores en el sistema, que permitan cerrar los canales mediante una actuación sobre estos más precisa y controlada. Para prevenir la formación de burbujas de aire que aislen eléctrica y fluidicamente los componentes del sistema se está estudiando un cambio de diseño en la actuación de las válvulas. En lugar de realizar

la presión de colapso sobre los canales desde la capa microfluídica, realizarla desde la capa sustrato, a través de unas aperturas realizadas en la PCB. Esto permitiría aumentar el espesor de la capa microfluídica, y minimizar el área de PDMS de espesor bajo por donde difunde el gas que produce las burbujas.

El desarrollo de un sistema universal, fabricado por módulos ensamblables, que permita la detección automática de múltiples parámetros abriría las puertas a nuevos campos de aplicación.

6 CONCLUSIONES

El trabajo de investigación realizado en el marco de esta tesis se ha centrado en el desarrollo de una tecnología de integración de sensores microelectrónicos y estructuras microfluídicas para obtener sistemas de medida funcionales y compactos. Se han fabricado varios prototipos/sistemas con la tecnología desarrollada para su aplicación a medidas de parámetros químicos en sistemas biológicos.

A continuación se resumen las conclusiones del trabajo desarrollado y los resultados más importantes a los que se ha llegado.

Se ha demostrado que los sensores fabricados con tecnología microelectrónica tienen unas características de respuesta muy similares a los electrodos comerciales equivalentes. Su utilización para las aplicaciones planteadas es por lo tanto perfectamente viable.

- Se ha demostrado que si bien los ISFETs de pH, ISFETs de ion potasio, los microelectrodos de oro y los IDE estudiados son adecuados para monitorizar la actividad celular midiendo cambios de parámetros químicos en el medio extracelular, su diseño en forma de tiras individuales los hace inviables para medir cultivos celulares. Principalmente debido a que al estar los sensores en contacto directo con las células, su área sensible puede ser bloqueada no pudiéndose verificar o calibrar su estado durante el tiempo que dura el experimento. Además, su configuración es incompatible con la medida simultánea de varios cultivos y con los equipos y metodologías utilizados en biología.
- Se ha desarrollado un sensor de glucosa, basado en la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa en la superficie de un microelectrodo de oro mediante tres metodologías: adsorción física, electroadsorción y enlace covalente a través de grupos silanos. Se ha implementado una membrana de difusión basada en un polisilano (APTMS) para alargar la respuesta lineal del biosensor. Se llegó a la conclusión de que si bien el rango lineal se alargó de 3.5 mM a 8.5 mM, todavía no es suficiente para medir las variaciones esperadas de este parámetro en los cultivos celulares (por encima de 10 mM). En un futuro se debería incrementar el grosor de la membrana o disminuir su porosidad. Esto debería conducir también a la obtención de sensores controlados por difusión, que tienen mejor estabilidad y reproducibilidad.
- Se ha desarrollado el protocolo de fabricación y evaluación de electrodos de pseudo-referencia sobre microelectrodos de oro. Si bien se demostró la estabilidad y robustez de estos electrodos, su aplicabilidad está limitada a medios donde la concentración de cloruros sea elevada y constante. En trabajos futuros se podría integrar microcanales sobre el

electrodo de Ag/AgCl que permitan obtener, de una manera sencilla y rápida, uniones líquidas de bajas pérdidas

Se ha desarrollado una tecnología de integración de sensores microelectrónicos y estructuras microfluídicas que, en base a la integración de múltiples sensores en un mismo sustrato, permite la fabricación de LOCs compactos y analíticamente potentes. Se ha desarrollado un proceso de pegado que proporciona una unión de calidad entre los sensores encapsulados y la estructura microfluídica, compatible con los componentes selectivos de los sensores previamente depositados.

- Se ha desarrollado una estrategia para la monitorización de pH en sistemas LOC que, basado en la implementación de canales microfluídicos sobre sensores microelectrónicos permite trabajar en modo ISFET/REFET diferencial, simplificando la fabricación del sistema al eliminar la necesidad de integrar un electrodo de referencia.
- Se ha demostrado la viabilidad de la tecnología desarrollada mediante la fabricación de tres sistemas/dispositivos para la medida de pH en sistemas biológicos:
 - Un dispositivo inalámbrico (o sensor RFID) para el análisis de pH que permite la monitorización del pH en medios de difícil acceso o cerrados.
 - Un dispositivo de autodiagnóstico para el control de litiasis renal, que permite la monitorización del pH de la orina.
 - Un LOC para la monitorización de parámetros químicos en cultivos celulares con seis canales de muestreo, que reducen el volumen de muestra por debajo de 4 μ l, permitiendo monitorizar cultivos celulares sin necesidad de tener los sensores en contacto directo con las células, evitando así la contaminación de los sensores y la alteración de los cultivos. Este sistema posibilita la monitorización durante tiempos largos (horas o días), ya que el sistema de válvulas implementado permite tener acceso directo a los electrodos durante el tiempo que dura el experimento y posibilitando así el calibrado de los sensores entre medidas. Para conseguir un sistema plenamente automático se requiere mejorar la fiabilidad y robustez de las válvulas y evitar la formación de burbujas de aire en el interior del sistema.

