



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
MICROELECTRODOS PARA MEDIR GLUCOSA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

FÍSICO

PRESENTA:

SARA JACQUELINE HERRERA DOMÍNGUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN CE JEHÚ LÓPEZ APARICIO



CIUDAD UNIVERSITARIA, Cd. Mx. 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



1.Datos del alumno	1.Datos del alumno
Apellido paterno	Herrera
Apellido materno	Domínguez
Nombre(s)	Sara Jacqueline
Teléfono	55 51 63 84 79
Universidad	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad	Facultad de Ciencias
Carrera	Física
Número de cuenta	308020456
2. Datos del tutor	2. Datos del tutor
Grado	M. en CE
Nombre(s)	Jehú
Apellido paterno	López
Apellido materno	Aparicio
3. Datos del sinodal 1	3. Datos del sinodal 1
Grado	Dra.
Nombre(s)	María del Pilar
Apellido paterno	Carreón
Apellido materno	Castro
4. Datos del sinodal 2	4. Datos del sinodal 2
Grado	Dr.
Nombre(s)	Mathieu Christian Anne
Apellido paterno	Hautefeuille
5. Datos del sinodal 3	5. Datos del sinodal 3
Grado	Dra.
Nombre(s)	Margarita
Apellido paterno	Rivera
Apellido materno	Hernández
6. Datos del sinodal 4	6. Datos del sinodal 4
Grado	Dr.
Nombre(s)	Sergio Enrique
Apellido paterno	Solís
Apellido materno	Nájera
7.Datos del trabajo escrito	7.Datos del trabajo escrito
Título	Elaboración y caracterización de microelectrodos
para medir glucosa	
Número de páginas	82
Año	2017

*A mis padres*

*“Si he logrado ver más lejos ha sido porque  
he subido a hombros de gigantes.”*

*Isaac Newton*

# Agradecimientos

Agradezco a mis padres por todo el amor y felicidad que han dado a mi vida.

A Diana por esplendor, por mostrarme la lógica y la filosofía del tiempo y el espacio, y por llenar mi vida de alegría.

A Noemí por ser la preciosa niña que me hace reír, que cree en mí y que siempre tiene algo nuevo que enseñarme.

A Nathaly por ser nuestra súper corazoncito.

También agradezco al resto de mi familia, a mis amigos y profesores, quienes me han llenado de buenos deseos, alegría y conocimiento.

Gracias al Dr. Mathieu Hautefeuille por su profesionalismo, apoyo, paciencia e interés en el desarrollo de esta investigación. Asimismo al Mtro. Jehú López por sus enseñanzas.

Al Taller de Mecánica de la Facultad de Ciencias por su tiempo y apoyo en la realización de este trabajo. A mis compañeros de laboratorio por sus consejos y buenas vibras.

Gracias también a mis sinodales por el tiempo que le dedicaron a este trabajo y por sus valiosos comentarios.

# Índice general

Agradecimientos	III
Resumen	VII
<b>I</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>2</b>
1.1. Importancia de la diabetes . . . . .	2
1.2. Las personas no fallecen por la diabetes sino por las complicaciones . . . . .	3
1.3. Soluciones en marcha . . . . .	3
<b>2. Biosensores</b>	<b>5</b>
2.1. Biosensores de glucosa . . . . .	7
2.1.1. Primera generación . . . . .	8
2.1.2. Segunda generación . . . . .	8
2.1.3. Tercera generación . . . . .	9
2.1.4. Inmovilización de enzima . . . . .	10
2.2. Microelectrodos . . . . .	11
2.3. Glucómetros . . . . .	12
2.4. Estado del arte . . . . .	13
2.4.1. El biosensor de glucosa . . . . .	13
2.4.2. Enzimáticos vs no enzimáticos . . . . .	14
<b>3. Microfluídica</b>	<b>16</b>
3.1. La mecánica de la microfluídica . . . . .	17
3.2. La microfluídica en el biosensor de glucosa . . . . .	20
<b>4. Técnicas de microfabricación</b>	<b>22</b>
4.1. Materiales . . . . .	22

4.1.1.	Polimetilmetacrilato (PMMA) . . . . .	23
4.1.2.	Polidimetilsiloxano (PDMS) . . . . .	23
4.2.	Fotolitografía . . . . .	24
4.3.	Litografía suave . . . . .	25
4.3.1.	Molde-réplica usando Shrinky Dinks y PDMS . . . . .	25
4.4.	Micromaquinado CNC . . . . .	26
4.5.	Grabado Láser . . . . .	27
<b>5.</b>	<b>Ensamble de microcanales y micromoldes</b>	<b>29</b>
5.1.	Unión indirecta . . . . .	29
5.2.	Unión directa . . . . .	30
<b>6.</b>	<b>Transducción electroquímica</b>	<b>31</b>
6.1.	Voltametría . . . . .	31
6.2.	Amperometría . . . . .	32
6.3.	Amperometría vs voltametría . . . . .	32
6.4.	Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS) . . . . .	33
<b>II</b>	<b>Metodología y resultados</b>	<b>34</b>
<b>7.</b>	<b>Proceso de fabricación de microelectrodos para medir glucosa</b>	<b>35</b>
7.1.	Muestras y materiales . . . . .	35
7.1.1.	Preparación de muestras de glucosa . . . . .	36
7.1.2.	Sustratos . . . . .	36
7.1.2.1.	Preparación de PDMS . . . . .	37
7.1.3.	Materiales conductores para electrodos . . . . .	38
7.1.3.1.	Pasta de rodio en carbón sensibilizada con glucosa oxidasa . . . . .	38
7.1.3.2.	Pasta LaserCon sensibilizada con glucosa oxidasa . . . . .	39
7.1.4.	Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa mediante un atrapamiento en grenetina . . . . .	39
7.2.	Diseño . . . . .	40
7.3.	Fabricación de micromoldes . . . . .	40
7.3.1.	Shrinky Dinks . . . . .	41
7.3.2.	Micromaquinado CNC . . . . .	42
7.3.3.	Grabado láser . . . . .	43
7.4.	Preparación de microelectrodos . . . . .	44

7.5. Ensamblaje y microfluídica . . . . .	45
7.5.1. Arreglo 1 . . . . .	45
7.5.2. Arreglo 2 . . . . .	46
<b>8. Pruebas funcionales y caracterización</b>	<b>49</b>
8.1. Características electrónicas . . . . .	49
8.1.1. Una medición . . . . .	49
8.1.2. Medición múltiple: cuatro mediciones . . . . .	50
8.2. Micromoldes y microelectrodos . . . . .	51
8.2.1. Micromoldes fabricados con molde-réplica (PDMS y Shrinky Dinks) . . .	51
8.2.2. Micromoldes fabricados con maquinado CNC . . . . .	54
8.2.2.1. Electrodo de trabajo de pasta de rodio en carbón sensibilizada con GOx . . . . .	56
8.2.2.2. Electrodo de trabajo de Pasta LaserCon sensibilizada con GOx	56
8.2.2.3. Electrodo de trabajo de plata con gel sensibilizado con GOx . .	58
8.2.2.4. Electrodo de trabajo de plata . . . . .	60
8.2.3. Micromoldes fabricados con grabado láser . . . . .	61
8.2.3.1. Electrodo de trabajo de Pasta LaserCon sensibilizada con GOx	62
8.2.3.2. Electrodo de trabajo de plata con gel sensibilizado con GOx . .	63
8.3. Mediciones con glucómetro comercial . . . . .	64
8.4. Análisis de materiales . . . . .	64
8.4.1. El uso de PDMS . . . . .	64
8.4.2. El uso de PMMA . . . . .	65
8.5. Otros electrodos . . . . .	65
8.5.1. Microalambres de plata . . . . .	65
8.5.2. Microelectrodos en PCB . . . . .	66
<b>9. Conclusiones y trabajo futuro</b>	<b>68</b>
<b>Anexo</b>	<b>71</b>
.1. Preparación de PDMS . . . . .	71
.2. Preparación de muestras de glucosa . . . . .	72
.3. Preparación de pasta conductora sensibilizada con glucosa oxidasa . . . . .	73
.4. Gel sensibilizado con glucosa oxidasa . . . . .	74
.5. Procedimiento de fabricación de microelectrodos . . . . .	76
<b>Bibliografía</b>	<b>80</b>

# Resumen

Los objetivos de la presente tesis son elaborar microelectrodos y caracterizarlos para medir glucosa, a fin de desarrollar un biosensor de glucosa capaz de realizar mediciones precisas y confiables, que compitan con las de uno comercial.

Esta tesis presenta un método para elaborar microelectrodos, que ya ha sido usado en varias investigaciones en el Laboratorio de Óptica Láser de la Facultad de Ciencias, y cuyos microelectrodos fueron probados como prototipo para desarrollar un biosensor de glucosa, que necesita de al menos dos electrodos que trabajen con el fenómeno de óxido-reducción (redox). Para ello se usaron tres técnicas de microfabricación disponibles en el Laboratorio, que son molde-réplica, grabado láser y maquinado CNC, empleando como materiales a los polímeros polidimetilsiloxano (PDMS) y polidimetilmetacrilato (PMMA), además de usar dos pastas conductoras de carbón y plata líquida.

El proceso de fabricación de microelectrodos que aquí se presenta consiste en elaborar un micromolde (por alguna técnica de microfabricación) sobre el sustrato de trabajo (PDMS o PMMA) y rellenarlo con material conductor (pastas o plata).

Para construir el biosensor en el que se usó la enzima glucosa oxidasa (GOx) se integran microfluídica y microelectrodos, por lo que se elaboraron diseños que permiten transportar muestras de dextrosa (preparadas a distintas concentraciones para analizar las mediciones) a través de un canal que llevará la muestra de sangre o saliva a analizar hacia los microelectrodos. Además, paralelamente durante la investigación se trabajó con un sensor no enzimático, en el que se empleó la misma metodología, prescindiendo de la enzima GOx.

Para obtener información del proceso redox se usó la amperometría, método electroquímico, que permite registrar la corriente producida en función de la concentración de glucosa. Para procesar la información se usó un circuito transimpedancia y un equipo Source Meter Unit que permite medir pequeñas corrientes del orden de 10nA a 1A y que sirvió para dar confiabilidad

a las mediciones. También se analizó un proceso de medición múltiple, para cuatro mediciones, a fin de reducir el error en estas, usando el mismo circuito transimpedancia cuatro veces y un osciloscopio.

El resultado de esta investigación muestra que los microelectrodos elaborados con esta metodología permiten medir la corriente resultante de la reacción redox donde la enzima glucosa oxidasa cataliza la glucosa, y así determinar la concentración de glucosa presente.

Además, la integración de microflídica y electrónica, así como los arreglos propuestos, en especial el arreglo 2, permiten dosificar las muestras a analizar y obtener una precisa medición de las distintas concentraciones de glucosa.

El peor resultado se obtuvo en el análisis del sensor no enzimático, usando un electrodo de trabajo de plata sin enzima GOx y un electrodo de referencia de plata de dimensiones de (2.5 mm x 2.5 mm  $\pm$  500  $\mu$ m) de área x (300  $\mu$ m  $\pm$  70  $\mu$ m) de profundidad, usando el arreglo 2, diseño vi (considerando sólo dos electrodos). En la caracterización los resultados muestran que la corriente producida en la reacción no varía proporcionalmente a la concentración de glucosa en un rango de 2.5 mg/dL - 300 mg/dL. Se obtuvo un valor de  $R^2 = 0.3292$

El mejor resultado se obtuvo con un electrodo de trabajo de Pasta LaserCon sensibilizada con GOx y un electrodo de referencia de plata de dimensiones de 2.0 mm x 2.0 mm  $\pm$  100  $\mu$ m, fabricados con el láser de CD-DVD en PMMA, usando el arreglo 1 y diseño i. En la caracterización los resultados muestran que la corriente producida en la reacción varía proporcionalmente a la concentración de glucosa en un rango de 2.5 mg/dL - 300 mg/dL. Se obtuvo un valor de  $R^2 = 0.9951$  mientras que con el glucómetro comercial ACCUCHEK Performa se obtuvo un  $R^2 = 0.9962$ , esto es, un porcentaje de diferencia de 0.1 %

Así, se logró implementar un proceso de elaboración de microelectrodos sencillo y barato, que arrojó mediciones de glucosa comparables con las de un glucómetro comercial. Sin embargo, las técnicas de microfabricación usadas, y el mismo método de elaboración de microelectrodos limitó la reproducibilidad de las mediciones y por ende la caracterización de los microelectrodos para medir glucosa, debido a que la resolución de las microestructuras es limitada (como se verá en el capítulo 6). Esto es, aunque los resultados son satisfactorios, queda como trabajo futuro probar nuevas técnicas de fabricación que permitan obtener reproducibilidad en las mediciones, integrando la preparación y conceptos que en el presente trabajo se reportan.

La tesis se divide en nueve capítulos, en los que se presentan los retos, alcances y resultados obtenidos de la presente investigación. En el primer capítulo se describe de forma general la

diabetes, una enfermedad crónica que afecta a millones de mexicanos y que se controla con medidas preventivas para quienes están en riesgo de padecerla y con un monitoreo de los niveles de glucosa para quienes ya la padecen, esto a través de glucómetros.

En el segundo capítulo se describe el desarrollo tecnológico de los biosensores de glucosa, abarcando su historia, sus retos e innovaciones, que hacen de éste un tema en continuo avance.

En el tercer capítulo se menciona a la microfluídica como parte fundamental en el correcto desarrollo de los biosensores de glucosa.

En el cuarto capítulo se introducen los materiales y técnicas de microfabricación disponibles para la realización de los microelectrodos que miden glucosa, así como las técnicas comúnmente empleadas para fabricar tiras reactivas que usan los glucómetros comerciales.

En el quinto capítulo se describen algunas técnicas empleadas para el ensamble de microcanales que son recorridos por las muestras de glucosa hasta los microelectrodos.

Enseguida, en el sexto capítulo se mencionan algunos métodos electroquímicos que se emplean en la detección de concentraciones de glucosa; entre los que destaca la amperometría, método que se usó en la verificación del desempeño de los microelectrodos fabricados en el presente trabajo.

En el séptimo capítulo se describe el proceso de fabricación de microelectrodos para medir glucosa, detallando y justificando materiales, preparación de muestras, fabricación de moldes con las técnicas de microfabricación antes mencionadas. Para continuar con la preparación de microelectrodos, que involucra el ensamblaje y la microfluídica, analizando dos tipos de arreglos geométricos para medir glucosa.

En el octavo capítulo se detallan las pruebas funcionales y de caracterización de los microelectrodos, esto es, con la descripción de los circuitos usados para una y cuatro mediciones con el propósito de reducir error en las mediciones. Además del uso de un equipo de verificación y un glucómetro comercial.

Finalmente en el noveno capítulo se analizan los resultados, conclusiones y trabajo futuro.



# Parte I

# Capítulo 1

## Introducción

### Objetivo general

Desarrollar un biosensor de glucosa que compita con las mediciones de glucosa que realiza un glucómetro comercial.

### Objetivos particulares

Elaborar microelectrodos con las técnicas de fabricación molde-réplica, maquinado CNC y grabado láser.

Caracterizar los microelectrodos para realizar precisas mediciones de glucosa.

La investigación de esta tesis es un método para fabricar microelectrodos que sean capaces de medir distintas concentraciones de glucosa, como solución al control de la diabetes, que como a continuación se describe, es una enfermedad complicada que se identifica en las personas con altos niveles de glucosa en la sangre. Enseguida se describen los principales puntos sobre esta enfermedad.

### 1.1. Importancia de la diabetes

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica-degenerativa que daña todo el organismo, provocando vasculopatías que crean complicaciones como ceguera, amputaciones, uremia, hipertensión arterial, y colesterol, triglicéridos altos, obesidad, e incluso la muerte. Existen diferentes tipos de diabetes, las principales son la Tipo 1 (insulinodependiente) que usualmente se da en la juventud y que requiere administración de insulina por ser deficiente, la Tipo 2 (resistente a la insulina) que se da por lo general en la edad adulta en la que no se reconoce a la insulina, y la gestacional que se da en el embarazo cuando aumenta demasiado el azúcar en la sangre [1].

Esta enfermedad es global y se estima que para 2030 habrán más de 300 millones de personas en el mundo que la padezcan [2].

## **1.2. Las personas no fallecen por la diabetes sino por las complicaciones**

¿Por qué es necesario buscar soluciones? La respuesta a esta pregunta está en entender que la DM es una enfermedad compleja porque los padecimientos (antes mencionados) se presentan después de años de tenerla sin saberlo. Esto provoca que la esperanza de vida de quienes la sufren, disminuya entre 5 y 10 años [3], sin mencionar que la calidad de vida también se reduce. Además, cuando es detectada genera enormes gastos en el sector económico debido a que las personas que la padecen deben recibir atención médica, medicamentos y la mayoría requiere hospitalización por tiempos prolongados, sumado el hecho de que dejan de trabajar y afectan a sus individuos cercanos, principalmente a su familia.

La población mexicana tiene un alto riesgo de padecer DM debido a factores genéticos y ambientales, como malos hábitos alimenticios e inactividad física. Por lo que sobra decir que su atención es la mayor ventaja para solucionarla.

## **1.3. Soluciones en marcha**

A lo largo de los años se han implementado numerosas estrategias para prevenir, detectar, tratar y controlar esta enfermedad global, sin embargo, su detección es difícil porque las personas acuden al médico hasta que algún malestar los aqueja y hasta entonces se les da tratamiento. Esto es en promedio, después de 6 o 7 años de tener la enfermedad. Así que, los expertos en el tema coinciden en que lo mejor es prevenirla, tomando acción hacia la población en general y hacia las personas en posible riesgo [4].

Una de las estrategias es monitorear los niveles de glucosa en sangre de quienes ya la padecen y quienes están en riesgo de padecerla, por esto surge la necesidad de desarrollar biosensores que registren la cantidad de glucosa presente en la sangre con el reto de que sean seguros, confiables y baratos para las personas.

Las personas con altos niveles de glucosa en la sangre usan glucómetros para monitorearlos, y es que, aunque actualmente este tipo de biosensores son muy populares, su investigación crece

todos los días a fin de encontrar un biosensor de glucosa que sea accesible a todas las poblaciones, seguro, de fácil uso y que ofrezca mediciones continuas y precisas de los niveles de glucosa en la sangre, entre muchas más características. Porque es cierto que existen miles de investigaciones sobre este tema y también muchas reportadas formas de medir distintas concentraciones de glucosa pero no hay tantos glucómetros comerciales que permitan hacerlo, que es el propósito de todas esas investigaciones. Por lo que el procedimiento que aquí se describe es diferente a los reportados antes, es sencillo y barato. Lo que aporta soluciones para la creación de un biosensor de glucosa cuyas mediciones compitan con las de un glucómetro comercial.

# Capítulo 2

## Biosensores

El mundo de la ingeniería biomédica tiene múltiples ramas de investigación, los biosensores son una de ellas, y son los encargados de detectar, medir y monitorear señales fisiológicas [5].

En biotecnología, un biosensor se define como un dispositivo que usa reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas, anticuerpos, organelos, tejidos o células completas para detectar compuestos químicos usualmente por señales eléctricas, térmicas u ópticas [6].

Un biosensor se construye con un componente biológico que actúa como elemento de reconocimiento (enzimas, anticuerpos, células, etc) colocado sobre un transductor (electrodos, nanopartículas, microalambres, etc) y que al introducir una muestra biológica (células, sangre, saliva, etc) genera una señal fisiológica, es decir, un parámetro cuantificable que da información específica del funcionamiento normal de un ser vivo. La señal es transformada por el transductor en una señal eléctrica como corriente, potencial, etc. (Ver Figura 2.1)

Esta señal se amplifica, procesa y cuantifica para analizar dichas respuestas fisiológicas [6, 7].

En [7] se enlistan las siguientes seis condiciones que se deben considerar si se planea construir un biosensor:

1.- El biocatalizador debe ser muy específico para el propósito del análisis, ser estable en condiciones de almacenamiento normales y mostrar una baja variación entre las pruebas.

2.- La reacción debe ser tan independiente como manejable de parámetros físicos como la agitación, el pH y la temperatura. Esto permitirá el análisis de muestras con un mínimo de pretratamiento. Si la reacción implica cofactores o coenzimas, éstos deben, preferiblemente, también ser co-inmovilizados con la enzima.

3.- La respuesta debe ser fiel, precisa, reproducible y lineal sobre el intervalo de concentración de interés, sin disolución o concentración. También debe estar libre de ruido eléctrico o cualquier

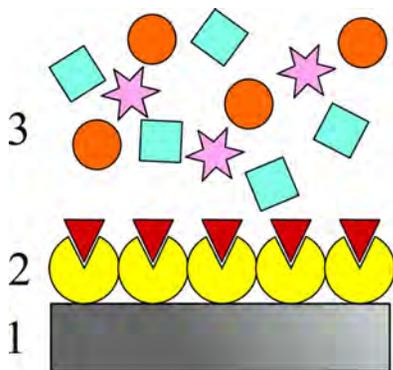
otro tipo ruido inducido por el transductor.

4.- Si el biosensor se va a utilizar para la monitorización invasiva en situaciones clínicas, la sonda debe ser pequeña y biocompatible, sin efectos tóxicos o antigénicos. Además, el biosensor no debe ser propenso a inactivación o proteólisis.

5.- Para mediciones rápidas de analitos a partir de muestras humanas es deseable que el biosensor pueda proporcionar análisis en tiempo real.

6.- El biosensor completo debe ser barato, pequeño, portátil y capaz de ser utilizado por personas semicalificadas.

Así, aunque para construir un biosensor se deben considerar muchas etapas y características, sus componentes principales son el elemento de reconocimiento biológico y el transductor [8]. Es por esto que los biosensores se clasifican según su biocomponente inmovilizado (enzimáticos, afinidad, inmunobiosensor, proteínas de membrana, microorganismos) o según su transductor (electroquímicos, ópticos, térmicos, acústicos). Aunque también existe una clasificación más general, que define a los biosensores como físicos y químicos, según sus características cuantificables [5].



**Figura 2.1:** Elementos de un biosensor: 1- transductor, 2- elemento de bioreconocimiento y 3- muestra. En esta figura se identifica un transductor sobre el cual se encuentra inmovilizado el elemento de bioreconocimiento que es capaz de interactuar selectivamente con un reactivo específico presente en una compleja muestra de análisis, lo que provee de especificidad a la medición. Por ejemplo, cuando un electrodo (transductor) sobre cuya superficie se ha inmovilizado a la enzima GOx (elemento de bioreconocimiento) se pone en contacto con una muestra de sangre (muestra) que contiene distintos y variados elementos como glucosa, triglicéridos, proteínas, etc, sólo la glucosa se fija a la enzima, ignorando el resto de los elementos presentes. Figura modificada de [6].