7 REFERENCIAS

1. Manz, A., N. Graber, and H.M. Widmer, *MINIATURIZED TOTAL CHEMICAL-ANALYSIS SYSTEMS - A NOVEL CONCEPT FOR CHEMICAL SENSING*. Sensors and Actuators B-Chemical, 1990. **1**(1-6): p. 244-248.
2. Araci, I.E. and P. Brisk, *Recent developments in microfluidic large scale integration*. Current Opinion in Biotechnology, 2014. **25**: p. 60-68.
3. Lee, A., *The third decade of microfluidics*. Lab on a Chip, 2013. **13**(9): p. 1660-1661.
4. Duffy, D.C., et al., *Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(23): p. 4974-4984.
5. Unger, M.A., et al., *Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography*. Science, 2000. **288**(5463): p. 113-116.
6. Chung, K., M.M. Crane, and H. Lu, *Automated on-chip rapid microscopy, phenotyping and sorting of C. elegans*. Nature Methods, 2008. **5**(7): p. 637-643.
7. Niu, X.Z. and A.J. deMello, *Building droplet-based microfluidic systems for biological analysis*. Biochemical Society Transactions, 2012. **40**: p. 615-623.
8. Liu, H. and R.M. Crooks, *Highly reproducible chronoamperometric analysis in microdroplets*. Lab on a Chip, 2013. **13**(7): p. 1364-1370.
9. Bruzewicz, D.A., M. Reches, and G.M. Whitesides, *Low-cost printing of poly(dimethylsiloxane) barriers to define microchannels in paper*. Analytical Chemistry, 2008. **80**(9): p. 3387-3392.
10. Tseng, P., et al., *Research highlights: printing the future of microfabrication*. Lab on a chip, 2014. **14**(9): p. 1491-5.
11. Kitson, P.J., et al., *Configurable 3D-Printed millifluidic and microfluidic 'lab on a chip' reactionware devices*. Lab on a Chip, 2012. **12**(18): p. 3267-3271.
12. Anderson, K.B., et al., *A 3D Printed Fluidic Device that Enables Integrated Features*. Analytical Chemistry, 2013. **85**(12): p. 5622-5626.
13. Bremond, N. and J. Bibette, *Exploring emulsion science with microfluidics*. Soft Matter, 2012. **8**(41): p. 10549-10559.
14. Martinez, A.W., et al., *Simple telemedicine for developing regions: Camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis*. Analytical Chemistry, 2008. **80**(10): p. 3699-3707.
15. Becker, H., *Mind the gap!* Lab on a Chip, 2010. **10**(3): p. 271-273.
16. Becker, H. and L.E. Locascio, *Polymer microfluidic devices*. Talanta, 2002. **56**(2): p. 267-287.
17. Whitesides, G.M., *The origins and the future of microfluidics*. Nature, 2006. **442**(7101): p. 368-373.
18. Becker, H., *Lost in translation*. Lab on a Chip, 2010. **10**(7): p. 813-815.
19. Becker, H., *One size fits all?* Lab on a Chip, 2010. **10**(15): p. 1894-1897.
20. Lee, N.Y., *Recent progress in lab-on-a-chip technology and its potential application to clinical diagnoses*. International Neurourology Journal, 2013. **17**(1): p. 2-10.
21. Becker, H., *It's the economy*. Lab on a Chip, 2009. **9**(19): p. 2759-2762.
22. Becker, H., *All I want for Christmas*. Lab on a Chip, 2011. **11**(9): p. 1571-1573.
23. Becker, H., *Collective wisdom*. Lab on a Chip, 2010. **10**(11): p. 1351-1354.
24. Alrifaiy, A., O.A. Lindahl, and K. Ramser, *Polymer-Based Microfluidic Devices for Pharmacy, Biology and Tissue Engineering*. Polymers, 2012. **4**(3): p. 1349-1398.
25. Skoog, D.A.L., J.J., *Análisis instrumental*. 1996: McGraw Hill.
26. Jimenez Jorquera, C.B., A.; Abramova, N.; Baldi, A., *ISFET Based Sensors: Fundamentals and Applications*, in *Encyclopedia of Sensors*. 2006. p. 151-196.

27. Morf, W.E., *The principles of Ion-Selective Electrodes and membrane transport*. 1981: Elsevier.
28. Zhang, W., et al., *Comparison of different methods for determining the selectivity coefficient using a magnesium-selective electrode*. *Analytica Chimica Acta*, 1998. **375**(3): p. 211-222.
29. Comte, P.A. and J. Janata, *FIELD-EFFECT TRANSISTOR AS A SOLID-STATE REFERENCE ELECTRODE*. *Analytica Chimica Acta*, 1978. **101**(2): p. 247-252.
30. Khanna, V.K., W. Oelssner, and U. Guth, *Interfacial and adhesional aspects in polyurethane (PUR) membrane coating on Si₃N₄ surface of ISFET gate for REFET fabrication*. *Applied Surface Science*, 2009. **255**(17): p. 7798-7804.
31. Fujihira, M., M. Fukui, and T. Osa, *CHEMICALLY MODIFIED PARYLENE GATE FIELD-EFFECT TRANSISTORS - PREPARATION OF PH INSENSITIVE PARYLENE GATE FOR CHEMICAL MODIFICATION*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1980. **106**(1-2): p. 413-418.
32. Errachid, A., J. Bausells, and N. Jaffrezic-Renault, *A simple REFET for pH detection in differential mode*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1999. **60**(1): p. 43-48.
33. Lai, C.S., et al., *Optimization of a PVC Membrane for Reference Field Effect Transistors*. *Sensors*, 2009. **9**(3): p. 2076-2087.
34. Kuroiwa, S., T. Shibasaki, and T. Osaka, *Effect of Surface Morphology on Ionic Response of Reference Field Effect Transistor*. *Electrochemistry*, 2010. **78**(2): p. 143-145.
35. Skowronska-Ptasinska, M., et al., *Reference field effect transistors based on chemically modified ISFETs*. *Analytica Chimica Acta*, 1990. **230**(0): p. 67-73.
36. EP85200263, *Ion concentration measurement system that employs measuring and reference field effect transistor electrodes sensitive to the same ion*. 1985.
37. Grases, F., et al., *A new device for simple and accurate urinary pH testing by the Stone-former patient*. SpringerPlus, 2014. **3**(1): p. 209.
38. Baldi Coll, A.D.-H., C.; Jimenez-Jorquera, C.; Fernandez-Sanchez, C.; Llobera, A.; Merlos, A.; Cadarso, A.; Burdallo, I.; Vera-Gras, F., *P201430180 Sensor de iones basado en medida diferencial y método de fabricación*, CSIC, Editor. 2014.
39. Bergveld, P., et al., *HOW ELECTRICAL AND CHEMICAL-REQUIREMENTS FOR REFETS MAY COINCIDE*. *Sensors and Actuators*, 1989. **18**(3-4): p. 309-327.
40. Hush, N.S., *ADIABATIC RATE PROCESSES AT ELECTRODES .1. ENERGY-CHARGE RELATIONSHIPS*. *Journal of Chemical Physics*, 1958. **28**(5): p. 962-972.
41. Wang, J., *Analytical Electrochemistry*. 2001: Wiley-VCH.
42. Pingarron, J., *Química electroanalítica, fundamentos y aplicaciones*, ed. Síntesis. 2003.
43. Dong, X.D., J.T. Lu, and C.S. Cha, *KINETIC-ANALYSIS OF THE ENZYME ELECTRODE COMPOSED OF GOX ADSORBED ON AN ALKANETHIOL SAM MODIFIED PT SURFACE*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1995. **381**(1-2): p. 195-201.
44. Strike, D.J., N.F. Derooij, and M. Koudelkahep. *ELECTRODEPOSITION OF GLUCOSE-OXIDASE FOR THE FABRICATION OF MINIATURE SENSORS*. in *4th International Meeting on Chemical Sensors*. 1992. Tokyo, Japan: Elsevier Science Sa Lausanne.
45. Rishpon, J. and S. Gottesfeld, *INVESTIGATION OF POLYPYRROLE GLUCOSE-OXIDASE ELECTRODES BY ELLIPSOMETRIC, MICROGRAVIMETRIC AND ELECTROCHEMICAL MEASUREMENTS*. *Biosensors & Bioelectronics*, 1991. **6**(2): p. 143-149.
46. Jimenez, C., et al. *GLUCOSE SENSOR-BASED ON AN AMPEROMETRIC MICROELECTRODE WITH A PHOTOPOLYMERIZABLE ENZYME MEMBRANE*. in *Euroensors VIII*. 1994. Toulouse, France: Elsevier Science Sa Lausanne.
47. Orozco, J., C. Jimenez-Jorquera, and C. Fernandez-Sanchez, *Gold nanoparticle-modified ultramicroelectrode arrays for biosensing: A comparative assessment*. *Bioelectrochemistry*, 2009. **75**(2): p. 176-181.
48. Bartlett, P.N. and K.F.E. Pratt, *MODELING OF PROCESSES IN ENZYME ELECTRODES*. *Biosensors & Bioelectronics*, 1993. **8**(9-10): p. 451-462.