En este capítulo se analizan los sensores enzimáticos y no enzimáticos electroquímicos amperométricos, que son muy usados en la medición de glucosa en sangre. Estos biosensores usan electrodos para convertir la información fisiológica en señales eléctricas, e implementan o no enzimas sobre su superficie. Debido a que los enzimáticos son usados en los glucómetros comerciales porque la enzima sólo interactúa con cierta molécula, aunque otras estén presentes,

se tiene control y selectividad en las mediciones; mientras que los no enzimáticos son una creciente línea de investigación.

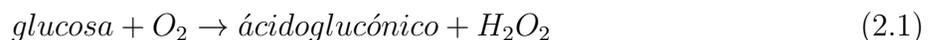
## 2.1. Biosensores de glucosa

Un biosensor enzimático electroquímico usa enzima y electrodos para funcionar. Las enzimas son catalizadores que forman parte de nuestro mundo biológico y en su mayoría son proteínas. Por definición, un catalizador es una sustancia que actúa en una reacción química aumentando su velocidad sin ser consumido o alterado durante el proceso [25].

Iniciaremos con una breve historia de los biosensores, que justamente comienza con el desarrollo del sensor para medir glucosa del tipo electroquímico amperométrico que mide la corriente resultante de una reacción óxido-reductiva.

El biosensor para detectar glucosa en sangre desarrollado en 1962 por Clark y Lyons en el Hospital Infantil de Cincinnati, en Estados Unidos, marcó el inicio de los biosensores. Este dispositivo, llamado electrodo enzimático, consistió en atrapar a la enzima glucosa oxidasa (GOx) en dos membranas de diálisis semipermeables sobre un electrodo de oxígeno, con el objetivo de medir el oxígeno consumido en la reacción [6].

La GOx cataliza la reacción entre oxígeno y glucosa, produciendo ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, (ecuación 2.1).



Estos investigadores aplicaron un potencial negativo al cátodo de platino para una detección reductiva del consumo de oxígeno. Así, el oxígeno contenido en la proximidad de la superficie del electrodo decaía proporcionalmente a la concentración de glucosa, y ellos midieron la cantidad de oxígeno consumido por la reacción catalítica de la enzima [6, 9], (ecuación 2.2).



En 1973, Guilbault y Lubrano desarrollaron un electrodo enzimático para medir glucosa en sangre. Usaron el método amperométrico (que se verá después), para registrar peróxido de hidrógeno en vez de la corriente de reducción de oxígeno. Aplicaron un potencial de 0.6V donde la corriente es directamente proporcional a la concentración de glucosa [9, 10], (ecuación 2.3).



Años más tarde, en 1975, la compañía Yellow Spring Instrument (YSI) lanzó el primer analizador de glucosa (modelo 23 YSI) en muestras de sangre de  $25 \mu L$  con la tecnología de Clark y Lyons en el que usaron dos electrodos, uno de ellos cubierto con la enzima, y cuantificaron la corriente resultante en la reacción [9].

Sin embargo, a lo largo de los años se han creado numerosos biosensores de glucosa a fin de encontrar el ideal, distinguiendo entre ellos, tres generaciones, descritas a continuación.

### **2.1.1. Primera generación**

En esta generación, entre el electrodo y la GOx se usa al oxígeno como mediador, que en presencia de glucosa, se reduce para generar y detectar peróxido de hidrógeno (ecs 2.1,2.3).

Así, la cuantificación del aumento del peróxido de hidrógeno o la reducción de oxígeno permite medir la concentración de glucosa [11].

Sin embargo, su desventaja es justo la dependencia de oxígeno como mediador fisiológico para transportar electrones de la enzima a la superficie del electrodo, ya que es difícil mantener constante esa concentración de oxígeno, lo que aumenta errores y reduce la linealidad en el sensor [7,9,10].

### **2.1.2. Segunda generación**

En esta generación en vez de oxígeno se usan mediadores artificiales que transportan los electrones del centro redox de la enzima GOx a la superficie del electrodo de una forma más fácil y rápida [9]. Esos mediadores son usualmente de hierro [7] como derivados de ferricianuro, ferroceno y quinonas que usan la mayoría de los sensores comerciales, y metales de transición, entre otros [2,10]. Estos son insolubles, tienen buena estabilidad química, con un bajo peso molecular y un bajo potencial redox que evita interferencias [6,10]. Los mediadores se oxidan en el electrodo, generando una corriente amperométrica [7].

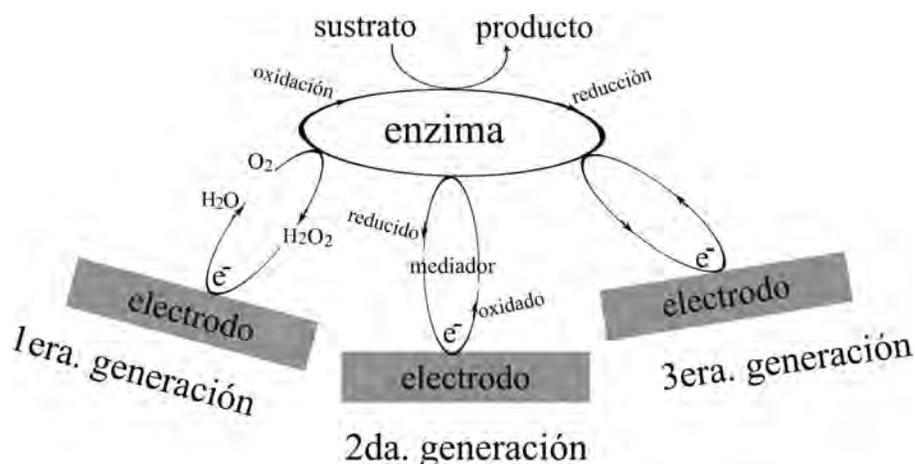
En 1987 Adam Heller y sus colaboradores desarrollaron un método para comunicar el centro redox de la enzima GOx y la superficie del electrodo mediante un “cableado”. Unieron un hidrogel redox con un mediador reducido por la enzima, previniendo el paso de corriente dentro del electrodo [8,10]. Este método es muy usado en los biosensores de glucosa comercializados actualmente.

### 2.1.3. Tercera generación

En esta generación se eliminan los mediadores y se realiza una transferencia directa de electrones al incorporar la enzima GOx sobre la superficie del electrodo para así registrar la corriente amperométrica [2, 8, 11].

Existen publicaciones que describen la transferencia directa de electrones entre la enzima GOx y el electrodo, sin usar mediadores, pero son pocas las que lo prueban exitosamente [9]. Debido a esto, numerosas investigaciones buscan materiales óptimos para los electrodos, ya que la distancia entre la enzima y la superficie del electrodo ocasiona que la transferencia de electrones sea lenta.

En esta generación también se consideran los biosensores de glucosa que no usan enzima, ya que oxidan la glucosa directamente [11]. En la Figura 2.2 se muestran las tres generaciones de sensores de glucosa.



**Figura 2.2:** Figura que muestra las tres generaciones de electrodos enzimáticos amperométricos de glucosa, usando el oxígeno como cofactor, mediadores artificiales y transferencia directa, respectivamente. Modificada de [33]

Un biosensor enzimático electroquímico de glucosa usa al menos dos electrodos, uno cubierto con la enzima GOx. Esta enzima se clasifica como una oxidoreductasa porque cataliza la transferencia de electrones desde un agente reductor a un agente oxidante, es decir, esta enzima cataliza la glucosa para producir peróxido de hidrógeno y ácido glucónico. Se aplica una diferencia de potencial de entre 0.6V-0.8V [10], que es el potencial al que se oxida el peróxido de hidrógeno. Como resultado se cuantifica la corriente producida en la reacción en función de la concentración de glucosa.

## 2.1.4. Inmovilización de enzima

La enzima debe fijarse sobre la superficie del transductor, lo que se conoce como inmovilización. Existen cuatro procesos básicos para inmovilizar una enzima sobre un electrodo, divididos en confinamiento (físicamente) y unión (químicamente) [6, 26], ver Figura 2.3. Los siguientes primeros dos son métodos químicos (en los que se modifica la superficie) y el resto son físicos (en los que se usan materiales viscosos o poliméricos para darle soporte a la enzima cuando se incorpora sobre el electrodo):



**Figura 2.3:** Tipos de inmovilización de enzima. Figura tomada y modificada de [26].

i) unión covalente: químicamente se activan grupos asociados con la matriz del polímero que reaccionan con la proteína para formar una unión estable. Esta es la técnica más usada en la industria porque le brinda a la enzima una mayor estabilidad. Aunque también dentro de la unión covalente se considera el reticulado o entrecruzamiento en el que se forman enlaces covalentes en la enzima mediante la agregación de agentes entrecruzantes.

ii) absorción: la enzima se deposita sobre polímeros sintéticos o naturales, como celulosa y poliestireno; mediante uniones iónicas, fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno. Este es un método sencillo y de bajo costo, pero la unión es débil.

iii) confinamiento en membrana: se usan membranas semipermeables que encapsulan a la enzima y permiten el flujo de otras biomoléculas.

iv) atrapamiento: la enzima es atrapada dentro de la estructura de un prepolímero o una matriz porosa como geles, o fibras. Este método es sencillo y barato, y la enzima no pierde su actividad, además se asume una distribución uniforme.

## 2.2. Microelectrodos

Un electrodo es un conductor (plata, oro, grafito, soluciones salinas) que permite establecer contacto eléctrico con un medio no metálico (soluciones iónicas del cuerpo humano) y así obtener señales de esa interacción.

Los microelectrodos son la miniaturización de los electrodos, con dimensiones de decenas de micrómetros o menos ( $1\mu = 10^{-6}\text{m}$ ), por lo que los microelectrodos más pequeños tendrán un área de  $10^{-14}\text{m}^2$  [12]. Son ampliamente usados en biosensores electroquímicos, bioelectrónica y nanoelectrónica porque sus dimensiones son comparables con el tamaño de las muestras bajo análisis, permitiendo obtener señales pequeñas, incluso a nivel celular. Además de ofrecer soluciones portátiles, controladas, de bajo costo y disponibles para cada aplicación, y se busca que generen sistemas no invasivos.

Los electrodos deben tener una superficie conductora que permita transportar electrones fácilmente, también estabilidad química y térmica, resistencia mecánica, mayor razón superficie-volumen, es decir, miniaturizar, para incrementar su sensibilidad y conductividad [7]; y en algunos casos deben usar un recubrimiento superficial que ayude a inmovilizar las enzimas.

Existen diferentes y numerosos tipos de microelectrodos, algunos se fabrican en micrograbados y son recubiertos de algún conductor [13], otros son microelectrodos pipeta que se rellenan con soluciones electrolíticas o metales [14], en otros se depositan los iones del conductor sobre el sustrato [15], y en muchos otros se usan microporos, nanoalambres, nanotubos o nanopartículas [7]. Cada microelectrodo tiene sus limitaciones, ventajas y desventajas, sin embargo, su elección se define con la aplicación deseada, lo que permite elegir el mejor, los materiales más convenientes, la modificación de su superficie, específicas geometrías y dimensiones e incluso arreglos de microelectrodos.

Como material del electrodo es común encontrar materiales nanoporosos y microporosos que ofrecen superficies con una elevada relación superficie/volumen y que facilitan la adsorción de la enzima, como nanoporos de PtPb, nanofibras de CuO [10], nanotubos de carbón, grafito [7], rodio o rutenio en carbón [9], etc. También metales nobles como platino, oro, plata, iridio, etc, en los que cuanto mayor es la rugosidad superficial, mayor es la actividad electroquímica [10]. Otros como nanopartículas de oro y plata, solas o combinadas con nanotubos de carbono, grafeno, etc [6], he incluso polímeros conductores, como polianilina, polipirrol y poliestireno [7]. Aunque el platino es el más usado por sus excelentes propiedades electroquímicas para detectar  $H_2O_2$  [8].

## 2.3. Glucómetros

Actualmente los glucómetros son biosensores de glucosa muy populares por su constante uso en hospitales y hogares, principalmente, debido al gran número de personas que necesitan o quieren monitorear sus niveles de glucosa en sangre a fin de combatir o prevenir la diabetes.

Los glucómetros se pueden encontrar de distintas marcas, distintos precios y con distintas funciones según las necesidades de las personas.

Un glucómetro se compone de:

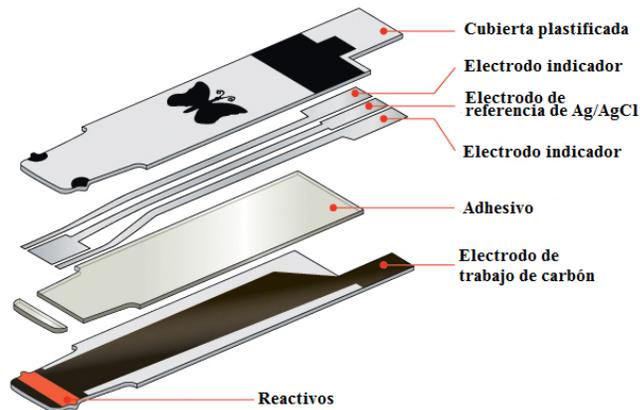
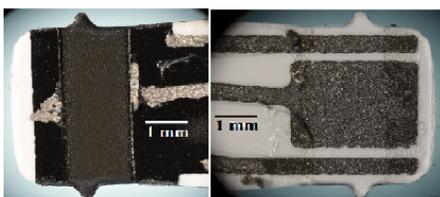
- Lancetas, que son agujas estériles y desechables usadas para obtener una muestra de sangre del paciente.
- Tiras reactivas, que son tiras de plástico con electrodos impresos (sobre los que se han depositado reactivos como enzimas, mediadores, estabilizadores, etc) y aislantes, cuyo diseño permite dosificar la pequeña muestra de sangre obtenida con el uso de la lanceta.
- Dispositivo digital compuesto internamente de un circuito electrónico, baterías, etc, que despliega sobre su pantalla el valor de la glucosa medida.

El proceso siempre es el mismo, el paciente usa la lanceta para pincharse el dedo y obtener una pequeña muestra de sangre que se deposita sobre la tira reactiva, y entre 5 y 30 segundos después se observa sobre la pantalla del dispositivo digital el valor de la glucosa medida.

Las tiras reactivas tienen un electrodo de trabajo y uno de referencia, así como otros electrodos adicionales según la configuración electrónica de cada glucómetro. Estas tiras se producen en masa porque sus electrodos impresos se fabrican con un proceso controlado de deposición de vapor; mientras que los reactivos son depositados sobre los electrodos mediante una técnica de depósito de tinta y se dejan secar. Un ejemplo de tira reactiva comercial se observa en la Figura 2.4.

Todos los glucómetros comerciales son enzimáticos y generalmente usan las enzimas glucosa oxidasa (GOx) y glucosa deshidrogenasa (GDH) como componente catalítico [10].

En [10] se hace una comparación de algunos glucómetros comerciales con algunas de sus características como el rango de medición, la dependencia de temperatura y humedad, el tiempo de respuesta, las enzimas y mediadores usados, entre otras. Así, como se observa en la Figura 2.5, aunque cada glucómetro opera de manera similar, su caracterización depende de los elementos usados para fabricarlo.



**Figura 2.4:** Tira reactiva FreeStyle. En la figura se muestran los electrodos impresos y su arreglo. Estos electrodos hacen contacto con el circuito interno del dispositivo digital.

Manufacturer	Model	Range (mM)	Enzyme	Sample size ( $\mu\text{L}$ )	Test t (s)	Oper. T	Oper humid	Haematocrit	Mediator
Lifescan	OneTouch UltraEasy	1.1 - 33.3	GOx	1	5	6 - 44°C	10-90 %	30 - 55%	--
AccuChek	Aviva	1.0 - 30.0	GDH-PQQ	0.6	5	6 - 44°C	10-90 %	20 - 70%	Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-</sup>
Abbott	FreeStyle Lite	1.1 - 27.8	GDH-FAD	0.3	5	4 - 40°C	5% to 90%	15 - 65%	Os 2+/3+
Bayer	Ascensia Contour	1.0 - 30.0	GDH-FAD	0.6	5	5 - 45°C	10 - 93%	--	Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-</sup>

**Figura 2.5:** Características de glucómetros comerciales de las compañías Lifescan, AccuChek, Abbott, Bayer para la medición de glucosa. En la tabla se muestra el rango de medición, enzima, tamaño de muestra, tiempo de respuesta, temperatura, humedad, hematocrito y mediadores. Glucosa oxidasa (GOx), glucosa deshidrogenasa (GDH), pirroloquinolinequinona (PQQ), flavín adenín dinucleótido (FAD). Tomado de [10].

## 2.4. Estado del arte

### 2.4.1. El biosensor de glucosa

Aunque a lo largo de los años se han creado numerosos biosensores de glucosa con diferentes materiales, diferentes diseños, diferentes métodos de detección, diferentes enzimas, diferentes tipos de inmovilización de la enzima, enzimáticos o no enzimáticos, con o sin mediadores; continúa siendo un reto miniaturizarlo. Se busca obtener una eficiente y directa transferencia de electrones entre el sitio activo de la enzima y la superficie del electrodo. También el lograr

mediciones de glucosa en sangre en tiempo real, que sean precisas, controladas, continuas, rápidas, selectivas. Lograr que el glucómetro sea de bajo costo, disponible para todos, confiable, de alta sensibilidad y estabilidad, y no invasivo. Por lo que para lograrlo son necesarios los esfuerzos de especialistas en medicina, biología, electroquímica, bioingeniería, matemáticas, física, entre otros. En donde cada investigación aporte elementos para crear un biosensor que cumpla con el objetivo de controlar la diabetes, ésto es, monitoréando los niveles de glucosa en sangre. Ya que existen numerosas investigaciones del tema pero en comparación, pocos glucómetros que solucionen completamente las necesidades de la población en general.

#### **2.4.2. Enzimáticos vs no enzimáticos**

Los biosensores enzimáticos se comercializan con éxito para medir niveles de glucosa en sangre porque las enzimas brindan mediciones selectivas. Sin embargo, su uso es limitado por su alto costo y las dificultades en su inmovilización e inestabilidad ocasionada por cambios de temperatura, pH, humedad y agentes químicos tóxicos, lo que puede provocar que la enzima disminuya su actividad o se desnaturalize [2, 11].

Años antes de que Clark y Lyons propusieran su electrodo enzimático, Walther Loeb oxidó la glucosa electroquímicamente en ácido sulfúrico en un ánodo de plomo [10]. Algunos componentes metálicos tienen actividad catalítica primaria, es decir, pueden catalizar por sí solos una reacción pero con velocidad menor que si se usa la enzima [25].

Los sensores no enzimáticos representan una atractiva solución para sensar glucosa en sangre sin preocuparse por el delicado tratamiento de la enzima, pero aún se busca perfeccionar la directa oxidación de la glucosa sobre el electrodo, porque entre sus dificultades se encuentran, la lenta oxidación de la glucosa, el ensuciamiento del electrodo, entre otros. Aunque la más importante es su falta de selectividad, ya que uno enzimático cataliza una molécula específica, pero en uno no enzimático existen “interferencias electroactivas” que se encuentran en la sangre y que modifican y sobrestiman la medición de glucosa, más aún si estos sensores sólo usan un potencial fijo de oxidación (oxidando también estas interferencias) [10].

Las muestras de sangre no fueron usadas en los análisis del presente trabajo, pero es conveniente tener una idea del reto de la selectividad en un biosensor de glucosa. En la sangre se pueden encontrar interferencias como el ácido úrico, ácido ascórbico o vitamina c, bilirrubina, la cisteína, la dopamina; otros azúcares como la maltosa, la galactosa, xilosa; fármacos como el acetaminofeno y el ácido salicílico que son componentes del paracetamol y la aspirina, incluso la

tolazamida, un fármaco usado para disminuir los niveles de glucosa en sangre en diabéticos Tipo 2; altas concentraciones de triglicéridos que compitan con glucosa en el volumen de la muestra, entre muchas más [10].

Las razones anteriores son válidas para justificar que la investigación hacia “un mejor biosensor de glucosa” estén centradas en los biosensores enzimáticos que brindan alta selectividad y no toxicidad. Más aún si uno de los retos presentes es monitorear continuamente los niveles de glucosa en sangre in vitro. Sin embargo, los esfuerzos por desarrollar sensores de glucosa no enzimáticos siguen creciendo, dando soluciones como la reducción del potencial de oxidación y el uso de membranas que excluyan las interferencias. En el presente trabajo se inició con un biosensor de glucosa enzimático, y luego se continuó con uno no enzimático, mismos que se describirán más adelante, analizando sus pros y contras.

# Capítulo 3

## Microfluídica

La microfluídica es la ciencia de la mecánica de fluidos a microescala, que manipula desde microlitros ( $\mu\text{L}$ :  $10^{-6}\text{L}$ ) hasta picolitros ( $\text{pL}$ :  $10^{-15}$ ).

El término fluido nos es común porque en nuestra vida hemos visto correr el agua de un río o una calle en un día de fuerte lluvia o porque nos imaginamos las olas del mar. Pero con la microfluídica, que es la ciencia que manipula los pequeños volúmenes de fluidos, nos es inusual imaginar por qué en un amanecer encontramos gotas de rocío sobre el césped y las flores, y por qué una hormiga puede quedar atrapada en una gota de agua. Y es que la física cambia cuando descendemos a la microescala, donde dominan fenómenos como el flujo laminar, la difusión, efectos de capilaridad y tensión superficial.

La microfluídica ha progresado a lo largo de los años porque integrada a la microelectrónica permite construir biosensores en los que se registran y analizan respuestas fisiológicas. Dispositivos más complejos como los BioMEMS (Bio-Sistemas Microelectromecánicos) y Lab on a Chip, que pueden ser portátiles, son aplicables en las ciencias biológicas, químicas y médicas porque reducen su tamaño para realizar varios experimentos en paralelo y obtener resultados más precisos. Además, al reducir muestras y reactivos, también se reducen costos, tiempo y energía.

Sin embargo, esta ciencia también presenta retos importantes si se planea construir un dispositivo microfluídico porque por lo general una microgota se evapora rápidamente y cualquier defecto de superficie en el material puede impedir que la gota fluya por el canal microfluídico. A continuación se mencionan algunos conceptos importantes a considerar en la microfluídica para enfrentar los retos presentes si se planea construir un canal microfluídico, en particular, trataremos los líquidos.