49. Maines, A., D. Ashworth, and P. Vadgama, *Diffusion restricting outer membranes for greatly extended linearity measurements with glucose oxidase enzyme electrodes*. *Analytica Chimica Acta*, 1996. **333**(3): p. 223-231.
50. Vasileva, N. and T. Godjevargova, *Study of the effect of some organic solvents on the activity and stability of glucose oxidase*. *Materials Science and Engineering: C*, 2005. **25**(1): p. 17-21.
51. de la Rica, R., C. Fernández-Sánchez, and A. Baldi, *Polysilicon interdigitated electrodes as impedimetric sensors*. *Electrochemistry Communications*, 2006. **8**(8): p. 1239-1244.
52. Ives, J.G.J., J., *Reference electrodes, theory and practice*, ed. A. Press. 1961.
53. Reyes-Cruz, V., et al., *Electrochemical deposition of silver and gold from cyanide leaching solutions*. *Hydrometallurgy*, 2002. **65**(2-3): p. 187-203.
54. Suzuki, H., et al., *Problems associated with the thin-film Ag/AgCl reference electrode and a novel structure with improved durability*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 1998. **46**(2): p. 104-113.
55. Polk, B.J., et al., *Ag/AgCl microelectrodes with improved stability for microfluidics*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2006. **114**(1): p. 239-247.
56. Guth, U., et al., *Solid-state reference electrodes for potentiometric sensors*. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 2009. **13**(1): p. 27-39.
57. Zhou, J.H., et al., *Fabrication of a microfluidic Ag/AgCl reference electrode and its application for portable and disposable electrochemical microchips*. *Electrophoresis*, 2010. **31**(18): p. 3083-3089.
58. Safari, S., P.R. Selvaganapathy, and M.J. Deen, *Microfluidic Reference Electrode with Free-Diffusion Liquid Junction*. *Journal of the Electrochemical Society*, 2013. **160**(10): p. B177-B183.
59. Kim, P., et al., *Soft lithography for microfluidics: a review*. *Biochip Journal*, 2008. **2**(1): p. 1-11.
60. Fujii, T., *PDMS-based microfluidic devices for biomedical applications*. *Microelectronic Engineering*, 2002. **61-2**: p. 907-914.
61. Awaja, F., et al., *Adhesion of polymers*. *Progress in Polymer Science*, 2009. **34**(9): p. 948-968.
62. Le Berre, M., et al., *Reversible assembling of microfluidic devices by aspiration*. *Microelectronic Engineering*, 2006. **83**(4-9): p. 1284-1287.
63. Samel, B., M.K. Chowdhury, and G. Stemme, *The fabrication of microfluidic structures by means of full-wafer adhesive bonding using a poly(dimethylsiloxane) catalyst*. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2007. **17**(8): p. 1710-1714.
64. Bhattacharya, S., et al., *Mechanics of plasma exposed spin-on-glass (SOG) and polydimethyl siloxane (PDMS) surfaces and their impact on bond strength*. *Applied Surface Science*, 2007. **253**(9): p. 4220-4225.
65. Eddings, M.A., M.A. Johnson, and B.K. Gale, *Determining the optimal PDMS-PDMS bonding technique for microfluidic devices*. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2008. **18**(6).
66. Lee, N.Y. and B.H. Chung, *Novel Poly(dimethylsiloxane) Bonding Strategy via Room Temperature "Chemical Gluing"*. *Langmuir*, 2009. **25**(6): p. 3861-3866.
67. Aran, K., et al., *Irreversible, direct bonding of nanoporous polymer membranes to PDMS or glass microdevices*. *Lab on a Chip*, 2010. **10**(5): p. 548-552.
68. Zhang, Z.Y., P. Zhao, and G.Z. Xiao, *The fabrication of polymer microfluidic devices using a solid-to-solid interfacial polyaddition*. *Polymer*, 2009. **50**(23): p. 5358-5361.
69. Malecha, K., I. Gancarz, and W. Tylus, *Argon plasma-assisted PDMS-LTCC bonding technique for microsystem applications*. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2010. **20**(11).