### 3.1. La mecánica de la microfluídica

Los líquidos tienen varias propiedades que los definen, como su volumen, densidad y viscosidad. Sus fuerzas moleculares no son tan fuertes, lo que les permite fluir y deformarse si se les aplica una fuerza. Además, son incompresibles, es decir, su volumen no cambia con la presión aplicada. La viscosidad es la medida de la resistencia interna del flujo a la deformación dada a cierta temperatura.

Existen dos clases de fluidos, los newtonianos y los no newtonianos. Los newtonianos como el agua y el aire son aquellos en los que su viscosidad es constante. Los no newtonianos, como la sangre (por la presencia de células rojas) y la maicena son aquellos en los que su viscosidad depende de la fuerza aplicada, por lo que en estos encontramos un rango de valores de viscosidad.

Al reducir el tamaño de un sistema, como en un microcanal, la razón área superficial-volumen aumenta, lo que provoca que los efectos superficiales dominen sobre los efectos volumétricos, es decir, las fuerzas viscosas dominan sobre las fuerzas de inercia [16].

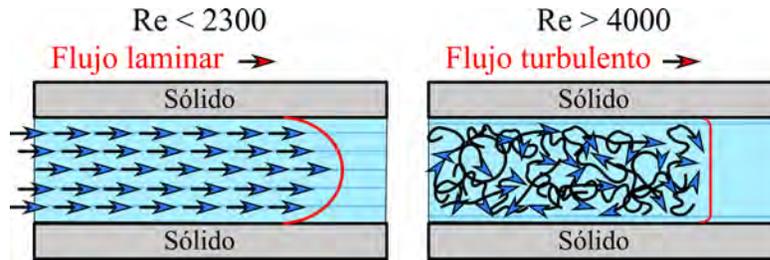
Así, se distinguen dos tipos de flujo, el turbulento y el laminar. En el flujo turbulento las partículas fluidas se mueven en caminos irregulares, de manera estocástica e inestable. Aquí, las fuerzas inerciales dominan sobre las viscosas mientras que en el flujo laminar, que es de interés en el presente trabajo, las partículas fluidas se desplazan en trayectorias lisas como láminas paralelas que se deslizan una sobre otra sin mezclarse, dominando las fuerzas viscosas sobre las de inercia [16].

Enseguida se presentan algunos conceptos útiles en el desarrollo de un sistema microfluídico.

#### Número de Reynolds

El número de Reynolds es una medida adimensional que permite determinar si un flujo es turbulento o laminar [17], y se define como la relación entre la velocidad de transporte macroscópico (dinámico) y la velocidad de transporte microscópico (difusivo).

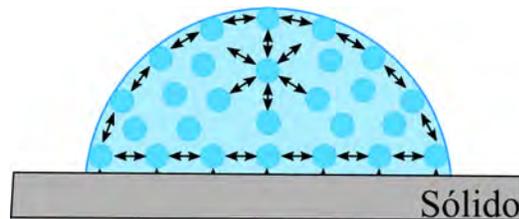
Este número es proporcional a la longitud del canal que está definido por su área transversal, por lo que en un microcanal se tiene un número de Reynolds menor a 1, lo que indica que nos encontramos con un flujo laminar. En general para números de Reynolds menores a 2300 tendremos flujo laminar, que recordemos que es donde dominan los efectos viscosos, por lo que en un canal microfluídico, el agua se comporta como un fluido viscoso. Ver Figura 3.1.



**Figura 3.1:** Figura que muestra el comportamiento de los flujos laminar y turbulento, en el turbulento la zona cercana a las paredes del sólido presenta flujo laminar.

## Tensión superficial

Denotada por  $\gamma$ , la tensión superficial es la fuerza de tensión por unidad de longitud [ $Nm^{-1}$ ] que se refiere a la cohesión de las moléculas del líquido en una interfaz, y su valor numérico depende de las interacciones moleculares. Esta fuerza es la responsable de que una gota de agua “se pegue” en las paredes del material en vez de deslizarse por el microcanal, debido a que sus moléculas experimentan una fuerza de cohesión mayor entre ellas que con el material, manteniendo así, su forma esférica, como se puede observar en la Figura 3.2. La cantidad de energía necesaria para romper la superficie y esparcir la gota, aumentando la superficie de contacto es la tensión superficial [17, 18].



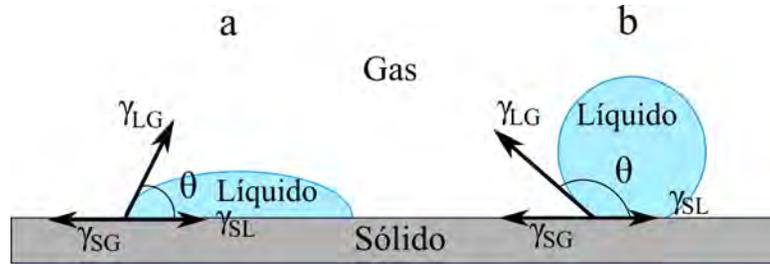
**Figura 3.2:** Las moléculas de la superficie de un líquido se unen entre ellas y con las moléculas del volumen, generando una tensión superficial como si fuera una membrana elástica.

## Mojabilidad de la superficie

Siempre que un líquido está en contacto con una superficie sólida, sus moléculas se adhieren a esta, pero también mantienen una fuerza de cohesión entre ellas. Sin embargo, no todas las superficies sólidas “se mojan” de la misma forma con todos los líquidos, esto depende del material en el que fluye el líquido y de la viscosidad del mismo, además influye la topografía de la superficie, la dirección de mojabilidad y la dinámica [19].

Para medir la mojabilidad de la superficie se mide el ángulo de contacto que forma la gota del líquido respecto de la superficie sólida, lo que permite clasificar a un material como hidrofóbico

o hidrofílico, si el ángulo de contacto es mayor o menor a  $90^\circ$ , respectivamente, como se puede observar en la Figura 3.3.



**Figura 3.3:** Esta figura muestra que a) si las fuerzas adhesivas dominan sobre las cohesivas, el líquido moja la superficie y se clasifica como superficie hidrofílica,  $\theta < 90^\circ$ ; b) si las fuerzas cohesivas dominan sobre las adhesivas, el ángulo de contacto aumenta y se clasifica como superficie hidrofóbica,  $\theta > 90^\circ$ . En la figura se visualizan las tensiones superficiales (denotadas por  $\gamma$ ), interfaces: LG (líquido-gas), SL (sólido-líquido), SG (sólido-gas).

Este ángulo de contacto permite seleccionar el material adecuado para fabricar microcanales, que deben ser bastante hidrofílicos. Sin embargo, existen casos en los que el ángulo de contacto presenta histéresis, es decir, no se conserva fijo. Por ejemplo, el PDMS es un polímero hidrofóbico muy usado en dispositivos microfluídicos, que al modificar su superficie se hace hidrofílico.

En el momento en que la gota del líquido se adhiere a una superficie sólida, las fuerzas cohesivas y adhesivas buscan el equilibrio en el cual la energía superficial es mínima, es decir, las tensiones superficiales  $\gamma_{LG}$ ,  $\gamma_{SL}$  y  $\gamma_{SG}$  se equilibran, generando una pendiente entre las superficies LG y SL, que indica el ángulo de contacto  $\theta$  [18].

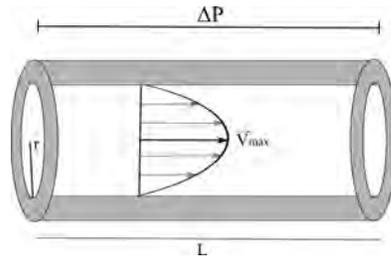
### Ley de Poiseuille

Si consideramos un flujo laminar en un microcanal, el líquido se adhiere a la superficie del sólido y se asume la condición de límite de no deslizamiento en la que la velocidad del fluido es igual a la del sólido, y si el sólido está en reposo, la velocidad entre el fluido y el sólido en sus puntos de contacto es cero [16]. La ley de Poiseuille, desarrollada por el médico francés Jean Poiseuille, permite obtener la tasa de flujo volumétrico, la caída de presión y la resistencia efectiva de un fluido viscoso, incompresible y laminar.

Esta ley dice que para que un fluido se mantenga en movimiento a través de un tubo, es necesario que exista una diferencia de presión entre sus extremos, como lo ejemplifica la Figura 3.4.

### Capilaridad

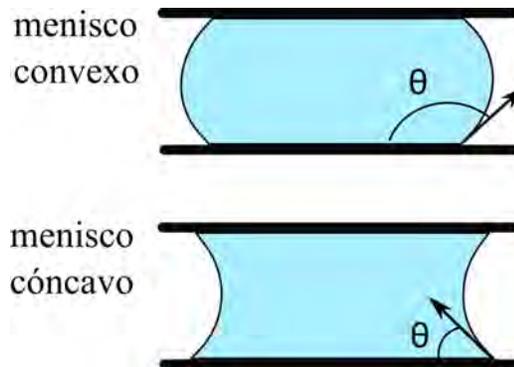
La capilaridad es una propiedad del líquido que es consecuencia de la tensión superficial y



**Figura 3.4:** La diferencia de presiones en un tubo permite que el fluido se mantenga en movimiento.

que le permite al líquido deslizarse por un microcanal balanceando las presiones, es decir, es de gran utilidad cuando se desea que la gota del líquido entre por sí sola a un microcanal, como en el caso de las tiras reactivas de los glucómetros comerciales.

Consideremos una gota de simetría esférica, si las fuerzas cohesivas son mayores que las adhesivas, la gota formará un menisco convexo. Al contrario, si las fuerzas adhesivas son mayores que las cohesivas, la gota formará un menisco cóncavo, respecto del microcanal en el que se encuentra, como ejemplifica la Figura 3.5 [17]



**Figura 3.5:** Tipos de menisco formado en un microcanal.

### 3.2. La microfluídica en el biosensor de glucosa

Las propiedades antes mencionadas convierten a la microfluídica en uno de los pilares en la construcción del biosensor de glucosa. Porque al disminuir las dimensiones de elementos electrónicos como los electrodos, también es necesario reducir el tamaño de las muestras a analizar como las muestras de glucosa o de sangre. Los beneficios de usar pequeñas muestras de líquidos son que los resultados son más rápidos, precisos y confiables; además se reducen costos monetarios (porque se reduce la cantidad de muestras y material), tiempo, procesos y energía, lo que permite trabajar de manera más eficiente y organizada.

Las consideraciones que se deben tomar es que el agua es un fluido newtoniano y su viscosidad tiene un valor constante, pero la sangre al ser un fluido no newtoniano presenta un rango de valores de viscosidad, y que existen los flujos turbulento y laminar, haciéndose éste último presente en los microcanales.

Así, para que el microfluido fluya a través de un microcanal por acción de capilaridad es necesario analizar además de la diferencia de presiones, las propiedades del líquido y del material del microcanal, porque en la interfaz líquido-material las fuerzas de cohesión y de adhesión tienden a balancearse, lo que permite clasificar a un material como hidrofílico o hidrofóbico y así seleccionar el material óptimo o las técnicas adecuadas para mejorar la mojabilidad del material, como el PDMS. Lograr que el fluido se deslice y no quede atrapado en el extremo inicial del microcanal. Siendo también de gran importancia, el considerar la geometría que permita o no romper la tensión superficial del microfluido.

# Capítulo 4

## Técnicas de microfabricación

En este capítulo se aborda el tema de las técnicas de fabricación usadas para crear microestructuras que tienen diversas aplicaciones en la biotecnología. Sin embargo, en lo que al presente trabajo concierne, estas técnicas pueden ser empleadas para fabricar electrodos para medir distintas concentraciones de glucosa y convertir la respuesta biológica en una cuantificable y procesable señal.

Para seleccionar la técnica adecuada es necesario identificar el proceso de fabricación de electrodos, que en el presente trabajo, consiste en elaborar un molde sobre el sustrato de trabajo y rellenarlo con material conductor. Las técnicas de fabricación disponibles en el Taller de Óptica Láser para crear los “micromoldes” son grabado láser, micromaquinado CNC (control numérico computarizado) y molde-réplica (con Shrinky Dinks), mismas que se describen en este capítulo. Los electrodos que aquí se reportan se fabricaron usando la metodología top-down [17], que consiste en construir un electrodo “grande” en el orden de milímetros, y miniaturizar para obtener un microelectrodo (debido a las limitaciones en las técnicas de fabricación).

Además es importante considerar que aunque existen numerosas y conocidas técnicas de microfabricación, la óptima es aquella que está disponible y que es compatible con los materiales a usar. Mejor aún si es de bajo costo, fácil y reproducible.

### 4.1. Materiales

En los capítulos anteriores se analizó la importancia de los materiales en la construcción del biosensor de glucosa, ya que éstos deben de ser compatibles con la técnica de fabricación y sus propiedades deben permitir que la muestra de glucosa llegue correctamente hasta los microelectrodos. Por lo que en esta etapa se seleccionan los materiales y equipos que serán

usados, así como las dimensiones y geometrías de los microelectrodos.

Los materiales seleccionados son polímeros que permiten elaborar prototipos de manera rápida y sencilla, son de bajo costo, son biocompatibles, biodegradables, y no requieren de procesos rigurosos para trabajarlos, como un cuarto limpio.

La palabra polímero viene de las palabras griegas “poly” que significa “mucho” y meros que significa “parte”, lo que se traduce en un material compuesto de muchas partes/moléculas unidas entre sí por enlaces covalentes.

#### **4.1.1. Polimetilmetacrilato (PMMA)**

El PMMA es un polímero termoplástico sintético, mejor conocido como acrílico. Es un material con alta transparencia óptica, es resistente a la radiación ultravioleta y a la intemperie sin afectar sus propiedades mecánicas u ópticas. Se puede colorear, moldear, cortar, perforar, moler, lijar, grabar, formar y unir a sí mismo o a otros polímeros. Además, para los objetivos requeridos es de fácil manipulación y es compatible con las técnicas de microfabricación de grabado láser y micromaquinado CNC.

#### **4.1.2. Polidimetilsiloxano (PDMS)**

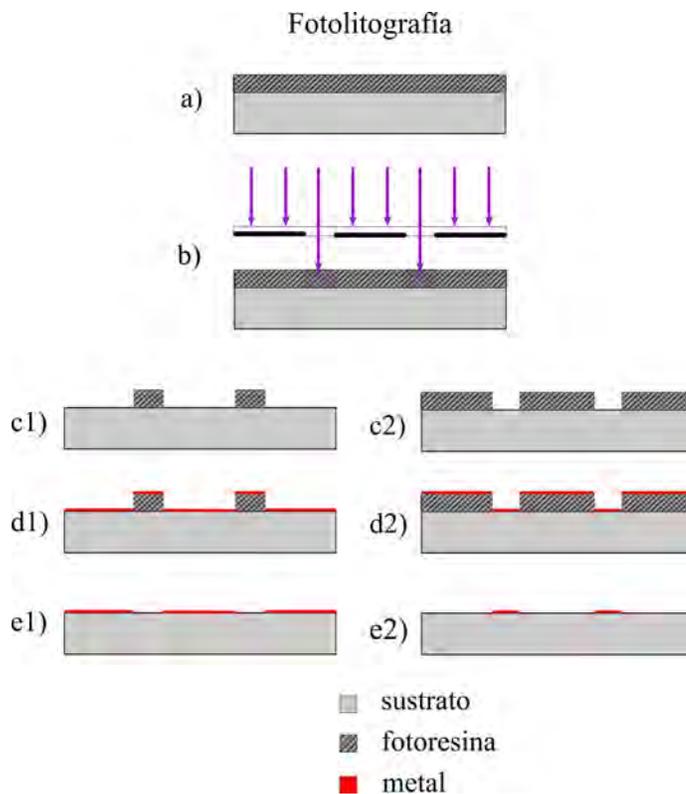
El PDMS es un polímero ópticamente transparente, moldeable, flexible, suave, no es tóxico, es de fácil elaboración y permite trabajar con un depósito sencillo y controlado. Es un material hidrofóbico (con un ángulo de contacto de agua de  $110^\circ$ ), pero su superficie puede ser modificada si se oxida con exposición a un plasma de oxígeno para volverse hidrofílica (con un ángulo de contacto de agua de alrededor de  $10^\circ$ ). Aunque presenta histéresis, es decir, después de aproximadamente media hora regresa a su estado hidrofóbico, propiedad que puede cambiar con tratamientos especiales [20].

El PDMS es el polímero más usado en la fabricación de sistemas microfluídicos por ser un excelente material para replicar complejas estructuras 3D de una forma rápida y sencilla. Además, cuando recién se ha oxidado con plasma, se puede sellar a sí mismo y a otros materiales sin adhesivo, reversible o incluso irreversiblemente, esto lo pone delante de otros materiales como el PMMA y el vidrio que necesitan adhesivos para sellarse, cuestión que es difícil de manejar si se trabaja con microestructuras, como es el caso del presente trabajo.

## 4.2. Fotolitografía

La microfabricación tiene como objetivo “crear estructuras muy pequeñas”, tan pequeñas como sea posible según la técnica empleada. La litografía (que viene de las palabras griegas lithos : piedra y gráphein : dibujo) [17] es la más usada en la ciencia de la miniaturización. Su forma más común es la fotolitografía y es muy útil porque permite depositar varias capas de distintos materiales, incluidos metales.

En la fotolitografía, el sustrato se recubre de manera uniforme con un material fotosensible llamado fotoresina que puede ser positiva o negativa. Luego el patrón deseado se dibuja sobre una máscara (con regiones transparentes y opacas) que se alinea y proyecta sobre el sustrato, a través de radiación ultravioleta, que cambia las propiedades de la fotoresina expuesta. Enseguida para remover la fotoresina no deseada, se aplica una solución reveladora que según el caso, desestabiliza a la fotoresina positiva y la hace soluble, o que estabiliza a la fotoresina negativa y se vuelve insoluble.



**Figura 4.1:** Fotolitografía, a) la fotoresina (positiva o negativa) se distribuye uniformemente sobre el sustrato; b) se expone a luz UV, alineando la máscara con el sustrato; c) se revela la resina expuesta, (1) si es negativa, (2) si es positiva; d) depósito de metal; e) desprendimiento de la fotoresina (lift off). Imagen modificada de [8]

Esta técnica también se usa para crear capas metálicas que se depositan después de la etapa de fotolitografía, preparando los sustratos con procesos de deposición química de vapor (CVD, por sus siglas en inglés) o de deposición física de vapor (PVD, por sus siglas en inglés), en éstas los átomos del metal se depositan sobre el sustrato [17]. Probablemente la técnica de deposición más usada es la pulverización catódica (sputtering) en la que los átomos de un material (como oro, platino, cromo, etc) se liberan para ser depositados sobre un sustrato. En esta técnica la elección de materiales es casi ilimitada, aunque durante la deposición se pueden incorporar impurezas o la radiación y partículas pueden dañar el sustrato. Además es muy costoso [17]. El metal no deseado que está sobre la fotoresina se despegará para dejar sólo el metal sobre el sustrato. (Ver Figura 4.1)

Aunque la fotolitografía es la principal técnica de microfabricación aplicada en numerosas tecnologías como la microelectrónica, es un proceso costoso en equipo y tiempo, condiciones ambientales (cuarto limpio); lo que la hace inaccesible para muchos y dificulta la realización de prototipos rápidos y baratos [21].

### **4.3. Litografía suave**

La litografía suave permite elaborar prototipos rápidos y de bajo costo a partir de polímeros moldeables, generalmente PDMS, en los que se crean diseños de estructuras a micro-nano escala mediante un estampado. En esta entran las técnicas impresión de microcontacto, molde-réplica, moldeo de capilaridad, micromoldeo con solvente, entre otros [21].

Lo que nos lleva a nuestra primera técnica de fabricación usada: molde-replica, empleando PDMS.

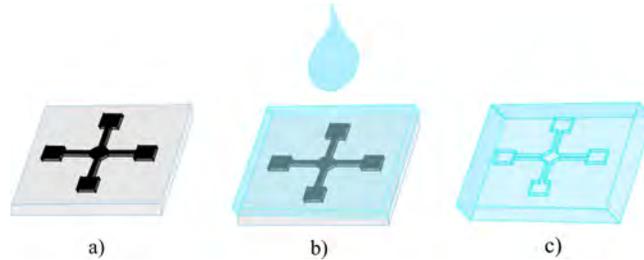
#### **4.3.1. Molde-réplica usando Shrinky Dinks y PDMS**

Los Shrinky Dinks son termoplásticos de poliestireno que se usan normalmente como juguetes para niños que crean dibujos sobre estos y que al hornearlos se encogen con el calor en aproximadamente un 60% su tamaño original, obteniendo dibujos con el color y forma con que se elaboraron, además de adquirir cierto relieve que depende de la cantidad de tinta con que se dibujaron.

Estos termoplásticos resultan también ser útiles para crear moldes de diferentes dimensiones y geometrías; y obtener su réplica en PDMS.

Esta técnica de microfabricación molde-réplica (REM) es sencilla, de muy bajo costo y permite realizar prototipos rápidos. Consiste de tres pasos básicos:

- a) crear un molde maestro usando el termoplástico Shrinky Dink.
- b) verter el polímero sobre el patrón del molde maestro.
- c) curar el PDMS y desprenderlo del molde maestro para obtener una réplica suave.



**Figura 4.2:** Técnica de molde-réplica, a) molde maestro, b) vaciado del prepolímero y polimerización, c) desprendimiento de la réplica y obtención de un molde suave.

## 4.4. Micromaquinado CNC

El nacimiento de un mecanizado mecánico preciso se remonta a la invención del torno del alfarero, atribuido a Anacharis el escita, y más tarde a los astrónomos matemáticos Hiparco de Nicea y Claudio Ptolomeo, que usaron graduados instrumentos para navegar y observar los cuerpos celestes, como el astrolabio creado por Ptolomeo [17]. A lo largo de los años, diferentes herramientas y materiales, como el diamante, han sido usados para hacer maquinado de precisión, por ejemplo, en 1940 Norio Taniguchi introduce el término nanotecnología usando mecanizado ultrasónico.

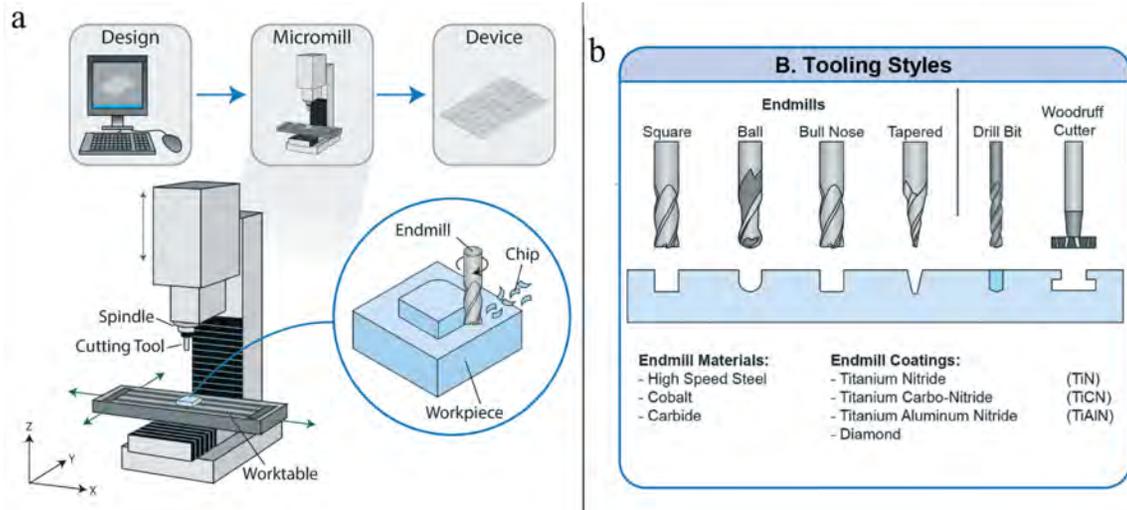
Esta necesidad llevó al desarrollo del micromaquinado CNC (control numérico computarizado) que es un método de fabricación en el que se usan cortadores rotativos para remover pequeñas cantidades de material de un sustrato de trabajo con ayuda de controladas herramientas de ingeniería y programación computarizada para crear estructuras complejas con resolución micrométrica [17].

Su proceso consiste de tres etapas básicas [27] (Ver Figura 4.3-a):

a) Elaboración del diseño: se usa software CAD (diseño asistido por computadora) para modelar estructuras 3D que serán transferidas por CNC.

b) Micromaquinado: la máquina se compone de una mesa de trabajo ajustable con el CNC en los ejes X, Y donde se coloca el sustrato de trabajo; una herramienta de corte (fresa) que remueve el material del sustrato; y un eje superior que asegura y gira la herramienta de corte, ajustable en el eje Z.

- b1) Se hace un ajuste sustrato-cortador
- b2) Se maquina el diseño usando el CNC
- c) Dispositivo listo: sustrato con microestructuras de alta resolución elaboradas en tiempo corto, compatible con el PMMA (sustrato de trabajo seleccionado).



**Figura 4.3:** Micromaquinado CNC: a) proceso, b) cortadores rotativos [Imagen tomada de [27]]

El micromaquinado de una estructura depende de las características de la máquina CNC, como la potencia del motor, el desplazamiento y velocidad en los ejes X, Y, Z, la herramienta de corte y su velocidad de rotación, entre otros. Sin embargo, la rugosidad superficial y resolución de la estructura dependen de las características del cortador, (Ver figura 4.3-b) material, geometría, desgaste y otros factores como las rebabas causadas durante el maquinado que pueden quedar adheridas a la fresa. Además, el tamaño del cortador rotativo y la alineación cortador-sustrato influyen en la profundidad del microelectrodo.

## 4.5. Grabado Láser

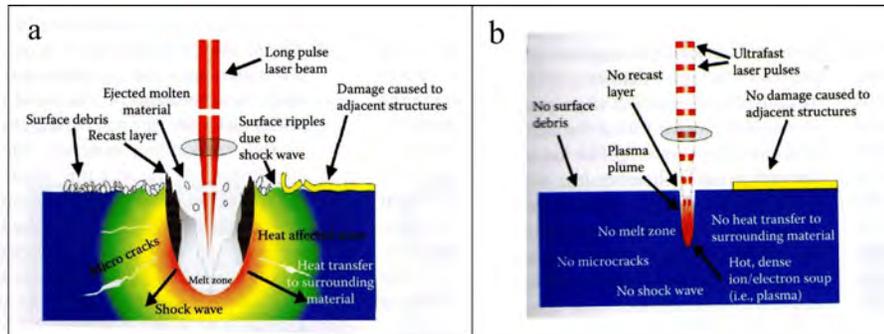
La ablación láser es una técnica del tipo eliminación por energía térmica, en el que una fuente térmica (láser) derrite, funde o evapora localmente el material de un sustrato [17,22].

En esta técnica, en general, para eliminar eficientemente pequeñas cantidades de material de un sustrato se debe considerar el tipo de láser y el material que se desea destruir térmicamente, debido a que estos poseen propiedades características que conllevan a la ablación.

Cada material tiene una absorbancia específica a una determinada longitud de onda, que le permite al láser con la potencia adecuada, aumentar la temperatura de un área local del material

definida por el tamaño del spot del láser (diámetro mínimo del haz del láser enfocado), es decir, el láser se debe enfocar para controlar la región de ablación y obtener una mayor resolución en el grabado sin dañar la región circundante.

Otras características importantes son la longitud del pulso láser, que puede ser ultracorto, corto y largo, prefiriendo los primeros en los que hay menos difusión de calor; y su modo de operación, que puede ser continuo o pulsado. Además el número de grabados (recubrimiento-ablación) influye en la profundidad del molde.



**Figura 4.4:** Ablación láser: a) efectos indeseados en ablación láser con pulsos largos, b) ventajas de usar ablación láser con pulsos cortos, donde se crea un plasma por la alta densidad de potencia. Figura tomada de [17]

En ocasiones se tienen sustratos transparentes como el PMMA y el PDMS en los que existe un alto grado de difracción de luz, por lo que es necesario recubrirlos con un material absorbente, como carbón.

# Capítulo 5

## Ensamble de microcanales y micromoldes

Una vez obtenido el micromolde con alguna de las técnicas de microfabricación descritas antes, se solicitó un estudio de perfilometría del micromolde obtenido. Luego se procedió a preparar los electrodos recubriendo el molde con material conductor, proceso que se detalla en el siguiente capítulo.

Para desarrollar el sistema microfluídico que permita transportar la muestra de glucosa a través de un canal hasta los electrodos, es necesario identificar las propiedades de los materiales y la fabricación de los microelectrodos y microcanales que se desean sellar.

Las técnicas de ensamblaje o unión microfluídica, para unir dos sustratos y encapsular microelectrodos y microcanales fabricados en uno o ambos sustratos se clasifican en directas e indirectas [23], que para el caso del PDMS y PMMA las más usuales se mencionan a continuación.

### 5.1. Unión indirecta

En la unión indirecta se usan adhesivos para sellar. Usualmente son adhesivos sólidos o líquidos, como los curados con radiación UV; aunque también se usa PDMS parcialmente curado como un adhesivo para unir sustratos de PMMA y del mismo PDMS. Estos funcionan, pero en ocasiones los microcanales quedan sumergidos en el adhesivo o en el PDMS. Otros adhesivos se activan térmicamente a altas temperaturas (100 - 150 °C), lo que puede provocar la desaparición de microcanales debido sus dimensiones y a la temperatura usada. Considerando por ejemplo, que la temperatura de transición del PMMA es de 105°C.

En este tipo de unión además de controlar una precisa alineación, se debe tomar en cuenta que en general, la composición del adhesivo puede modificar las propiedades ópticas, químicas y mecánicas del microcanal [23].

Así que como en estos casos la obstrucción de canales es lo más común, se suele usar capas sacrificiales para evitar la deformación del canal al momento de la unión, usando materiales como cera líquida, agua congelada o gelatina; que si no se maneja con cuidado puede finalizar en el ensuciamiento de los canales.

## 5.2. Unión directa

En la unión directa se unen los sustratos sin usar un material adicional. Uno de los métodos es la unión por fusión térmica, en donde se calientan ambos sustratos a la temperatura de transición  $[T_g]$  de alguno o ambos materiales, además de aplicar presión. Lo que puede provocar deformación, colapso o fusión de microcanales. Otro método es la unión con solventes en forma líquida o vapor, por ejemplo para PMMA se usa acetona, etanol, metanol o isopropanol, pero esto puede deformar y desgastar los sustratos y sus microcanales. También está el popular y muy empleado tratamiento y modificación de superficie, que aumenta la energía superficial en el material y mejora la adherencia entre los sustratos, este método es el más usado en los sistemas microfluídicos con el PDMS.

La modificación de superficie de un material permite mejorar sus propiedades, por ejemplo, el PDMS es de naturaleza hidrofóbica y tiene una baja energía superficial, sin embargo, un tratamiento a su superficie permite aumentar su energía superficial y hacerlo hidrofílico, lo que mejora su mojabilidad; y promueve su adhesión en sí mismo y con otros materiales como vidrio y PMMA.

Este tratamiento se puede llevar a cabo por plasma, fotoactivación (UV) y descarga corona, en los que se introducen grupos silanos a la superficie del material. Siendo la descarga corona un proceso muy efectivo y de bajo costo en el que se aplica un alto voltaje a un conductor eléctrico provocando la ionización del gas que lo rodea, creando un plasma (cuarto estado de agregación de la materia en el que sus electrones libres conducen electricidad) localizado o “corona”. Las especies de alta energía (electrones, iones) en el plasma chocan con la superficie del polímero, y oxidan las especies orgánicas en la superficie, añadiendo favorables grupos funcionales como hydroxyl (O - H) y carboxyl (O - C) [28].

# Capítulo 6

## Transducción electroquímica

En capítulos anteriores se definió a un biosensor electroquímico como un dispositivo que se compone de un elemento de bioreconocimiento integrado a un electrodo que convierte la respuesta biológica en una eléctrica. Sin embargo, el electrodo necesita de herramientas de transducción que le permitan desarrollar dicha acción.

Existen varios métodos electroquímicos para registrar y cuantificar la señal generada durante una reacción química que se clasifican de acuerdo al tipo de sensor electroquímico, de conductividad, de potencial y de voltametría - amperometría (relación corriente-potencial) [14]. Enseguida se describen las últimas dos técnicas, voltametría y amperometría, también llamadas técnicas voltamperométricas, que son de interés para el presente trabajo.

### 6.1. Voltametría

La voltametría es una técnica electroquímica en la que se mide la corriente en función del voltaje aplicado, y existen varias, según el tipo de tensión aplicada.

Un ejemplo importante es la voltametría cíclica que aplica una tensión con forma de onda triangular que permite analizar la oxidación y reducción de los analitos. En este método se hace un barrido de potencial y se mide la corriente resultante, obteniendo una curva de respuesta corriente-potencial llamada voltamograma que es muy útil en reacciones electroquímicas para conocer su potencial redox, su concentración, su velocidad y reversibilidad. El término “cíclica” se refiere a que se establecen intervalos de potencial durante el barrido, así se pasa de  $V_1$  a  $V_2$  y regresa a  $V_1$ , formando un barrido cíclico.

La medición con esta técnica se realiza con un dispositivo llamado potencióstato, y son

necesarios tres electrodos, uno de referencia, uno de trabajo y un contraelectrodo (auxiliar).

La diferencia de voltaje se mide entre los electrodos de referencia y trabajo, mientras que la corriente se mide entre los electrodos de trabajo y el contraelectrodo. Cabe recalcar que la corriente no fluye entre los electrodos de trabajo y de referencia.

## 6.2. Amperometría

La amperometría es una técnica electroquímica donde se mantiene un potencial constante y se mide la corriente resultante de una reacción redox, que es proporcional a la concentración en masa del analito [7, 24]. Este dispositivo se forma con dos o tres electrodos, uno de referencia, uno de trabajo, por los que circula la corriente, y un contraelectrodo (si es necesario).

## 6.3. Amperometría vs voltametría

En las dos técnicas de transducción electroquímica descritas antes es necesario usar un electrodo de trabajo donde se lleva a cabo la reacción redox, un electrodo de referencia y un contraelectrodo. Sin embargo, si las corrientes generadas son muy pequeñas el contraelectrodo no es necesario [6].

En la voltametría cíclica el voltamograma muestra un pico de corriente en un potencial dado, que es donde ocurre la reacción óxido-reductiva de cierto analito. Es por esto que esta técnica es ampliamente usada para detectar el potencial redox de determinadas sustancias. Lo que conlleva también a una de sus desventajas ya que esto puede generar una gran cantidad de corriente de fondo, modificando por ejemplo, la concentración que se desea medir.

Mientras que la amperometría es más selectiva porque en esta se proporciona un potencial constante, aunque también pueden existir otras interferencias que se oxiden a ese potencial, generando error en las mediciones. Sin embargo, en el presente trabajo se usa la enzima para realizar una cuantificación de glucosa súper selectiva, y además se usaron muestras de glucosa.

Dicho lo anterior, se considera innecesario usar la voltametría cíclica como técnica de transducción electroquímica para cuantificar la concentración de glucosa, empleando la mejor conocida amperometría, que además es más sensible, simple, fácil y barata.

## 6.4. Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIS)

La espectroscopia de impedancia electroquímica es un método electroquímico en el que, como su nombre lo indica, se obtiene un espectro de impedancias que permite conocer información sobre las propiedades resistivas y capacitivas de una superficie, como un electrodo, entender su comportamiento y analizar si es un adecuado transductor en un biosensor electroquímico.

En una corriente directa (CD) la relación voltaje(V) - corriente (I) - resistencia (R) está dada por la ley de ohm:

$$R = V/I \quad (6.1)$$

Mientras que en una corriente alterna (CA), es decir, una que oscila en el tiempo, esta relación se representa como un número complejo debido a dicha oscilación:

$$Z(\omega) = V/I = Z_0 \exp(j\phi) = Z_0(\cos\phi + j\sin\phi) \quad (6.2)$$

donde  $\omega$  es la frecuencia angular, en Hertz (ciclos/ s).

El uso de esta técnica se reporta por primera vez en 1975 [7] y actualmente su uso es extensivo.

Para medir con esta técnica se aplica un potencial y se hace un barrido de frecuencias para obtener valores de corriente. Lo que nos da la relación impedancia-frecuencia, el llamado espectro de impedancias. Así, cuando se aplica una señal de corriente alterna (CA) a un electrodo, la impedancia en función de la frecuencia nos dice qué tanta resistencia se opone al flujo de corriente de manera dinámica.

Para la detección electroquímica, las técnicas de impedancia son útiles para monitorear los cambios en las propiedades eléctricas que surgen de eventos de bioreconocimiento en las superficies de los electrodos modificados [6, 7].

## Parte II

# Metodología y resultados

# Capítulo 7

## Proceso de fabricación de microelectrodos para medir glucosa

En este capítulo se describe y detalla cada proceso empleado en la fabricación de microelectrodos que miden glucosa, lo que involucra la selección de materiales, diseño, técnicas de microfabricación, la preparación de los mismos, y pruebas funcionales que garanticen que los electrodos elaborados funcionan para los objetivos descritos.

El proceso de fabricación de electrodos, que consiste en elaborar un molde sobre el sustrato de trabajo y rellenarlo con material conductor, permitió seleccionar los materiales y técnicas de fabricación disponibles en el laboratorio de Óptica Láser, y realizar pruebas funcionales.

Es importante mencionar que la etapa de selección de materiales, selección de técnicas de microfabricación y elaboración de diseños se trabaja de forma paralela, ya que cada una depende de las otras.

### 7.1. Muestras y materiales

La lista de muestras y materiales incluye:

- a) Sustratos, en los que se fabrican los electrodos.
- b) Material conductor, que es el material del electrodo.
- c) Muestras de glucosa, que sirven de referencia para considerar correctas las mediciones y compararlas con glucómetro comercial.

### 7.1.1. Preparación de muestras de glucosa

En este proceso como puntos importantes se mencionan el considerar que el pH biológico es de 7.35-7.45 [25], el que un ácido baja el pH y una base sube el pH, además de consultar la hoja de seguridad del ácido clorhídrico.

Las muestras de glucosa se prepararon como disoluciones de PBS (10:1), agua desionizada y dextrosa, en distintas concentraciones.

Para ello, con soluciones buffer de pH's de 4, 7 y 10 se calibró el medidor de pH que se usó para medir el pH de la disolución. Enseguida se colocó un vaso de precipitados sobre una parrilla y se agregó 1 litro de agua desionizada más 100 mililitros de PBS, que se mezclaron con agitador magnético a 1000 rpm durante tres minutos. Usando el medidor de pH, se agregaron gotas de ácido clorhídrico (HCl) a la disolución (agua desionizada más PBS) para lograr un pH biológico de 7.4 a 22°C.

Por otro lado, en una balanza analítica se midió la dextrosa: 2.5, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300 [mg].

Luego, se tomó 1dL de la disolución para agregarle cada peso de glucosa. Esto se colocó sobre la parrilla y agitó hasta obtener una solución homogénea, en aproximadamente 5 minutos. Finalmente quedaron preparadas las muestras de glucosa con las concentraciones antes dichas, en [mg/dL], y se procedió a enfrascar y etiquetar debidamente.

### 7.1.2. Sustratos

Los materiales elegidos para preparar los electrodos son baratos y ampliamente usados en fabricación de microestructuras.

El PMMA (Plastiglas de México S.A. de C.V.) que usualmente se ordena como acrílico es útil porque en este se pueden elaborar micromoldes de diferentes geometrías y dimensiones, en un tiempo corto. Aunque no es el material ideal para medir glucosa, sí permite realizar pruebas rápidas. Y es compatible con las técnicas maquinado CNC y grabado láser.

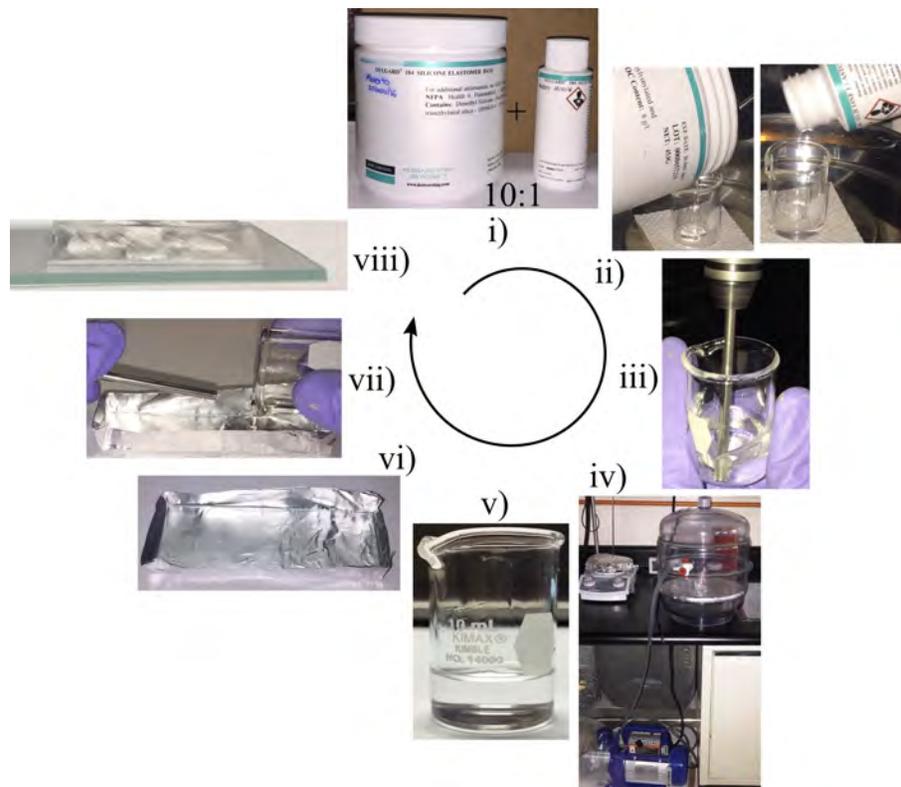
El PDMS (Sylgard 184: base y agente curante) se ordena como kit y es necesario prepararlo. Es útil porque es moldeable y permite crear réplicas rápidas, su principal inconveniente es su hidrofobicidad, propiedad que se puede modificar según lo visto en el Capítulo 4.

Este material es compatible con la técnica molde-réplica (para crear réplicas), sin embargo y por ejemplo su hidrofobicidad hace que sea difícil colocar plata o pasta conductora sobre su superficie, porque se desprende, se ensucia y los moldes para replicarlo deben ser perfectos.

### 7.1.2.1. Preparación de PDMS

El PDMS se puede preparar variando la proporción base-agente curante, según el objetivo. Aunque usualmente se prepara en una proporción 10:1.

Tras no necesitar especificaciones en el PDMS, su preparación consiste en mezclar perfectamente el prepolímero con el agente curante en una proporción 10:1 con ayuda del Dremel durante aproximadamente 5 minutos. Enseguida, usar bomba de vacío y desecador para eliminar las burbujas de aire formadas en el prepolímero durante la mezcla. E inmediatamente vaciar el PDMS sobre el molde a replicar. Curar a 60°C durante 48 horas. Desprender el PDMS del molde y, etiquetar y guardar debidamente.



**Figura 7.1:** Preparación de PDMS: i) kit de PDMS (Sylgard 184), ii) vertir prepolímero y agente curante en una proporción 10:1, iii) mezclar perfectamente, iv) eliminar las burbujas de aire , v) burbujas eliminadas, vi) preparación de un molde para depositar PDMS, vii) vaciar PDMS sobre molde, viii) curado y 48 horas después membrana de PDMS lista .

Consultar preparación detallada en anexo y ver Figura 7.1.

### 7.1.3. Materiales conductores para electrodos

A lo largo del presente trabajo se probaron distintos materiales conductores para rellenar los moldes de PMMA y PDMS, y así crear los electrodos. El objetivo fue encontrar el óptimo y que mejor se adaptara a las necesidades y posibilidades, por lo que a continuación se describe la elaboración de dos pastas conductoras sensibilizadas con la enzima glucosa oxidasa. La primera pasta se seleccionó por sus propiedades, y por el sencillo y funcional método de inmovilización de la enzima GOx en esta. Más aún, porque su preparación ha sido exitosamente reportada en una publicación; y la segunda pasta se usó para superar las desventajas de la primera pasta, como se explica enseguida.

#### 7.1.3.1. Pasta de rodio en carbón sensibilizada con glucosa oxidasa

Para preparar esta pasta se usó rodio en carbón, glucosa oxidasa y aceite mineral, (de Sigma Aldrich).