70. Mosadegh, B., et al., *High-density fabrication of normally closed microfluidic valves by patterned deactivation of oxidized polydimethylsiloxane*. *Lab on a Chip*, 2011. **11**(4): p. 738-742.
71. Brown, L., et al., *Fabrication and characterization of poly(methylmethacrylate) microfluidic devices bonded using surface modifications and solvents*. *Lab on a Chip*, 2006. **6**(1): p. 66-73.
72. Lu, Y.W., P.T. Lin, and C.S. Pai, *Polydimethylsiloxane (PDMS) bonding strength characterization by a line force model in blister tests*. *Transducers '07 & Eurosensors Xxi, Digest of Technical Papers, Vols 1 and 2*, 2007: p. U1056-U1057.
73. Chow, W.W.Y., et al., *Micro fluidic channel fabrication by PDMS-interface bonding*, in *Biomems and Nanotechnology*, D.V. Nicolau, U.R. Muller, and J.M. Dell, Editors. 2003, Spie-Int Soc Optical Engineering: Bellingham. p. 141-148.
74. Zhang, Y. and S. Tadigadapa, *Calorimetric biosensors with integrated microfluidic channels*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004. **19**(12): p. 1733-1743.
75. Zhang, K., et al., *A microfluidic system with surface modified piezoelectric sensor for trapping and detection of cancer cells*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010. **26**(2): p. 935-939.
76. Sinn, I., et al., *Asynchronous magnetic bead rotation (AMBR) biosensor in microfluidic droplets for rapid bacterial growth and susceptibility measurements*. *Lab on a Chip*, 2011. **11**(15): p. 2604-2611.
77. Rothberg, J.M., et al., *An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing*. *Nature*, 2011. **475**(7356): p. 348-352.
78. Ciftlik, A.T. and M.A.M. Gijs, *Parylene to silicon nitride bonding for post-integration of high pressure microfluidics to CMOS devices*. *Lab on a Chip*, 2012. **12**(2): p. 396-400.
79. Li, M., et al., *A simple and cost-effective method for fabrication of integrated electronic-microfluidic devices using a laser-patterned PDMS layer*. *Microfluidics and Nanofluidics*, 2012. **12**(5): p. 751-760.
80. Eversmann, B., et al., *A 128 × 128 CMOS Biosensor Array for Extracellular Recording of Neural Activity*. *IEEE Journal of Solid-State Circuits*, 2003. **38**(12): p. 2306-2317.
81. Heer, F., et al., *CMOS microelectrode array for bidirectional interaction with neuronal networks*. *IEEE Journal of Solid-State Circuits*, 2006. **41**(7): p. 1620-1629.
82. Li, L. and A.J. Mason. *Post-CMOS parylene packaging for on-chip biosensor arrays*. 2010.
83. Graham, A.H.D., et al., *New prototype assembly methods for biosensor integrated circuits*. *Medical Engineering and Physics*, 2011. **33**(8): p. 973-979.
84. Wang, H., et al., *A magnetic cell-based sensor*. *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology*, 2012. **12**(21): p. 4465-4471.
85. Zhang, B., et al., *Flexible packaging of solid-state integrated circuit chips with elastomeric microfluidics*. *Scientific Reports*, 2013. **3**.
86. Ho, N.J., et al., *Encapsulation of polymeric membrane-based ion-selective field effect transistors*. *Sensors and Actuators*, 1983. **4**(C): p. 413-421.
87. Heer, F., et al., *CMOS microelectrode array for the monitoring of electrogenic cells*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004. **20**(2): p. 358-366.
88. Joo, S. and R.B. Brown, *Chemical sensors with integrated electronics*. *Chemical Reviews*, 2008. **108**(2): p. 638-651.
89. Prodromakis, T., et al., *Biocompatible Encapsulation of CMOS based Chemical Sensors*. *2009 IEEE Sensors, Vols 1-3*. 2009, New York: IEEE. 746-749.
90. Wu, A., et al., *Modular integration of electronics and microfluidic systems using flexible printed circuit boards*. *Lab on a Chip*, 2010. **10**(4): p. 519-521.
91. Huys, R., et al., *Single-cell recording and stimulation with a 16k micro-nail electrode array integrated on a 0.18 μm CMOS chip*. *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology*, 2012. **12**(7): p. 1274-1280.

92. Hur, S.C., A.J. Mach, and D. Di Carlo, *High-throughput size-based rare cell enrichment using microscale vortices*. *Biomicrofluidics*, 2011. **5**(2).
93. Hammond, P.A. and D.R.S. Cumming, *Encapsulation of a liquid-sensing microchip using SU-8 photoresist*. *Microelectronic Engineering*, 2004. **73-4**: p. 893-897.
94. Wimberger-Friedl, R., et al., *Packaging of silicon sensors for microfluidic bio-analytical applications*. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2009. **19**(1).
95. Kim, K., S.W. Park, and S.S. Yang, *The optimization of PDMS-PMMA bonding process using silane primer*. *Biochip Journal*, 2010. **4**(2): p. 148-154.
96. Tennico, Y.H., et al., *Surface modification-assisted bonding of polymer-based microfluidic devices*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2010. **143**(2): p. 799-804.
97. Tang, L. and N.Y. Lee, *A facile route for irreversible bonding of plastic-PDMS hybrid microdevices at room temperature*. *Lab on a Chip*, 2010. **10**(10): p. 1274-1280.
98. Ouellet, E., et al., *Novel Carboxyl-Amine Bonding Methods for Poly(dimethylsiloxane)-Based Devices*. *Langmuir*, 2010. **26**(14): p. 11609-11614.
99. Sunkara, V., et al., *Simple room temperature bonding of thermoplastics and poly(dimethylsiloxane)*. *Lab on a Chip*, 2011. **11**(5): p. 962-965.
100. Datta-Chaudhuri, T., P. Abshire, and E. Smela, *Packaging commercial CMOS chips for lab on a chip integration*. *Lab on a chip*, 2014. **14**(10): p. 1753-66.
101. Reichl, H., *Packaging and interconnection of sensors*. *Sensors and Actuators A: Physical*, 1990. **25**(1-3): p. 63-71.
102. Williams, G. and C. D'Silva, *Encapsulation of an integrated thin-film multi-electrode sensor using photocurable poly(styrene)*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1996. **30**(2): p. 151-157.
103. Abramova, N. and A. Bratov, *Photocurable Polymers for Ion Selective Field Effect Transistors. 20 Years of Applications*. *Sensors*, 2009. **9**(9): p. 7097-7110.
104. Munoz, J., et al., *Planar compatible polymer technology for packaging of chemical microsensors*. *Journal of the Electrochemical Society*, 1996. **143**(6): p. 2020-2025.
105. Rickerl, P.G., J.G. Stephanie, and P. Slota, *PROCESSING OF PHOTSENSITIVE POLYIMIDES FOR PACKAGING APPLICATIONS*. *Ieee Transactions on Components Hybrids and Manufacturing Technology*, 1987. **10**(4): p. 690-694.
106. Dumschat, C., et al., *Encapsulation of chemically sensitive field-effect transistors with photocurable epoxy resins*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1990. **2**(4): p. 271-276.
107. Sudakov-Boreysha, L., et al., *ISFET CMOS compatible design and encapsulation challenges*. *ICECS 2004: 11th IEEE International Conference on Electronics, Circuits and Systems*, 2004: p. 535-538.
108. Campos, C.D.M. and J.A.F. Da Silva, *Applications of autonomous microfluidic systems in environmental monitoring*. *RSC Advances*, 2013. **3**(40): p. 18216-18227.
109. Wu, X., et al. *A microfluidic sensor of Botulinum neurotoxin type a utilizing SNAP-25 incorporated responsive hydrogel*. 2013.
110. Streets, A.M. and Y. Huang, *Chip in a lab: Microfluidics for next generation life science research*. *Biomicrofluidics*, 2013. **7**(1).
111. Ehret, R., et al., *Multiparametric microsensor chips for screening applications*. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 2001. **369**(1): p. 30-35.
112. Ceriotti, L., et al., *Online monitoring of BALB/3T3 metabolism and adhesion with multiparametric chip-based system*. *Analytical Biochemistry*, 2007. **371**(1): p. 92-104.
113. Pereira Rodrigues, N., Y. Sakai, and T. Fujii, *Cell-based microfluidic biochip for the electrochemical real-time monitoring of glucose and oxygen*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2008. **132**(2): p. 608-613.
114. Zhang, F., et al., *Correlation between cell growth rate and glucose consumption determined by electrochemical monitoring*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2011. **156**(1): p. 416-422.