Siguiendo [31], en un vaso de precipitados se mezcló manualmente la pasta de rodio en carbón (siendo el 40 % rodio en carbón y el 60 % aceite mineral, w/w) con la glucosa oxidasa, en una proporción 10:1, como lo indica la referencia. Sin embargo, la pasta preparada bajo estas condiciones no presentó la consistencia deseada porque permanecía como polvo de carbón y así dificultaba su adherencia en los moldes de acrílico, por tal razón, fue necesario agregar más aceite mineral para formar la pasta deseada, que se obtuvo usando pasta de rodio en carbón (siendo 30 % rodio en carbón y 70 % aceite mineral) con glucosa oxidasa, proporción 10:1.

Usualmente se preparó 100 mg de pasta de rodio en carbón con 10 mg de glucosa oxidasa. Consultar preparación detallada en anexo y ver Figura 7.2.



**Figura 7.2:** Preparación de pasta conductora sensibilizada con GOx.

### 7.1.3.2. Pasta LaserCon sensibilizada con glucosa oxidasa

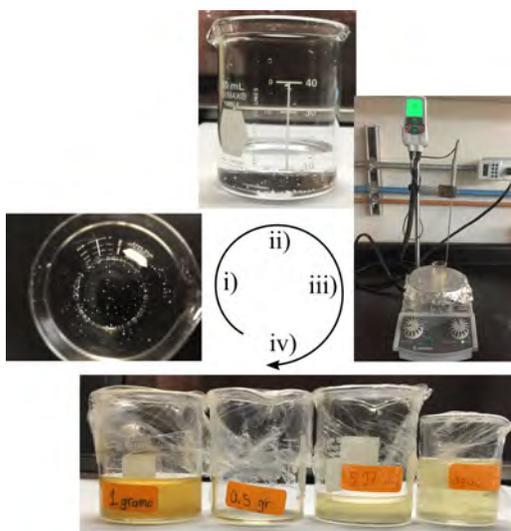
Para preparar esta pasta se usó pasta LaserCon y glucosa oxidasa.

En un vaso de precipitados se mezcló manualmente pasta LaserCon y glucosa oxidasa, en una proporción 10:1. Usualmente, 100 mg y 10 mg, respectivamente.

Consultar preparación detallada en anexo.

### 7.1.4. Inmovilización de la enzima glucosa oxidasa mediante un atrapamiento en grenetina

Más adelante se describe la preparación de electrodos de plata sensibilizados con glucosa oxidasa mediante un atrapamiento en gel. Los materiales necesarios para prepararlo son grenetina, glucosa oxidasa y agua destilada.



**Figura 7.3:** Preparación de gel sensibilizado con GOx: i) agregar grenetina, ii) agregar agua destilada, iii) calentar hasta obtener mezcla homogénea y dejar enfriar, iv) agregar GOx.

Su elaboración está inspirada en [29], sin embargo en esta reportan una gelatina, que para el presente trabajo no funciona. Así, tras realizar varias pruebas a fin de preparar un gel muy diluido, a continuación se mencionan las cantidades exactas empleadas.

Se mezcló 12 ml de agua destilada, 5.27 miligramos de grenetina y 10.41 mg de glucosa oxidasa, con ayuda de un agitador magnético a 700 rpm y calentando sobre una parrilla a 35°C, durante 40 minutos.

Consultar preparación detallada en anexo y ver Figura 7.3.

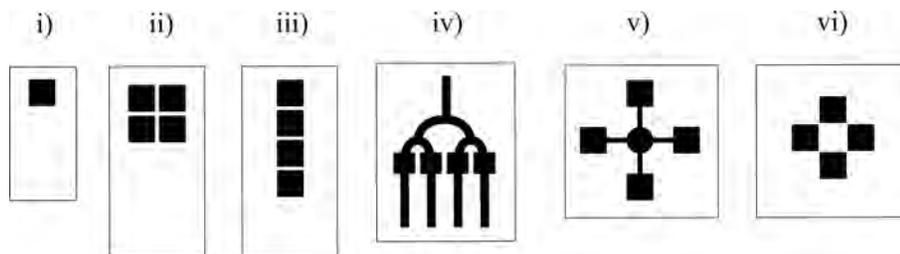
## 7.2. Diseño

Tras seleccionar materiales y técnicas de fabricación disponibles y útiles, la etapa de diseño es el primer paso hacia la confiabilidad del proceso de elaboración de electrodos que midan glucosa, porque es en esta donde se definen las reglas de diseño a seguir según cada técnica de fabricación, como líneas y espacios mínimos (resolución), lo que permitió seleccionar la óptima geometría de los electrodos.

En el presente trabajo se usaron:

- Dos electrodos: ambos de geometría cuadrada y con la misma área.
- Dos tipos de arreglos: electrodos empalmados cara-cara y electrodos sobre el mismo sustrato.
- Una y cuatro mediciones: con dos y ocho electrodos, respectivamente.

Definido lo anterior, los diseños que se muestran a continuación, se hicieron con el editor gráfico Inkscape, y para estos se consideró el número de electrodos; el arreglo de los mismos, que define la forma de medir glucosa; y el número de mediciones. Ver Figura 7.4.



**Figura 7.4:** i) electrodo para una medición, ii)-vi) electrodos para cuatro mediciones, en orden ascendente de acuerdo a su realización y pruebas.

Además, a cada molde obtenido por alguna de las tres técnicas de fabricación, se le hizo un estudio de perfilometría para conocer sus dimensiones, resolución, y posibles defectos como la rugosidad.

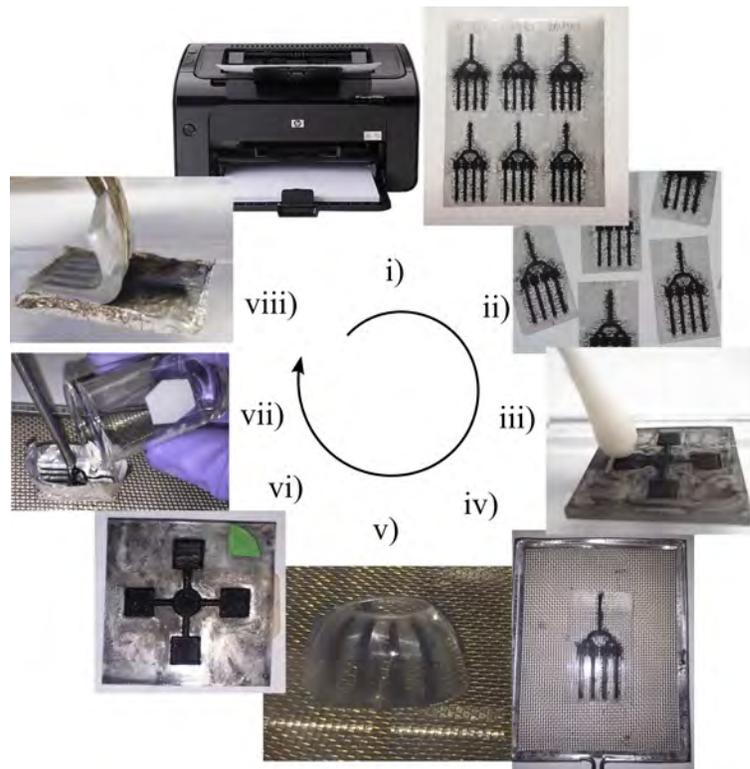
## 7.3. Fabricación de micromoldes

El método que aquí se reporta para elaborar electrodos consiste en crear un molde sobre el sustrato de trabajo para rellenarlo con material conductor y crear el electrodo. Con esto y la previa selección de materiales se consideraron las técnicas de fabricación disponibles para el Laboratorio de Óptica Láser que son, maquinado CNC, shrinky dinks y grabado láser.

Según lo ya mencionado, uno de los objetivos fue elaborar electrodos y miniaturizar lo más posible para tener microelectrodos, empleando las tres técnicas de fabricación antes mencionadas, pero considerando sus limitaciones.

### 7.3.1. Shrinky Dinks

Como se vió en la Capítulo 4, el Shrinky dink es un termoplástico que se encoge con el calor un 60 % su tamaño original, lo que permite trabajar con un diseño grande y complejo 2D para después obtener uno igual pero miniaturizado y 3D. Para esta técnica se usaron los diseños b) y e). Al ser de bajo costo y de fácil elaboración, fue empleado para crear moldes y hacer su réplica con PDMS que es un polímero moldeable.

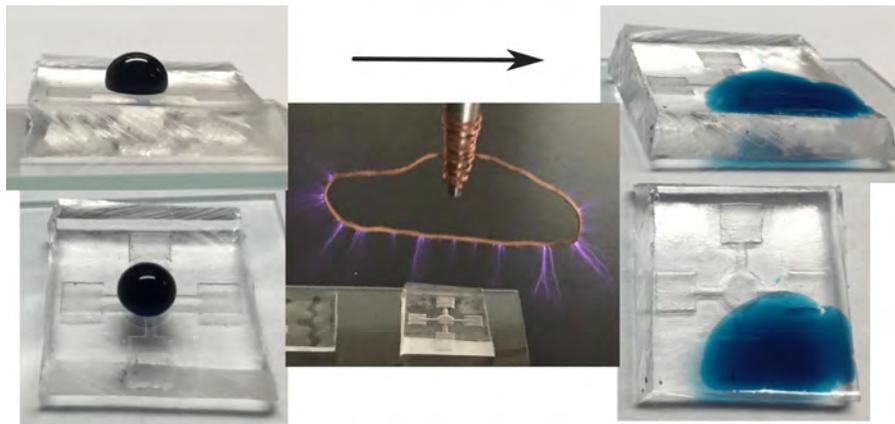


**Figura 7.5:** Preparación de un molde de PDMS usando Shrinky Dinks.

Su proceso consistió en (i) imprimir ocho veces los diseños con canales b y e sobre la hoja de shrinky dink usando una impresora HP modelo LaserJetCP1025nw, limpiando la hoja con alcohol isopropílico entre cada impresión para una mejor limpieza del plástico. (ii) Enseguida se recortó el área del diseño para evitar que durante el calentado el plástico se pegara con el mismo. (iii) Se procedió a limpiar los diseños con hisopo y alcohol isopropílico, porque entre mayor sea

el número de impresiones, mayor es la cantidad de tinta depositada en áreas no deseadas. (iv) Luego se colocó el diseño sobre una rejilla de metal y se metió al horno a una temperatura de  $165^{\circ}\text{C}$  durante aproximadamente 5 minutos, hasta observar que no se encogía más. (v) Entonces se retiró del horno, se dejó enfriar y se limpió con hisopo y alcohol isopropílico. (vi) Por otro lado, se preparó PDMS (ver anexo). (vii) Continuando, se envolvió el molde de shrinky dink en aluminio, formando una caja donde se depositó el PDMS líquido. (viii) Luego se metió el molde preparado al horno para su curado a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. (ix) Finalmente se retiró del horno y se desmoldó el molde-réplica, es decir, se obtuvo la réplica del molde de shrinky dink en PDMS. Adicionalmente cada muestra se guardó y etiquetó debidamente y se solicitó un estudio de perfilometría. Ver Figura 7.5.

El PDMS se expuso superficialmente con descarga corona durante 70 segundos para volverlo hidrofílico, propiedad que permaneció por aproximadamente media hora. Ver Figura 7.6.



**Figura 7.6:** Descarga corona aplicada al PDMS, antes y después.

### 7.3.2. Micromaquinado CNC

Esta técnica fue usada debido a que está disponible en el Taller de Mecánica de la Facultad de Ciencias, y es útil para crear los moldes sobre el sustrato rígido PMMA. Ver máquina CNC en la Figura 7.7.

Una de sus limitaciones es que la resolución que se puede lograr en una estructura depende de los cortadores rotativos empleados. Así, en el Taller de Mecánica se lograron maquinar moldes de un área de  $1\text{mm}^2$ , una profundidad de 200 micras y 400 micras de separación entre dos de estos. Por lo que esta técnica se usó para elaborar electrodos con todos los diseños.

Su proceso de elaboración consistió en (i) usar el editor gráfico Inkscape para crear el diseño de la estructura deseada y transportarlo al programa Gravograph. Luego se ajustó la posición



**Figura 7.7:** Máquina CNC.

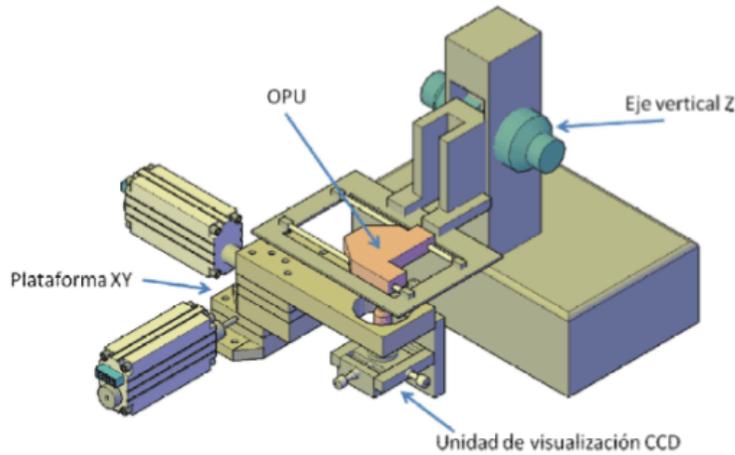
sustrato-cortador usando una hoja de papel, esto para permitir que el cortador removiera el material sin ser forzado y sin desgastar el sustrato. (iii) Enseguida se pulsó el botón de inicio para maquinar el diseño sobre el PMMA. (iv) Finalmente se retiró el molde de la base de la máquina y se limpió con algodón y alcohol isopropílico.

### 7.3.3. Grabado láser

El equipo de microfabricación láser fue desarrollado en el Laboratorio de Óptica Láser [22,30], y este usa el lector láser de un sistema comercial de CD-DVD y cuenta con una plataforma que se desplaza en los ejes X, Y y Z para ajustar el punto focal del láser mediante CNC [30], lo que permite al igual que con las otras técnicas de microfabricación transferir diseños 2D a 3D.

Para elaborar los micromoldes con esta unidad se usó el láser infrarrojo (IR) de  $780 \text{ nm}$  a modo continuo con una potencia de  $0.82 \text{ W}$ , una corriente máxima de  $150 \mu\text{A}$ , un tiempo de exposición de  $5.8 \text{ ms}$  por pulso, a 10 pulsos por pixel y considerando que se tienen  $4 \mu\text{m}/\text{pixel}$ .

Los sustratos elegidos, PMMA y PDMS son compatibles con esta técnica de fabricación, que crea grabados de dimensiones muy pequeñas, con una resolución de 4 micrómetros, pero cuyo inconveniente está en la profundidad que alcanza, de sólo 15-20 micras en PMMA y 2-5 micras en PDMS, aunque con la posibilidad de aumentar esa profundidad si se incrementa el número de pasadas (recubrir-grabar). Aún así, en el presente trabajo sólo se probó con PMMA.



**Figura 7.8:** Unidad de grabado láser, tomada de [30].

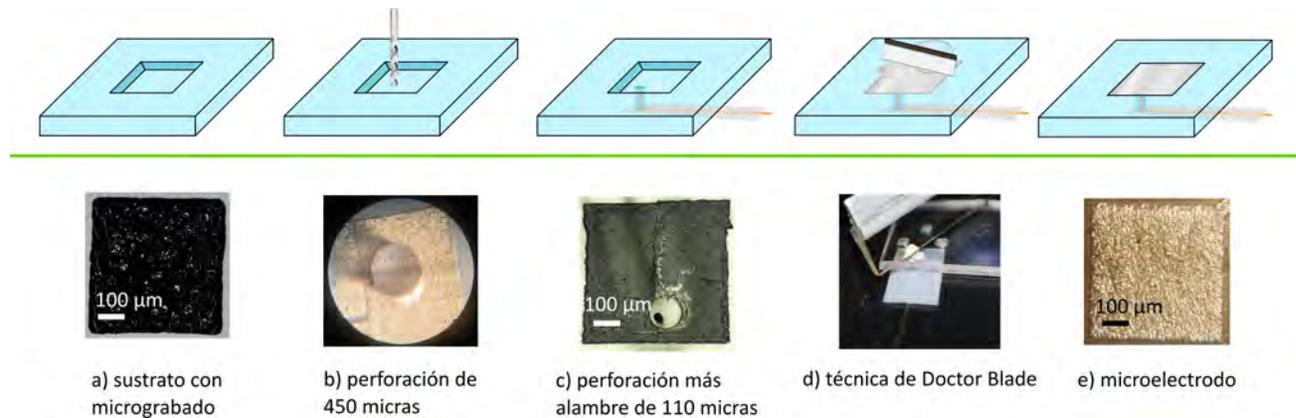
El proceso de elaboración de micromoldes con el grabado láser de CD-DVD consistió en (i) crear un diseño en el editor gráfico Inkscape, considerando que las imágenes debían ser cuadradas de hasta 1024 x 1024 píxeles, y que un pixel vale 4 micrómetros. Luego esa imagen se transformó en formato .bmp monocromático, considerando que el área a grabar está en color negro. Enseguida, (ii) se usó un programa ya elaborado en matlab para convertir la imagen a tablas de 0's y 1's. Así se obtiene un patrón binario que el equipo de grabado láser reconoce para llevar a cabo el proceso de ablación (cero graba). (iii) Por otro lado un portaobjetos de vidrio se cubre con nanopartículas de carbón que actúa como material absorbente, que es ajustado sobre la plataforma y grabado (ablación) vía CNC. Después de la ablación (iv) el grabado se limpia con un hisopo, alcohol isopropílico y agua destilada. Finalmente (v) el micromolde está listo.

## 7.4. Preparación de microelectrodos

Obtenido el micromolde sobre el sustrato de PDMS o PMMA por alguna de las tres técnicas de fabricación antes descritas, se rellenó el molde con el material conductor y se usó la técnica de Doctor Blade para retirar el excedente con una navaja [17], y así formar el microelectrodo.

El proceso para preparar microelectrodos consistió en (a) limpiar perfectamente los micromoldes con hisopo y alcohol isopropílico, (b) se realizó una perforación sobre el micrograbado, que para el caso del PMMA se perforó con una broca de 1/64" usando el DREMEL, y para el PDMS se usó una perforadora y/o una aguja de acero inoxidable. Y se limpió de nuevo los sustratos, esto porque al perforar quedaban algunas partículas de material. Luego (c) un alambre de 110 micrómetros de diámetro se introdujo en la perforación, se enmascaró para evitar que se rompiera y se fijó sobre el sustrato con cinta adhesiva, verificando visualmente

que el alambre y la base del micromolde estuvieran en el mismo plano. Después (d) se depositó el conductor y retiró el excedente aplicando la técnica de Doctor Blade usando una navaja forrada con cinta masking para evitar el desgaste de los sustratos. (e) Se dejó secar y se usó hisopo con alcohol isopropílico para limpiar los bordes del microelectrodo, a fin de evitar residuos de material conductor en áreas no deseadas. Finalmente, se usó un multímetro digital para verificar continuidad entre el alambre y el microelectrodo.



**Figura 7.9:** Preparación de microelectrodos

Con este procedimiento se prepararon electrodos sobre PDMS y PMMA con las dos pastas de carbón (ambas sensibilizadas con glucosa oxidasa) y con plata. Y además con plata sensibilizada con glucosa oxidasa, agregando un paso más para este último, que fue, depositar una gota de 1µL del gel diluido de glucosa oxidasa sobre el electrodo de plata.

Consultar el procedimiento de fabricación de microelectrodos en anexo. Ver Figura 7.9.

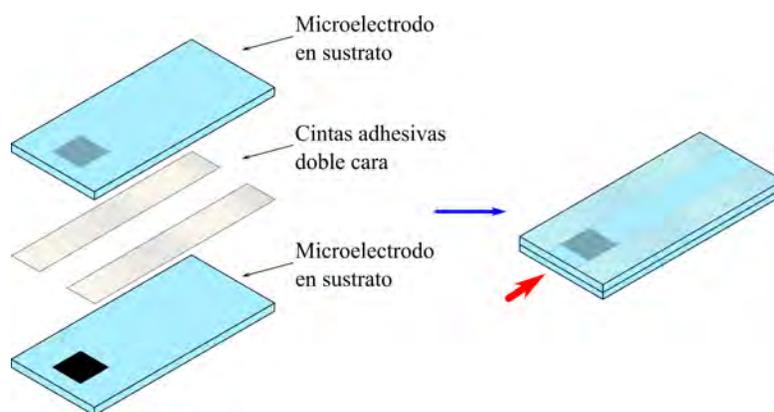
## 7.5. Ensamblaje y microfluídica

Para medir glucosa se consideraron dos electrodos, estableciendo así dos tipos de arreglos de microelectrodos.

### 7.5.1. Arreglo 1

Cada electrodo se preparó en un sustrato, quedando empalmados cara-cara, ver Figura 7.10.

En este arreglo se usaron cintas adhesivas doble cara para formar el canal por el que circula la glucosa hasta los electrodos. Las ventajas de usarlo son que la gota de glucosa llega a ambos electrodos al mismo tiempo y permite medirla correctamente; y que se puede trabajar libremente sobre cada electrodo. Sus desventajas son que impide observar si efectivamente la glucosa llega



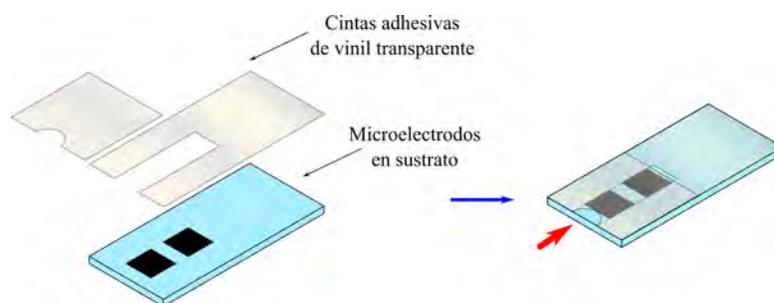
**Figura 7.10:** Electrodos empalmados cara-cara. La dirección de flujo de la muestra de glucosa se indica por la flecha más ancha.

a ambos electrodos al mismo tiempo o si existen problemas de fricción en el sustrato; y si ambos electrodos están bien alineados.

Después de la elaboración de los microelectrodos de pasta conductora y de tinta conductora de plata, se prosigue al ensamblaje de éstos. Por lo que fue necesario medir la impedancia de cada uno de ellos y después pegarlos y medir de nuevo la impedancia para saber si los microelectrodos estaban unidos, es decir, se debe cuidar que no se toquen por lo que fue necesario considerar un espesor mínimo de  $220\mu\text{m}$  que se logró usando doble cinta adhesiva doble cara para formar el canal. Además, en este arreglo es difícil romper la tensión superficial de la gota de glucosa y controlar su volumen.