115. Martinoia, S., et al., *Development of ISFET array-based microsystems for bioelectrochemical measurements of cell populations*. Biosensors & Bioelectronics, 2001. **16**(9-12): p. 1043-1050.
116. Lehmann, M., et al., *Simultaneous measurement of cellular respiration and acidification with a single CMOS ISFET*. Biosensors & Bioelectronics, 2001. **16**(3): p. 195-203.
117. Mohri, S., et al., *Application of a flow-through type pH/CO₂ sensor system based on ISFET for evaluation of the glucose dependency of the metabolic pathways in cultured cells*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2008. **134**(2): p. 447-450.
118. Jung, C. and Rothstein, A., *CATION METABOLISM IN RELATION TO CELL SIZE IN SYNCHRONOUSLY GROWN TISSUE CULTURE CELL*. Journal of General Physiology, 1967. **50**(4): p. 917-&.
119. Paemeleire, K. and L. Leybaert, *Ionic changes accompanying astrocytic intercellular calcium waves triggered by mechanical cell damaging stimulation*. Brain Research, 2000. **857**(1-2): p. 235-245.
120. Wu, C.C., et al., *A Clark-type oxygen chip for in situ estimation of the respiratory activity of adhering cells*. Talanta, 2010. **81**(1-2): p. 228-234.
121. Douglas, E.S., et al., *DNA-barcode directed capture and electrochemical metabolic analysis of single mammalian cells on a microelectrode array*. Lab on a Chip, 2009. **9**(14): p. 2010-2015.
122. Xu, Y., et al., *A microfluidic device with passive air-bubble valves for real-time measurement of dose-dependent drug cytotoxicity through impedance sensing*. Biosensors & Bioelectronics, 2012. **32**(1): p. 300-304.
123. Ges, I.A., K.P.M. Currie, and F. Baudenbacher, *Electrochemical detection of catecholamine release using planar iridium oxide electrodes in nanoliter microfluidic cell culture volumes*. Biosensors & Bioelectronics, 2012. **34**(1): p. 30-36.
124. Chen, H., et al., *Evaluation of the cytotoxicity of cigarette smoke condensate by a cellular impedance biosensor*. Food and Chemical Toxicology, 2012. **50**(3-4): p. 612-618.
125. Roa, W., et al., *Real-time cell-impedance sensing assay as an alternative to clonogenic assay in evaluating cancer radiotherapy*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011. **400**(7): p. 2003-2011.
126. Xing, J.Z., et al., *Microelectronic-sensing assay to detect presence of Verotoxins in human faecal samples*. Journal of Applied Microbiology, 2012. **113**(2): p. 429-437.
127. Andreescu, S., O.A. Sadik, and D.W. McGee, *Autonomous multielectrode system for monitoring the interactions of isoflavonoids with lung cancer cells*. Analytical Chemistry, 2004. **76**(8): p. 2321-2330.
128. Karasinski, J., et al., *Detection and identification of bacteria using antibiotic susceptibility and a multi-array electrochemical sensor with pattern recognition*. Biosensors & Bioelectronics, 2007. **22**(11): p. 2643-2649.
129. Thedinga, E., et al., *Online monitoring of cell metabolism for studying pharmacodynamic effects*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2007. **220**(1): p. 33-44.
130. Mestres-Ventura, P., A. Morguet, and S. Garcia Gomez de las Heras, *Multi-Sensor Arrays for Online Monitoring of Cell Dynamics in in vitro Studies with Choroid Plexus Epithelial Cells*. Sensors, 2012. **12**(2): p. 1383-1397.
131. Torisawa, Y., et al., *Multi-channel 3-D cell culture device integrated on a silicon chip for anticancer drug sensitivity test*. Biomaterials, 2005. **26**(14): p. 2165-2172.
132. Yue, X., et al., *A Real-Time Multi-Channel Monitoring System for Stem Cell Culture Process*. IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems, 2008. **2**(2): p. 66-77.
133. Buehler, S.M., et al., *A decrease of intracellular ATP is compensated by increased respiration and acidification at sub-lethal parathion concentrations in murine embryonic neuronal cells: Measurements in metabolic cell-culture chips*. Toxicology Letters, 2011. **207**(2): p. 182-190.