### 7.5.2. Arreglo 2

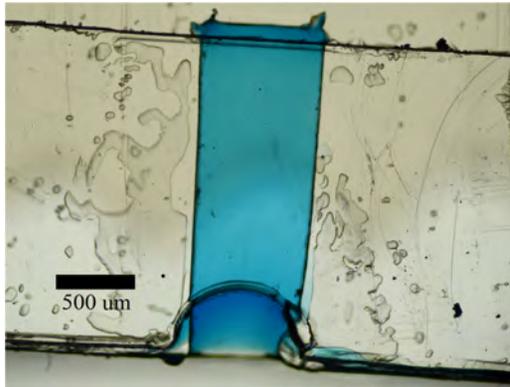
Los dos electrodos se prepararon sobre el mismo sustrato, ver Figura 7.11.



**Figura 7.11:** Arreglo 2, de electrodos sobre el mismo sustrato. La dirección de flujo de la muestra de glucosa se indica por la flecha más ancha.

En este arreglo se usaron cintas adhesivas de vinil transparente para formar el canal por el que circula la glucosa hasta los electrodos. Las ventajas de usarlo son que permite observar que

la glucosa llega correctamente hasta ambos electrodos, por lo que se usó la capilaridad donde el fluido aumenta su velocidad con el descenso del diámetro del canal. El diseño permite romper la tensión superficial de la gota de glucosa y controlar su volumen sin necesidad de dosificar la gota. Sus desventajas son que el vinil adhesivo impone resistencia al flujo de la gota de glucosa; y que como los electrodos no deben tocarse, la mínima separación que se logró entre estos fue de  $60\mu\text{m}$  con la técnica de microfabricación de grabado láser.



**Figura 7.12:** Control de volumen usando el arreglo 2.

Hasta aquí se ha descrito el procedimiento estandarizado para fabricar microelectrodos, con la preparación de materiales, el uso de las técnicas de microfabricación y el control de la microfluídica. Este proceso se ilustra en la siguiente figura a modo de resumen.

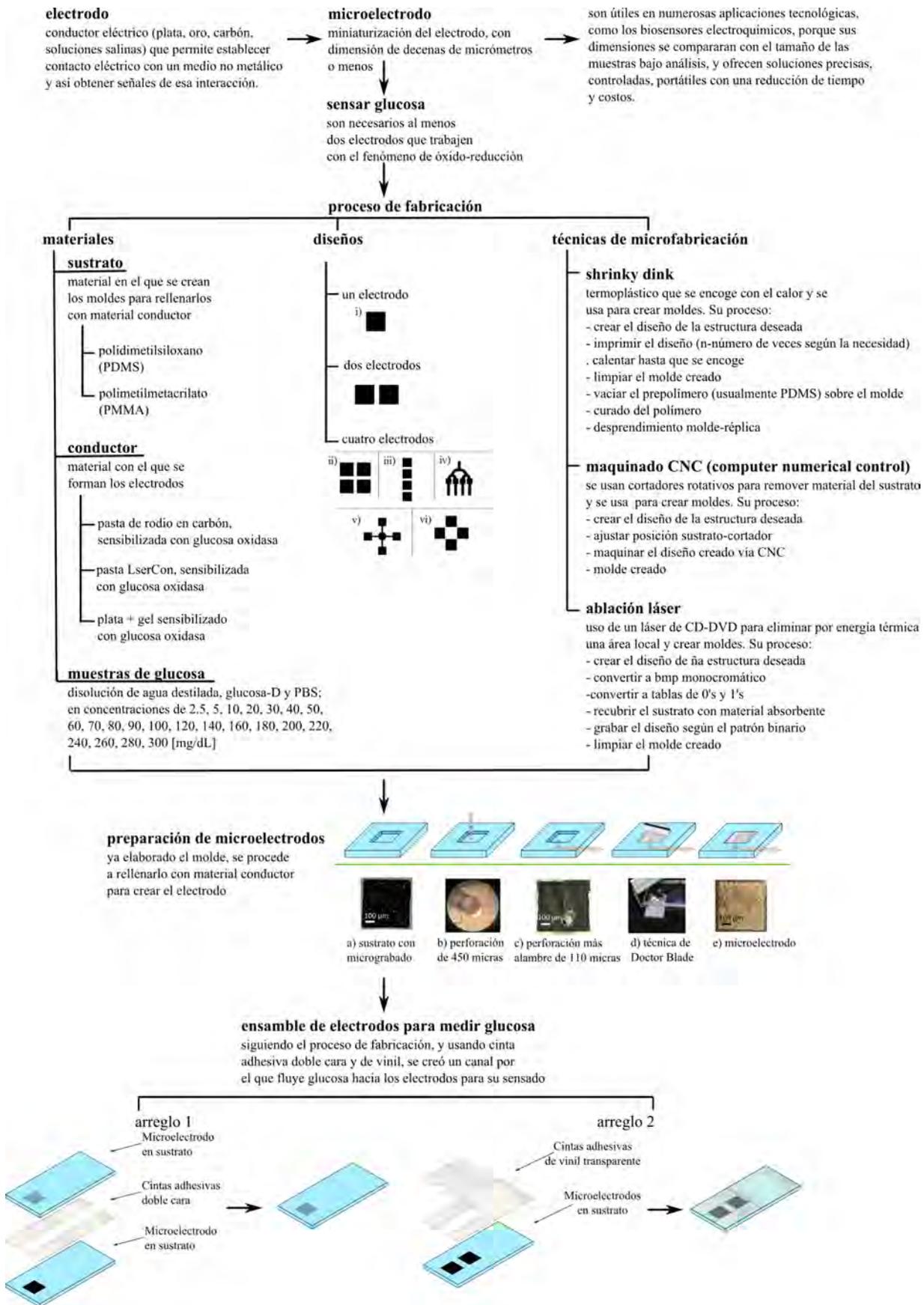


Figura 7.13: Proceso de fabricación de microelectrodos y ensamblaje.

# Capítulo 8

## Pruebas funcionales y caracterización

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos en las mediciones de glucosa realizadas con los microelectrodos elaborados usando las tres técnicas de microfabricación disponibles (grabado láser, maquinado CNC y molde-réplica), para una medición, para cuatro mediciones, con la enzima GOx y sin esta.

Inicialmente se menciona la parte electrónica implementada. Enseguida se muestran los resultados obtenidos en la elaboración de micromoldes con las tres técnicas de microfabricación. Para continuar en cada una de ellas, detallando los distintos microelectrodos y sus resultados obtenidos en la medición de glucosa.

En todas las mediciones se usaron dos electrodos, uno de trabajo cuya preparación cambió a lo largo de la investigación, y uno de referencia que en todos los casos fue de plata.

Considerando que los electrodos sirven para medir la corriente que se produce en la reacción redox, y que es proporcional a la concentración de glucosa.

### 8.1. Características electrónicas

En esta sección se mencionan las características electrónicas empleadas para una y cuatro mediciones, mismas que se asumirán de esta forma si en el resto de la tesis se hace referencia a alguna de ellas.

#### 8.1.1. Una medición

Para una medición se usó el método amperométrico, aplicando un voltaje de 0.7V entre dos electrodos (uno llamado de trabajo y otro llamado de referencia, que durante toda la investigación fue de plata), ya que a este voltaje se oxida el peróxido de hidrógeno [10].

Para ello se usó el circuito de transimpedancia que se muestra en la Figura 8.1, en el que se empleó un amplificador AD8605 para aplicar un voltaje de polarización de 0.7V entre los electrodos de referencia y de trabajo.

También se usó el equipo comercial Source Meter Unit (SMU) modelo 2450 que permite medir corriente, resistencia y voltaje de dispositivos y materiales de nanoescala, semiconductores orgánicos, electrónica impresa y otros dispositivos de pequeña geometría. Éste tiene un rango de voltaje, corriente y resistencia de 20mV a 200V, 10nA a 1A, 2Ω a 200MΩ, respectivamente. Lo que permite aplicar un voltaje de 0.7V entre los electrodos mientras que registra la corriente eléctrica producida en la reacción, y que sirvió para ofrecer validez y confiabilidad de las mediciones.

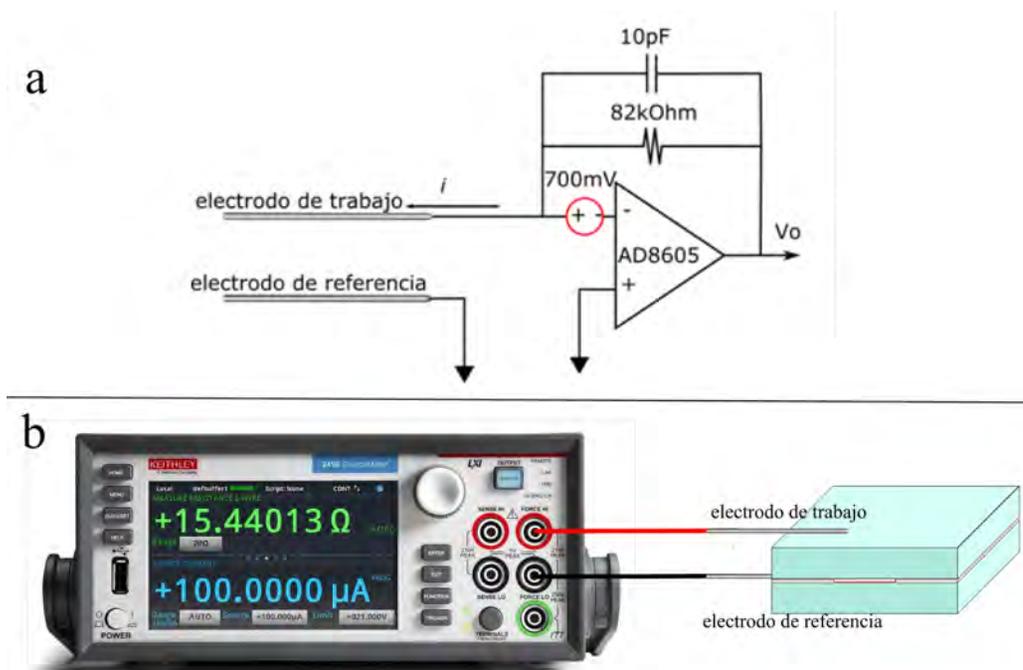
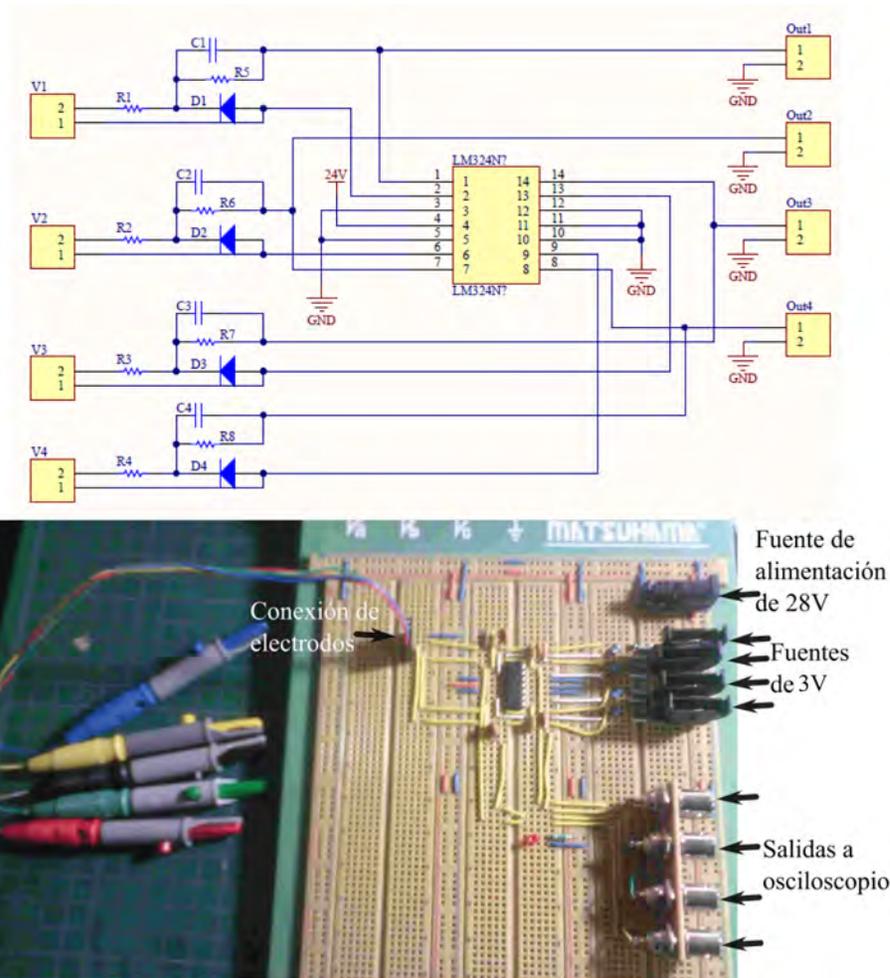


Figura 8.1: a- Circuito transimpedancia, b- Equipo Source Meter Unit 2450.

### 8.1.2. Medición múltiple: cuatro mediciones

La medición múltiple, con cuatro mediciones, se pensó como una forma de reducir el error en la medición de glucosa. Para tal fin se usó el circuito que se muestra en la Figura 8.2, en el que se empleó un amplificador operacional LM324N para realizar cuatro mediciones simultáneas de glucosa. Cada resistencia de  $R = 82\Omega$ , cada capacitor de  $C = 10\text{pF}$  y diodos zener 1N4728A.



**Figura 8.2:** Circuito para cuatro mediciones simultáneas, usando un amplificador operacional LM324N. En el circuito se identifica un arreglo de cuatro circuitos destinados para cada medición, aplicando (como antes para una medición) un voltaje de polarización de 0.7V entre el electrodo de referencia y cada uno de los cuatro electrodos de trabajo.

## 8.2. Micromoldes y microelectrodos

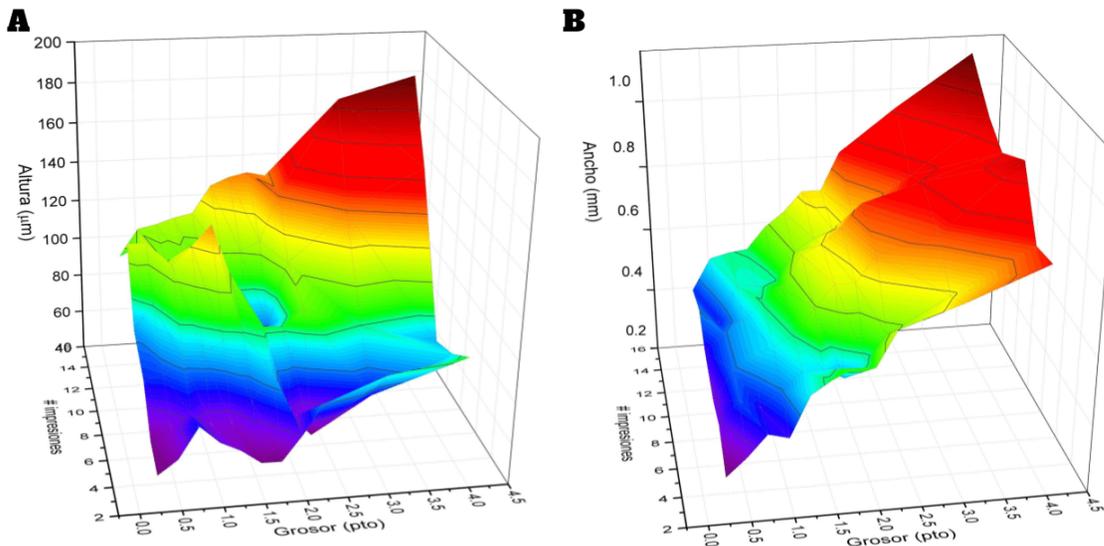
Esta sección hace referencia al análisis de arreglos y técnicas de microfabricación empleadas para crear los micromoldes que se usaron para posteriormente preparar los microelectrodos.

### 8.2.1. Micromoldes fabricados con molde-réplica (PDMS y Shrinky Dinks)

Siguiendo la metodología descrita en 7.3.1 para la fabricación de micromoldes usando Shrinky Dinks, se obtuvo el siguiente análisis.

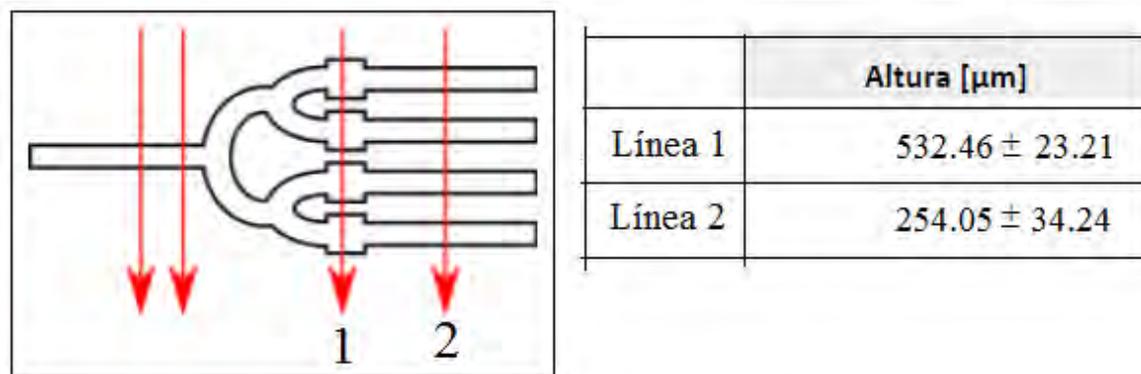
Para fabricar micromoldes usando esta técnica se consideró la reducción del diseño en un

60% después del horneado, además de que el aumento en el número de impresiones aumenta la profundidad del molde, como se puede observar en la Figura 8.3.



**Figura 8.3:** Perfil de altura (A) y ancho (B) de canales hechos en Shrinky en funcion del número de impresiones. Tomado de [32]

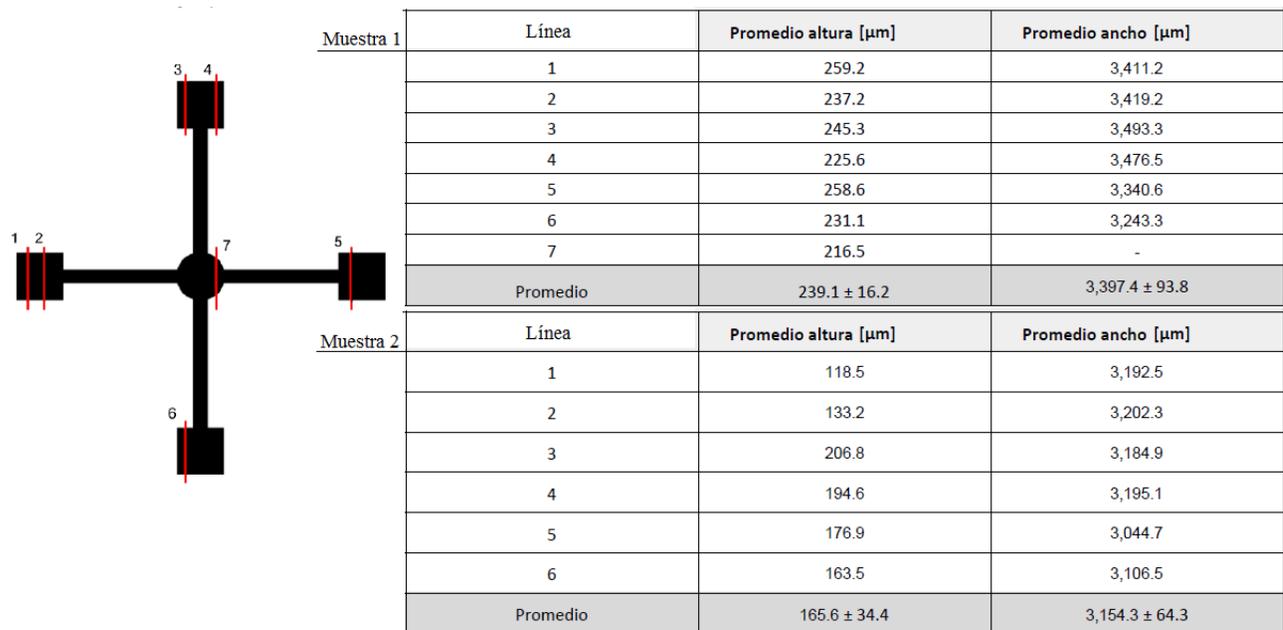
Después de obtener el molde de Shrinky Dink se solicitó un análisis de perfil realizado con el perfilómetro KLA Tencor D-600. En el que se muestra que además del número de impresiones, el tipo de impresora encargada de depositar la tinta en el termoplástico y el diseño influyen considerablemente en el resultado final. Como se muestra en la Figura 8.4.



**Figura 8.4:** En esta figura se muestra el análisis de perfil realizado a un micromolde de Shrinky Dink con el diseño iv), en cuyo diseño se hicieron once impresiones en la línea 1 (área de los cuadrados) y sólo ocho impresiones en la línea 2 (área de los canales). Lo que muestra que la altura del molde (profundidad de la réplica en PDMS) logró duplicar la de los canales, sin duplicar el número de impresiones.

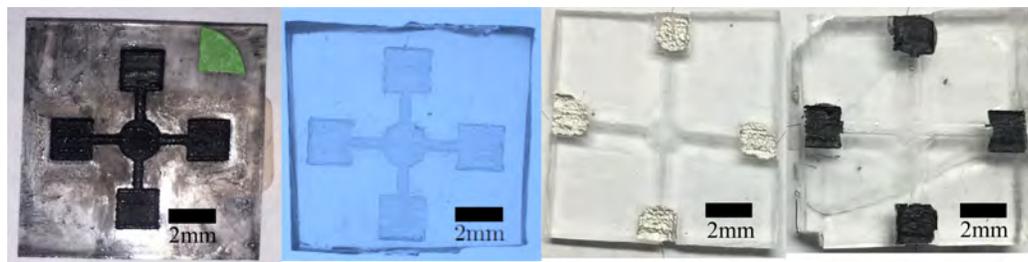
También, en otro análisis, a dos moldes de Shrinky Dink se les solicitó un estudio de

perfilometría, ver Figura 8.5. Los resultados muestran que aunque los moldes obtenidos con esta técnica de molde-réplica sí funcionan en sistemas microfluídicos, no son tan precisos y reproducibles como para hacer la caracterización de electrodos que midan glucosa.