134. Chen, Y., et al., *Compact microelectrode array system: Tool for in situ monitoring of drug effects on neurotransmitter release from neural cells*. Analytical Chemistry, 2008. **80**(4): p. 1133-1140.
135. Bitziou, E., D. O'Hare, and B.A. Patel, *Spatial changes in acid secretion from isolated stomach tissue using a pH-histamine sensing microarray*. Analyst, 2010. **135**(3): p. 482-487.
136. Gebinoga, M., et al., *Nerve cell response to inhibitors recorded with an aluminum-galliumnitride/galliumnitride field-effect transistor*. Journal of Neuroscience Methods, 2012. **206**(2): p. 195-199.
137. Vasan, A.S.S., et al., *Point-of-care biosensor system*. Frontiers in Bioscience - Scholar, 2013. **5 S**(1): p. 39-71.
138. Shafiee, H., et al., *Acute on-chip HIV detection through label-free electrical sensing of viral nano-lysate*. Small, 2013. **9**(15): p. 2553-2563.
139. Owicki, J.C. and J.W. Parce, *BIOSENSORS BASED ON THE ENERGY-METABOLISM OF LIVING CELLS - THE PHYSICAL-CHEMISTRY AND CELL BIOLOGY OF EXTRACELLULAR ACIDIFICATION*. Biosensors & Bioelectronics, 1992. **7**(4): p. 255-272.
140. Lee, S., et al., *Measurement of pH and dissolved oxygen within cell culture media using a hydrogel microarray sensor*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2008. **128**(2): p. 388-398.
141. Wolf, B., et al., *Monitoring of cellular signalling and metabolism with modular sensor-technique: The PhysioControl-Microsystem (PCM (R))*. Biosensors & Bioelectronics, 1998. **13**(5): p. 501-509.
142. Bratov, A., et al., *Photocurable polymers applied as encapsulating materials for ISFET production*. Sensors and Actuators B: Chemical, 1995. **25**(1-3): p. 823-825.
143. Jimenez Jorquera, C., *Sensors tipus ISFETs*. 1992, Universidad Aut3noma de Barcelona.
144. Merlos Domingo, A., *Desarrollo tecnol3gico para la fabricaci3n de ISFETs con contactos posteriores*. 1993, Universidad Aut3noma de Barcelona.
145. Baldi Coll, A., *An3lisis i correcci3 de les limitacions en l'aplicaci3 de transductors tipus ISFET*. 2001, Universidad Aut3noma de Barcelona.
146. Bratov, A., et al., *PHOTOCURABLE POLYMER MATRICES FOR POTASSIUM-SENSITIVE ION-SELECTIVE ELECTRODE MEMBRANES*. Analytical Chemistry, 1995. **67**(19): p. 3589-3595.
147. Abramova, N., et al., *Application of an ion-selective field effect transistor with a photocured polymer membrane in nephrology for determination of potassium ions in dialysis solutions and in blood plasma*. Talanta, 2000. **52**(3): p. 533-538.
148. Wilson, R. and A.P.F. Turner, *GLUCOSE-OXIDASE - AN IDEAL ENZYME*. Biosensors & Bioelectronics, 1992. **7**(3): p. 165-185.
149. Wilkins, E. and P. Atanasov, *Glucose monitoring: State of the art and future possibilities*. Medical Engineering & Physics, 1996. **18**(4): p. 273-288.
150. Desmond, D., et al., *Evaluation of miniaturised solid state reference electrodes on a silicon based component*. Sensors and Actuators B-Chemical, 1997. **44**(1-3): p. 389-396.
151. Huang, I.Y., R.S. Huang, and L.H. Lo, *Improvement of integrated Ag/AgCl thin-film electrodes by KCl-gel coating for ISFET applications*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2003. **94**(1): p. 53-64.
152. Sun, X.J. and M. Wang, *Fabrication and characterization of planar reference electrode for on-chip electroanalysis*. Electrochimica Acta, 2006. **52**(2): p. 427-433.
153. Ives, J., *Silver, Silver Chloride Electrodes*. Annuals of N.Y. Acad. of Sciences. **148**: p. Art. 1, pp. 210-221.
154. IUPAC, *Recomendations of Nomenclature of Ion-Selective Electrodes*. Pergamon Press, Oxford, 1975.
155. *Handbook of Ion-Selective Electrodes: Selectivity Coefficients*. 2004: In Y. Umezawa. 5-9.
156. Del Campo, F.J., et al., *Continuous measurement of acute toxicity in water using a solid state microrespirometer*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2007. **126**: p. 515-521.

157. Lee, L.Y.S. and R.B. Lennox, *Electrochemical desorption of n-alkylthiol SAMs on polycrystalline gold: Studies using a ferrocenylalkylthiol probe*. Langmuir, 2007. **23**(1): p. 292-296.
158. Orozco, J., et al., *Characterization of ultramicroelectrode arrays combining electrochemical techniques and optical microscopy imaging*. Electrochimica Acta, 2007. **53**(2): p. 729-736.
159. Zimmermann, S., et al., *In-device enzyme immobilization: wafer-level fabrication of an integrated glucose sensor*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2004. **99**(1): p. 163-173.
160. Weltin, A., et al., *Cell culture monitoring for drug screening and cancer research: A transparent, microfluidic, multi-sensor microsystem*. Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology, 2014. **14**(1): p. 138-146.
161. Brewer, G.J., et al., *OPTIMIZED SURVIVAL OF HIPPOCAMPAL-NEURONS IN B27-SUPPLEMENTED NEUROBASAL(TM), A NEW SERUM-FREE MEDIUM COMBINATION*. Journal of Neuroscience Research, 1993. **35**(5): p. 567-576.
162. Soreta, T.R., J. Strutwolf, and C.K. O'Sullivan, *Electrochemical fabrication of nanostructured surfaces for enhanced response*. Chemphyschem, 2008. **9**(6): p. 920-927.
163. Burdallo, I., et al., *Integration of microelectronic chips in microfluidic systems on printed circuit board*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2012. **22**(10).
164. Perez-Castillejos, A.B.S.a.R., *Chips & Tips: Simple Fabrication of Microfluidic Devices by Replicating Scotch-tape Masters*. Lab on a Chip, 2010.
165. Matsubara, H. and H. Ohtani, *Evaluation of molecular weight of original epoxy acrylates in UV-cured resins by pyrolysis-gas chromatography in the presence of organic alkali*. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 2006. **75**(2): p. 226-235.
166. Wu, C.-C., C.-Y. Yuan, and S.-J. Ding, *Effect of polydimethylsiloxane surfaces silanized with different nitrogen-containing groups on the adhesion progress of epithelial cells*. Surface and Coatings Technology, 2011. **205**(10): p. 3182-3189.
167. Vlachopoulou, M.E., et al., *A low temperature surface modification assisted method for bonding plastic substrates*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2009. **19**(1).
168. Kobayashi, T., H. Saitoh, and N. Fujii, *POROUS POLYDIMETHYLSILOXANE MEMBRANES TREATED WITH AMINOPROPYLTRIMETHOXYSILANE*. Journal of Applied Polymer Science, 1994. **51**(3): p. 483-489.
169. Kersey, L., et al., *The effect of adhesion promoter on the adhesion of PDMS to different substrate materials*. Lab on a Chip, 2009. **9**(7): p. 1002-1004.
170. Lee, K.S. and R.J. Ram, *Plastic-PDMS bonding for high pressure hydrolytically stable active microfluidics*. Lab on a Chip, 2009. **9**(11): p. 1618-1624.
171. Bhattacharya, S., et al., *Studies on surface wettability of poly(dimethyl) siloxane (PDMS) and glass under oxygen-plasma treatment and correlation with bond strength*. Journal of Microelectromechanical Systems, 2005. **14**(3): p. 590-597.
172. Rezai, P., P.R. Selvaganapathy, and G. Rwohl, *Plasma enhanced bonding of polydimethylsiloxane with parylene and its optimization*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2011. **21**(6).
173. Bhagat, A.A.S., et al., *Re-usable quick-release interconnect for characterization of microfluidic systems*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2007. **17**(1): p. 42-49.
174. Jimenez-Jorquera, C., J. Orozco, and A. Baldi, *ISFET Based Microsensors for Environmental Monitoring*. Sensors, 2010. **10**(1): p. 61-83.
175. Segura Quijano, F., *Sensores químicos inalámbricos: Integración de sistemas de telemetría y transductores electroquímicos 2010*, Universidad Autonoma de Barcelona.
176. Bausells, J., et al., *Ion-sensitive field-effect transistors fabricated in a commercial CMOS technology*. Sensors and Actuators B-Chemical, 1999. **57**(1-3): p. 56-62.

177. Kuystermans, D., A. Mohd, and M. Al-Rubeai, *Automated flow cytometry for monitoring CHO cell cultures*. *Methods*, 2012. **56**(3): p. 358-365.
178. Wikswo, J.P., et al., *Engineering challenges of BioNEMS: the integration of microfluidics, micro- and nanodevices, models and external control for systems biology*. In *Proceedings-Nanobiotechnology*, 2006. **153**(4): p. 81-101.