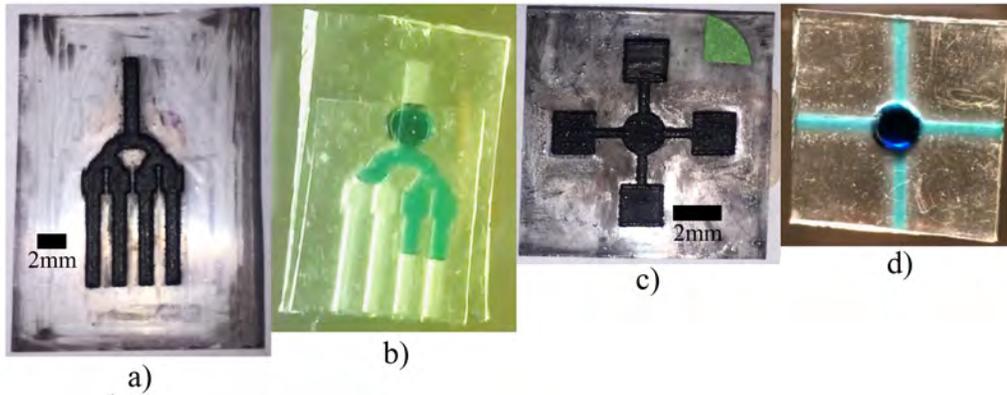
**Figura 8.5:** La figura el análisis de perfil de dos distintos micromoldes de Shrinky Dink con el diseño v), con ocho impresiones en el área de los canales y once impresiones en el área de los cuadros.

Sin embargo, la metodología de preparación de microelectrodos se usó con esta técnica en la medición múltiple, cuyo propósito fue usar los diseños iv) y v) para lograr simultaneidad en las mediciones y reducir el error. Los electrodos se elaboraron de dimensiones de  $(2 \times 2 \text{ mm} \pm 700 \mu\text{m}) \times (250 \mu\text{m} \pm 150 \mu\text{m})$ , con pasta LaserCon sensibilizada con GOx y plata.



**Figura 8.6:** Proceso de fabricación de electrodos usando el termoplástico Shrinky Dink y PDMS con la técnica molde-réplica, en electrodos de dimensiones de  $(2 \times 2 \text{ mm} \pm 700 \mu\text{m}) \times (250 \mu\text{m} \pm 150 \mu\text{m})$ , para el diseño múltiple v). Este proceso se detalla en el anexo "Procedimiento de fabricación de microelectrodos"

El proceso de elaboración de microelectrodos con esta técnica es muy complicado porque el PDMS es de naturaleza hidrofóbica, por lo que inicialmente fue necesario poner descarga corona



**Figura 8.7:** Moldes de Shrinky Dink iv y v (a y c, respectivamente) con sus respectivas réplicas de PDMS (b y d). La figura muestra las pruebas de sellado con descarga corona en réplicas de PDMS. Por acción de capilaridad la gota con colorante fluyó y se distribuyó en los cuatro canales de manera no uniforme en iv) y uniforme en v). Esto debido a las no exactas réplicas obtenidas del Shrinky Dink.

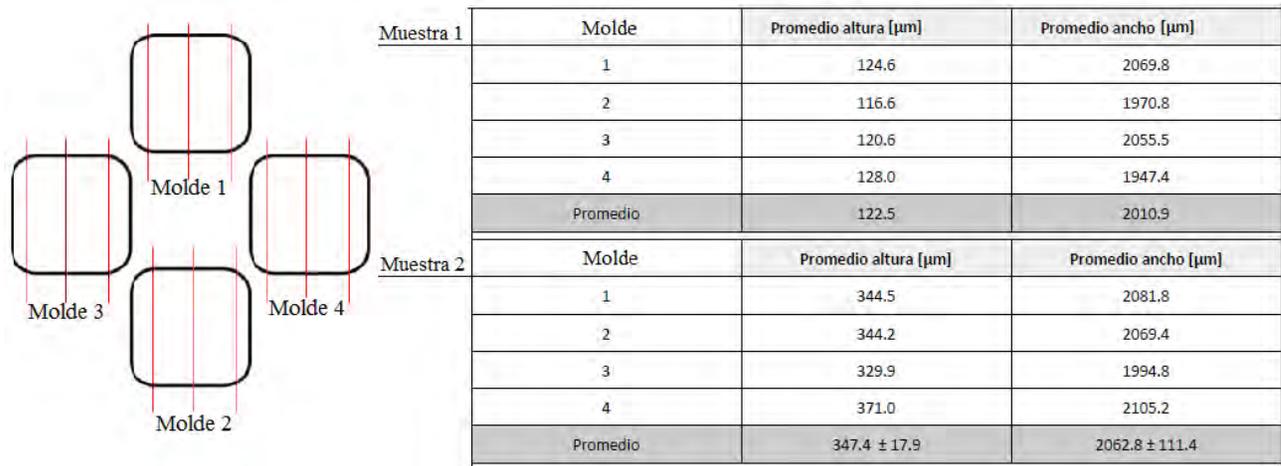
al molde de PDMS e inmediatamente iniciar con el proceso de preparación de microelectrodos (Capítulo 7), que debido a las dimensiones y al material llevó demasiado tiempo y una vez terminados se procedió a sellar con descarga corona que se dirigía hacia los alambres provocando el no sellado del PDMS. Entonces se intentó usar adhesivos UV (que endurecen con la exposición a la radiación UV) para sellarlos, causando obstrucción de canales, por lo que se usaron capas sacrificiales de agua congelada que no funcionaron, debido a las dimensiones e irregularidades superficiales del PDMS.

Debido a las razones antes mencionadas, se suspendió la fabricación de microelectrodos en PDMS con esta técnica de microfabricación.

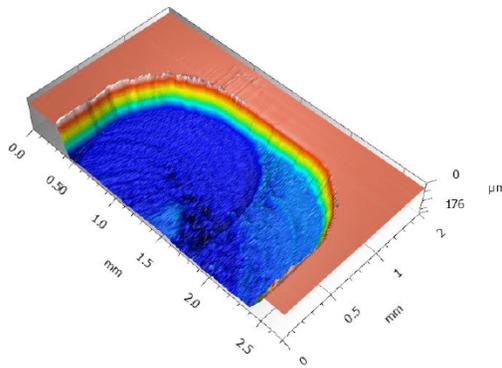
### 8.2.2. Micromoldes fabricados con maquinado CNC

El maquinado CNC fue otra de las técnicas de fabricación de micromoldes disponibles, y se consideró porque permite crear muestras prototipo rápidas, además de ofrecer un mejor control en el proceso de fabricación, éste comparado con los moldes obtenidos de los Shrinky Dinks. Como se verá más adelante esta técnica fue la más usada para crear electrodos de distintos materiales conductores y diseños por su sencillez para crear rápidas muestras prototipo.

Al igual que con la técnica anterior, después de obtener el molde con maquinado CNC se solicitó un estudio de perfilometría realizado con el perfilómetro KLA Tencor D-600 para dos muestras distintas. Esto porque para hacer la caracterización de microelectrodos que midan glucosa es necesario tener reproducibilidad en las mediciones, que se logra con la reproducibilidad de todos los procesos, incluidos los micromoldes.



**Figura 8.8:** En esta figura se muestra el análisis de perfil realizado a dos distintos micromoldes obtenidos con maquinado CNC, y el diseño vi).



**Figura 8.9:** En esta figura se muestra un escaneo 3D, vista a 45°, de una de las muestras de micromoldes obtenidos por maquinado CNC usando el diseño vi).

Los análisis indican que la rugosidad de los moldes obtenidos con maquinado CNC mejora considerablemente, si se compara con los obtenidos con Shrinky Dinks. Sin embargo, tampoco se observa reproducibilidad en las dimensiones de dos muestras distintas, ver Figura 8.8. Esto puede ser atribuido a que durante el proceso de fabricación, una de las etapas que es alineación cortador-sustrato, se realiza a través de la colocación visual de una hoja de papel que ayuda a definir si el cortador se puede mover libremente sin desgastar el sustrato, es decir, existe error en el desplazamiento sobre el eje Z y por tanto en la profundidad del molde. Además el sustrato se coloca sobre una plataforma que lo presiona y fija, lo que puede provocar que el sustrato no permanezca sobre un mismo plano e introduzca error en la fabricación.

### 8.2.2.1. Electrodo de trabajo de pasta de rodio en carbón sensibilizada con GOx

Inicialmente se trabajó con el arreglo 1, que consiste en colocar a cada electrodo sobre un sustrato de acrílico y empalmarlos, sellando con cinta adhesiva doble cara para formar un canal con el mismo ancho de los electrodos y una altura de  $200\ \mu\text{m} \pm 50\ \mu\text{m}$  por el cual avanzó por capilaridad cada muestra de dextrosa en forma de gota de un volumen de  $2\ \mu\text{L}$ .



**Figura 8.10:** Diseño i). Electrodos de  $(2.0 \times 2.0\ \text{mm} \pm 500\ \mu\text{m})$  de área  $\times$   $(700\ \mu\text{m} \pm 200\ \mu\text{m})$  de profundidad, elaborados en PMMA con maquinado CNC para una medición. Se muestra diseño, molde en acrílico y electrodos, de trabajo (pasta de rodio en carbón) y de referencia (plata).

Estos electrodos son de fácil preparación y la pasta de rodio en carbón se adhiere bien al molde de PMMA, ver Figura 8.10. Pero la pasta es base aceite y al ser hidrofóbica no permitió que la gota de glucosa llegara por capilaridad hasta los electrodos.

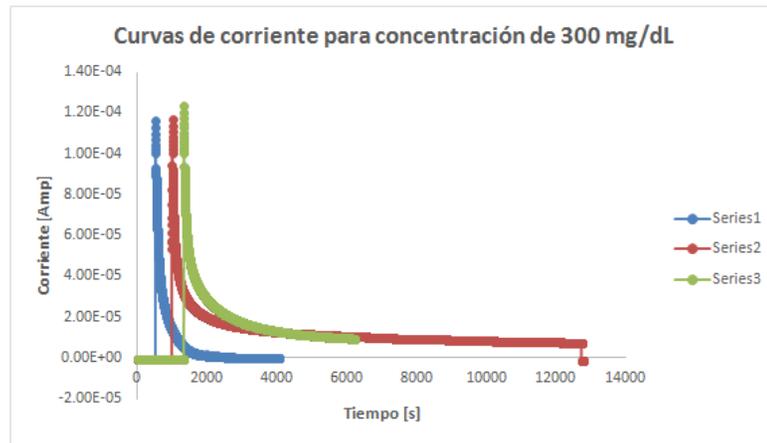
Como la gota de glucosa no entró por capilaridad se usó una micropipeta para depositar la gota de volumen de  $2\ \mu\text{L}$  en los electrodos. Para la mayoría de las concentraciones se obtuvo una curva de corriente bastante irregular porque se presentaba un máximo de corriente que decrecía y aumentaba con el tiempo, generando mediciones no repetibles y con bastante ruido. Esto es atribuido a que cuando la gota llegaba a los electrodos (pasta y plata) empezaba a permear la pasta de rodio, que al ser hidrofóbica retrasaba el flujo de la gota, generando aumentos de corriente conforme avanzaba a través de los electrodos.

Por lo que la solución fue cambiarla por una pasta que no fuera base aceite y permitiera el flujo de la gota por capilaridad y su adherencia al sustrato.

### 8.2.2.2. Electrodo de trabajo de Pasta LaserCon sensibilizada con GOx

La pasta LaserCon surgió como solución a las desventajas presentadas por la pasta de rodio en carbón, porque presentó una considerable mejor adherencia al sustrato de PMMA, se depositó más fácil; y la gota de glucosa entró por capilaridad a través del canal hasta los electrodos. Lo cual simplificó considerablemente las mediciones de glucosa con las distintas concentraciones de dextrosa. Además en algunas mediciones se observó repetibilidad, ver Figura 8.11.

Estos electrodos de dimensiones de  $(2.0 \times 2.0\ \text{mm} \pm 500\ \mu\text{m})$  de área  $\times$   $(200\ \mu\text{m} \pm 50\ \mu\text{m})$  de profundidad, también se probaron con el arreglo 1, diseño ii, ver Figura 8.12. Sin embargo, debido al diseño no presentaron respuestas simultáneas, ya que la gota de glucosa que se deslizó por el canal tocó primero al par de electrodos más próximos y avanzó hacia los siguientes dos,

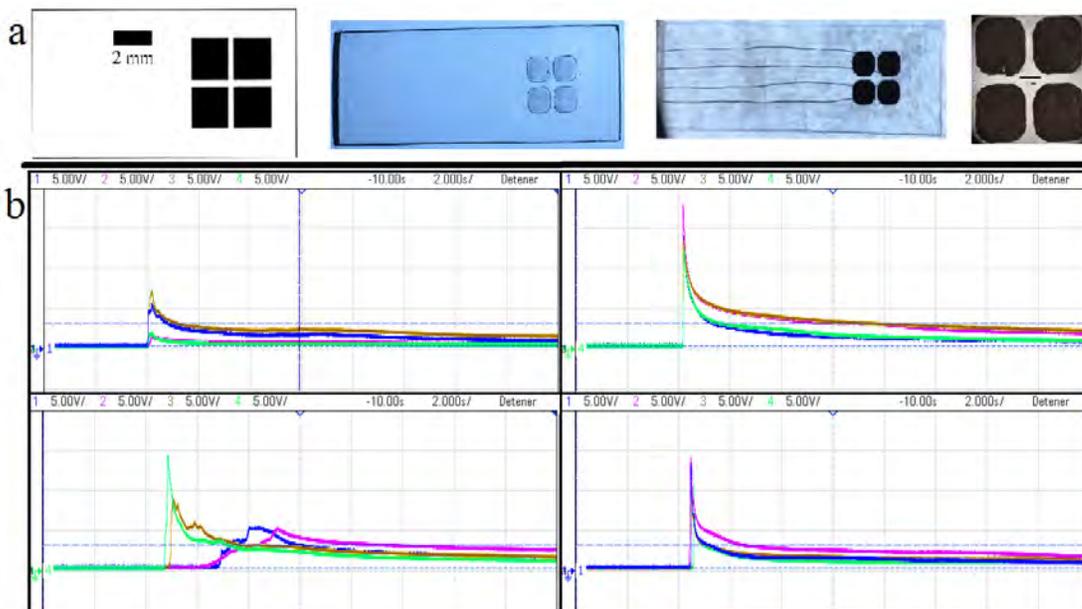


**Figura 8.11:** Ejemplo de curvas de corriente para una concentración de dextrosa de 300 mg/dL, en las que se observa repetibilidad. Usando el arreglo 1, diseño 1, con un electrodo de trabajo de Pasta LaserCon sensibilizada con GOx y un electrodo de referencia de plata; de dimensiones de (2.0 mm x 2.0 mm  $\pm$  500  $\mu$ m) de área x (200  $\mu$ m  $\pm$  70  $\mu$ m) de profundidad.

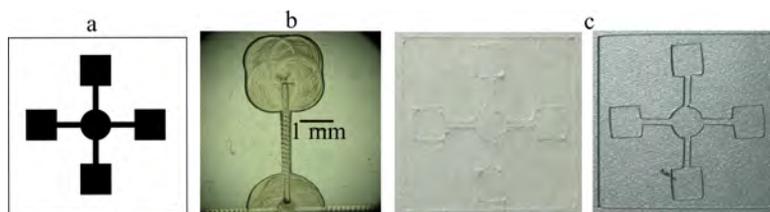
generando curvas como las que se muestran en la siguiente figura, sin importar la concentración. Algo similar se obtuvo con el diseño iii) en el que se generaron respuestas irregulares debido al largo trayecto que debía recorrer la gota de glucosa para llegar a todos los electrodos con las mismas características.

Para el diseño v) se usó el arreglo 1 aunque la gota de glucosa entró a través de una perforación sobre el sustrato del electrodo de referencia, ver Figura 8.13. Se usaron cintas adhesivas de vinil cortadas con plotter de corte para sellar los microelectrodos elaborados con maquinado CNC, de dimensiones de 2.0 x 2.0 mm  $\pm$  500  $\mu$ m de área. Este diseño quedó descartado porque aunque los micromoldes tenían una profundidad mayor de 200  $\mu$ m en comparación con los microcanales, manualmente no se logró colocar la misma cantidad de material para los cuatro micromoldes, generando que la gota no llegara correctamente a todos los electrodos, siendo la alineación y forma de poner la gota uno de los principales problemas, con lo que quedó descartado este diseño.

Así, los electrodos preparados con pasta LaserCon sensibilizada con GOx presentan una buena respuesta, que es referida como una curva de corriente en la que se observa un máximo de corriente que decrece con el tiempo hasta un valor constante; esto es con un tiempo aproximado de dos minutos. Además presentó repetibilidad con algunas concentraciones. Sin embargo, la pasta LaserCon contiene solventes, que una vez evaporados, la degradan y “secan” rápidamente, por lo que no se puede reutilizar. Además desgasta demasiado el sustrato porque se adhiere tan bien a los moldes de PMMA que es difícil tratar de limpiarlos para colocar una nueva pasta. Por lo que la solución fue cambiarla por un material menos agresivo ya que existen reportes de



**Figura 8.12:** a) Diseño ii), usado para detección múltiple. b) Curvas de corriente para distintas concentraciones. Se observa que sólo coinciden de dos en dos, debido al diseño. La mayor respuesta se da en los electrodos más próximos a la entrada de la muestra. Esto usando el arreglo 1, diseño ii, con un electrodo de trabajo de Pasta LaserCon sensibilizada con GOx y un electrodo de referencia de plata; de dimensiones de (2.0 mm x 2.0 mm  $\pm$  500  $\mu$ m) de área x (200  $\mu$ m  $\pm$  70  $\mu$ m) de profundidad.



**Figura 8.13:** a- diseño v), b- maquinado CNC, c- cintas de vinil cortadas con plotter de corte para sellar los microelectrodos elaborados con maquinado CNC.

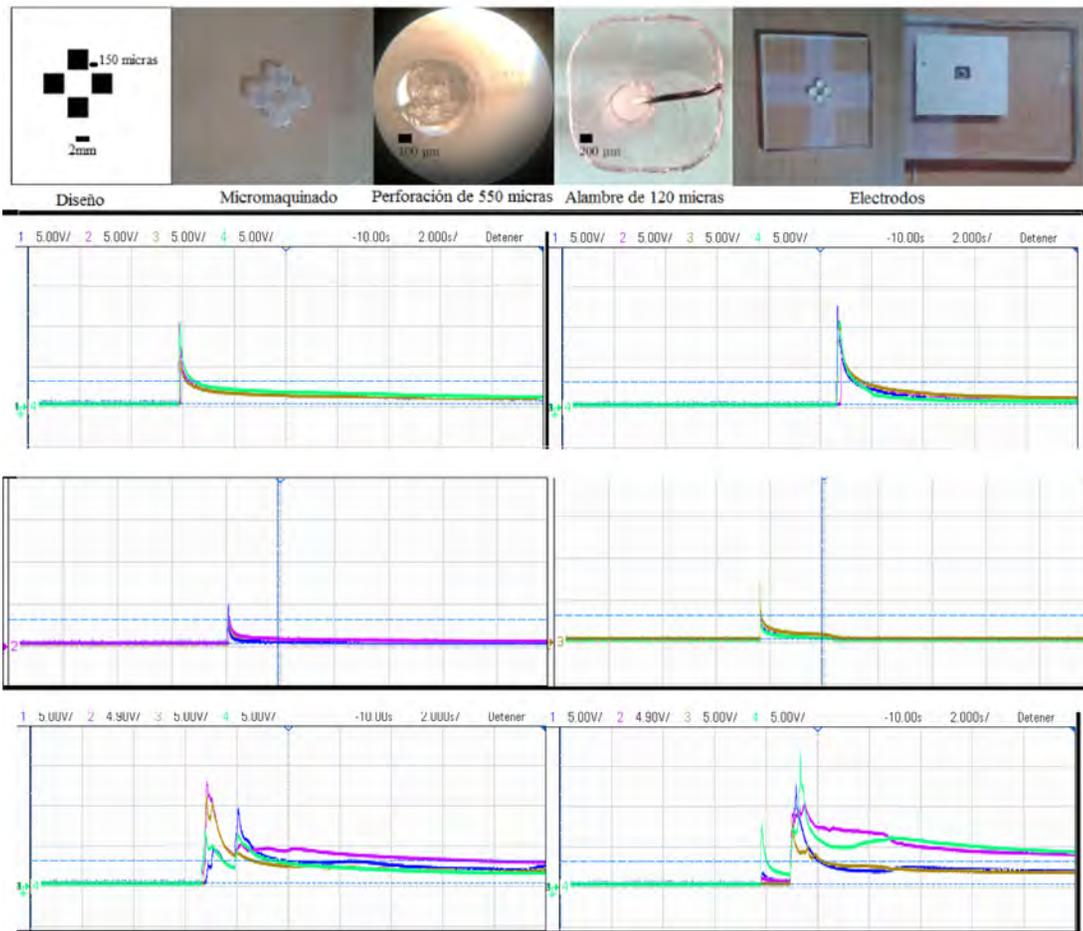
que el uso de altas concentraciones de solventes disminuye la actividad enzimática [25].

### 8.2.2.3. Electrodo de trabajo de plata con gel sensibilizado con GOx

Los electrodos anteriores se fabricaron con pastas de carbón sensibilizadas con la enzima GOx, pero un nuevo método de deposición de glucosa oxidasa en gel permitió cambiar la forma de inmovilizar la enzima.

La preparación de estos electrodos es la misma mencionada en la sección 7.4 y detallada en el anexo (Procedimiento de fabricación de microelectrodos) aunque al final se agrega el paso de depósito de una gota de 1  $\mu$ L del gel de GOx sobre el electrodo de trabajo de plata.

El diseño vi) se elaboró sobre PMMA con maquinado CNC con electrodos plata y gel



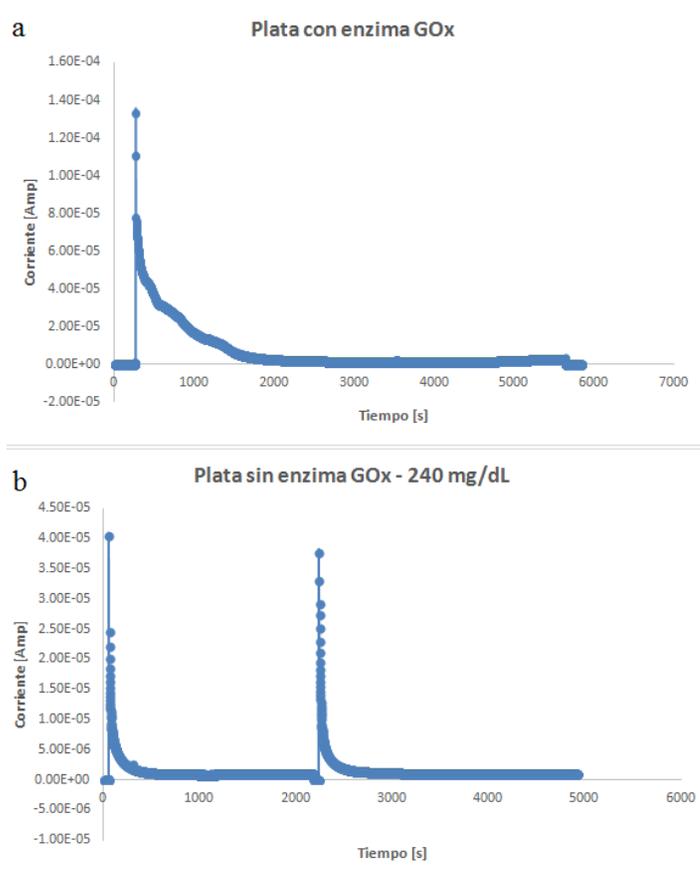
**Figura 8.14:** En la parte superior de la imagen se muestra la preparación de electrodo de trabajo de plata con gel sensibilizado con GOx (de dimensiones de  $(2.5 \text{ mm} \times 2.5 \text{ mm} \pm 500 \mu\text{m})$  de área  $\times$   $(300 \mu\text{m} \pm 70 \mu\text{m})$  de profundidad) y electrodo de referencia de plata. Usando el arreglo 1, diseño vi). Abajo las gráficas muestran las curvas de corriente con diseño vi) para: a- electrodo de trabajo de plata y gel sensibilizado con glucosa oxidasa, y electrodo de referencia de plata, con una concentración de 100 mg/dL; b- concentraciones de 60 y 90 mg/dL, respectivamente; c- respuestas obtenidas con la mayoría de las pruebas, usando o no la enzima.

sensibilizado con GOx, de dimensiones de  $(2.5 \text{ mm} \times 2.5 \text{ mm} \pm 500 \mu\text{m})$  de área  $\times$   $(300 \mu\text{m} \pm 70 \mu\text{m})$  de profundidad, ver Figura 8.14. Las mediciones no fueron repetibles y la corriente resultante resultó no ser proporcional a la concentración de glucosa, esto debido a la incorrecta forma de introducir la gota de glucosa hacia los electrodos, atribuida al diseño, además de las razones anteriores.

La plata líquida se adhiere muy bien a las microestructuras y brinda un mejor control sobre el microelectrodo, aunque el gel sensibilizado con GOx debe prepararse de forma precisa y lleva un largo tiempo preparar el electrodo de trabajo.

Durante estas pruebas se observaron curvas de corriente más limpias que las obtenidas con

las enzima GOx (Ver Figura 8.15), la respuesta fue más rápida, en aproximadamente un tercio menos, y en algunos casos se obtuvo repetibilidad en las mediciones. Esto atribuido a que la plata no es muy porosa y no permea la superficie continuamente como el carbón.



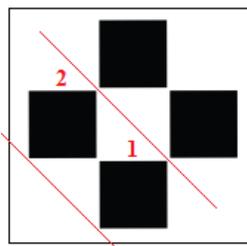
**Figura 8.15:** a- Ejemplo de curva de corriente obtenida para electrodo de plata sensibilizado con enzima GOx mediante atrapamiento en gel. b- Curva de corriente para electrodos de plata sin enzima GOx, usando el arreglo 2 y una concentración de 240 mg/dL.

#### 8.2.2.4. Electrodo de trabajo de plata

El resultado menos favorable resultó de la investigación de sensores de glucosa no enzimáticos, en los que varias investigaciones reportan su uso [10].

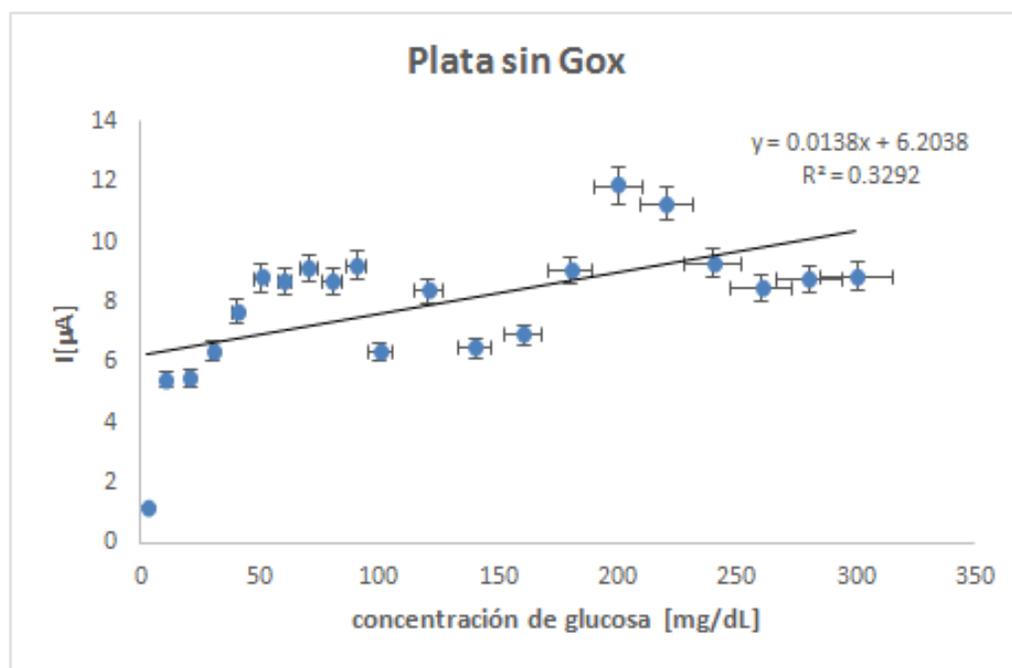
Se usó el arreglo 2 y el diseño vi) para fabricar electrodos de referencia y de trabajo de plata sin enzima GOx. El arreglo 2 se probó porque antes no se obtuvo reproducibilidad en las mediciones de glucosa, atribuido a que el arreglo 1 (sellado empalmado de electrodos) no permitía visualizar y analizar el flujo de la gota de glucosa hasta los electrodos, que posiblemente ponían resistencia al flujo.

En la Figura 8.17 se muestran los resultados obtenidos en las mediciones de glucosa, con la



**Figura 8.16:** Diseño vi) usado para preparar electrodos de plata sin enzima GOx con una medición y el arreglo 2 que se acomodó según lo indica esta figura. Los electrodos de dimensiones de  $(2.5 \text{ mm} \times 2.5 \text{ mm} \pm 500 \mu\text{m})$  de área  $\times$   $(300 \mu\text{m} \pm 70 \mu\text{m})$  de profundidad, con una separación entre ellos de  $200 \mu\text{m} \pm 50 \mu\text{m}$ .

corriente en función de la concentración de dextrosa usada. Se usó diseño vi) considerando dos electrodos cercanos como lo indica la Figura 8.16.



**Figura 8.17:** Caracterización de electrodos de plata sin enzima GOx para distintas concentraciones de glucosa. Para una medición, usando el arreglo 2, diseño vi) (considerando sólo dos electrodos), de dimensiones de  $(2.5 \text{ mm} \times 2.5 \text{ mm} \pm 500 \mu\text{m})$  de área  $\times$   $(300 \mu\text{m} \pm 70 \mu\text{m})$  de profundidad).

### 8.2.3. Micromoldes fabricados con grabado láser

Los micromoldes elaborados con grabado láser resultan atractivos debido a que existe un mejor control en su proceso de fabricación, y porque es posible crear microestructuras, ver Figura 8.18. Tras realizar un análisis de perfil a micromoldes obtenidos por grabado láser, se observó que su superficie es más uniforme y presenta menos rugosidad. Además, con la debida

estandarización de fabricación de micromoldes, se pueden lograr estructuras con menos error, comparado con las otras técnicas de microfabricación, como lo muestra la Figura 8.19.

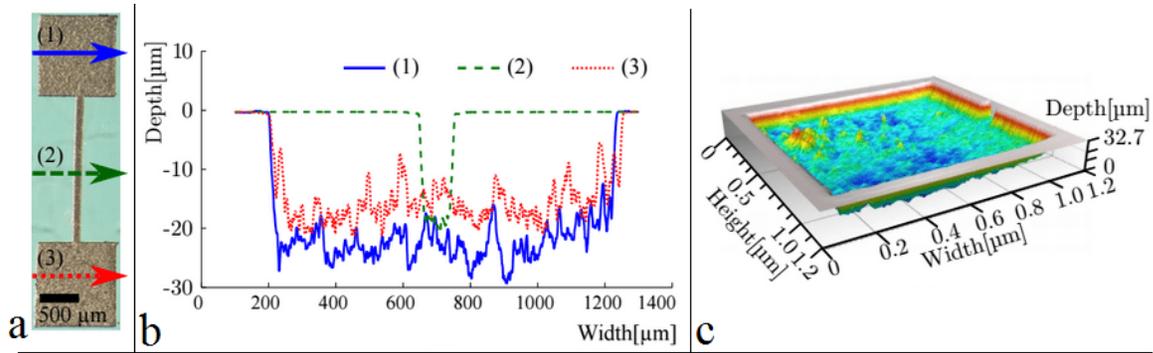


Figura 8.18: a-micromolde de PMMA, b- perfil de las líneas mostradas y c-escaneo 3D.

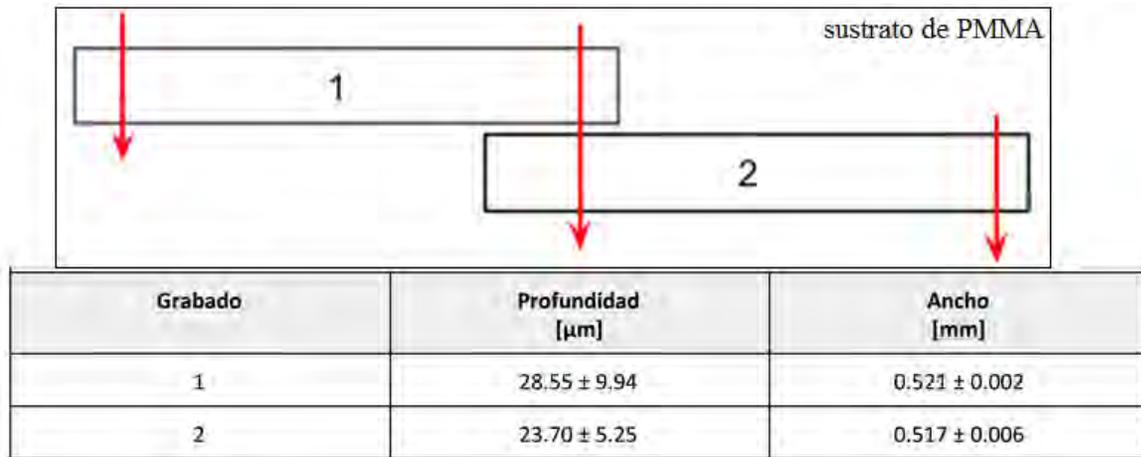
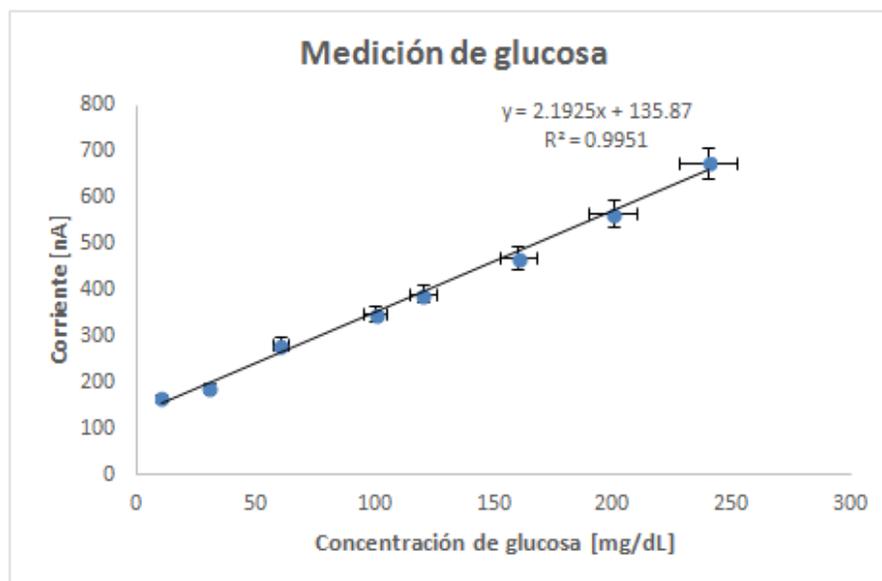


Figura 8.19: En esta figura se muestra el análisis de perfil realizado a un micromolde de PMMA fabricado con grabado láser para dos grabados distintos (1 y 2).

### 8.2.3.1. Electrodo de trabajo de Pasta LaserCon sensibilizada con GOx

Como antes se mencionó, la pasta LaserCon se eligió por sus características, como no hidrofobicidad y buena adherencia a los sustratos de PMMA, lo que permitió usar el láser de CD-DVD para crear micromoldes.

Como prueba inicial, se preparó un molde de PMMA de área de 2.0 mm x 2.0 mm ± 100 μm con el láser de CD-DVD para el electrodo de trabajo, que según la metodología descrita en el Capítulo 7 se rellenó con pasta LaserCon sensibilizada con la enzima GOx. Así, como el mejor de los casos, se observó repetibilidad con algunas concentraciones y después de numerosas mediciones se obtuvo el mejor resultado, como lo muestra la Figura 8.20.



**Figura 8.20:** Mediciones de glucosa con electrodo de trabajo de Pasta LaserCon sensibilizada con GOx y electrodo de referencia de plata, fabricados con el láser de CD-DVD en PMMA de área de 2.0 mm x 2.0 mm  $\pm$  100  $\mu$ m. Usando el arreglo 1 y diseño 1

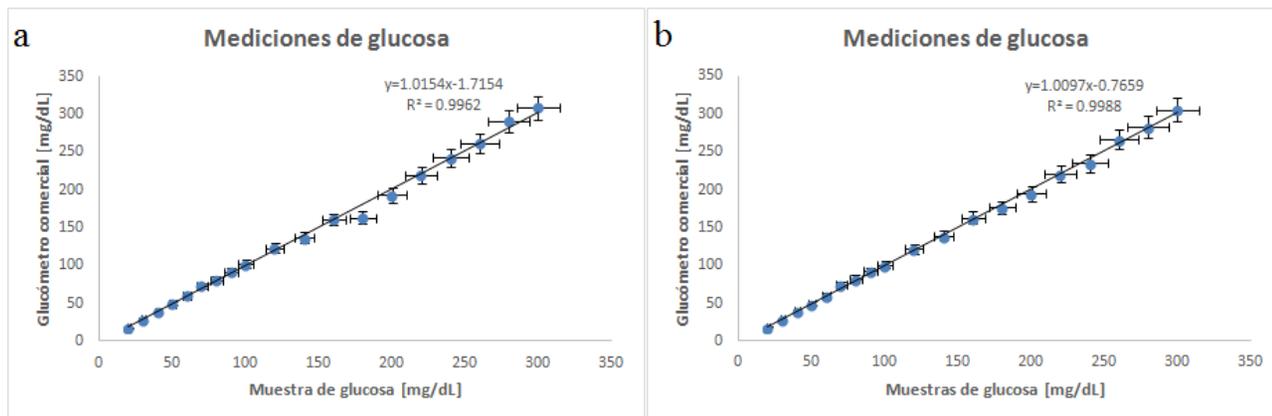
### 8.2.3.2. Electrodo de trabajo de plata con gel sensibilizado con GOx

El grabado láser permite reducir las dimensiones de los moldes en PMMA. Más aún, con el uso de la plata líquida que se adhiere muy bien a las microestructuras y el gel sensibilizado con la enzima GOx. Se prepararon electrodos con la metodología mencionada en la sección 7.4 y detallada en el anexo "Procedimiento de fabricación de microelectrodos". En este caso al final se agregó el depósito de una gota de 1  $\mu$ L del gel de GOx sobre el electrodo de trabajo de plata, y se dejó secar.

El uso de plata y gel sensibilizado con GOx permitió preparar un microelectrodo de una área superficial mínima de 500x500  $\mu$ m  $\pm$  100  $\mu$ m. Sin embargo, para preparar cada microelectrodo se perforó el sustrato con una broca de diámetro de 400  $\mu$ m, ésto para introducir un alambre y obtener las señales de respuesta. Esta perforación desgastó el material e hizo imposible el flujo de la gota de glucosa por el canal. Lo que muestra la importancia de una superficie homogénea, como la de las tiras reactivas comerciales. Así, aunque el decremento en la escala de los electrodos favoreció la sensibilidad y el control en las mediciones, aumentó el error y aparecieron complicaciones como los defectos superficiales de los sustratos que impidieron el flujo de la muestra de glucosa.

## 8.3. Mediciones con glucómetro comercial

Para verificar que las muestras de glucosa preparadas eran correctas, y con esto validar las mediciones, se usó el glucómetro comercial ACCUCHECK Performa realizando cuatro mediciones para cada concentración de glucosa.



**Figura 8.21:** a-Una y b-cuatro mediciones con el glucómetro comercial ACCUCHECK Performa para todas las concentraciones de glucosa preparadas.

## 8.4. Análisis de materiales

### 8.4.1. El uso de PDMS

En capítulos anteriores se mencionó que el PDMS es muy usado en los sistemas microfluídicos, pero la mayoría de estos sólo elaboran canales y los sellan. Así que los retos que presenta el PDMS en el presente trabajo es que se crearon microcanales por donde fluyó la gota de glucosa y micromoldes que se rellenaron con material conductor para después sellarlos. El PDMS es un polímero moldeable que permite replicar complejas estructuras de un molde maestro (Shrinky Dinks) pero si el molde no es perfecto la réplica tampoco lo será y esto influirá considerablemente en las dimensiones del micromolde. Adicionalmente se debe modificar su superficie para hacerla hidrofílica, así como considerar que se trabaja a escala micrométrica y que la forma de depositar los materiales no es la mejor porque estos no permanecen adheridos a su superficie. Por todo lo anterior el PDMS no es la mejor opción para crear microelectrodos según la metodología presentada.

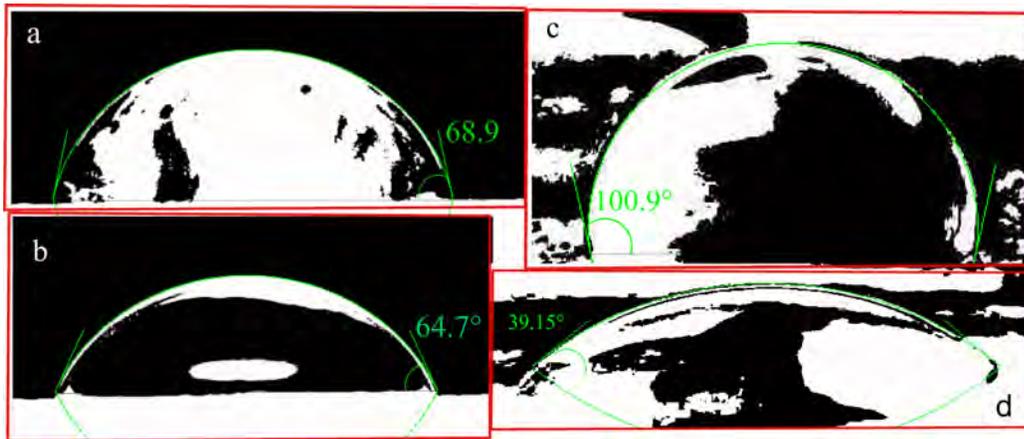
En resumen, la microescala hace que sea muy difícil manipular el PDMS, el material conductor se desprende, es muy tardado, es muy sucio, las superficies se manchan, no hay

control de dimensiones y no hay unión PDMS-PDMS.

### 8.4.2. El uso de PMMA

El PMMA sí permitió elaborar microelectrodos de diferentes geometrías y materiales para hacer pruebas rápidas, pero no es el material ideal para medir glucosa porque se observó que uno de los factores críticos en la medición es el control de volumen de glucosa, donde la microfluídica es difícil de controlar en ese material.

Los materiales de electrodos que aquí se describen fueron pastas conductoras, plata y oro, sensibilizados con GOx y sin esta. A continuación, en la Figura 8.22, se presenta un cuadro comparativo de las soluciones y dificultades presentadas para cada tipo de sensor de glucosa definido según los materiales de los electrodos.



**Figura 8.22:** Ángulos de contacto tomados con el equipo de medición mecánica por microindentación (Femto Tool FT-MTA-02): a- sobre plata (68.9°), b- sobre PMMA (64.7°), c- sobre PDMS hidrofóbico (100.9°), d- sobre PDMS hidrofílico (39.15°).

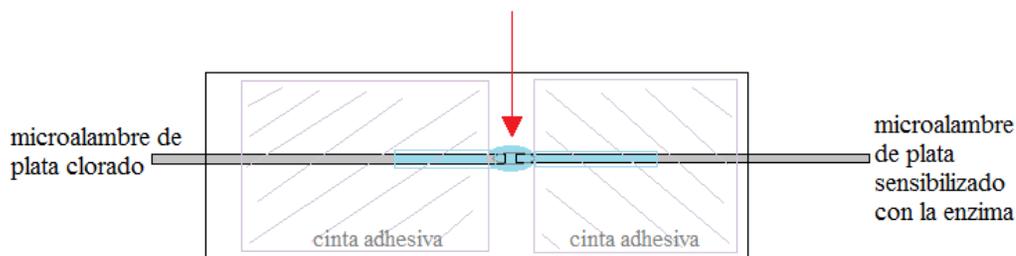
## 8.5. Otros electrodos

### 8.5.1. Microalambres de plata

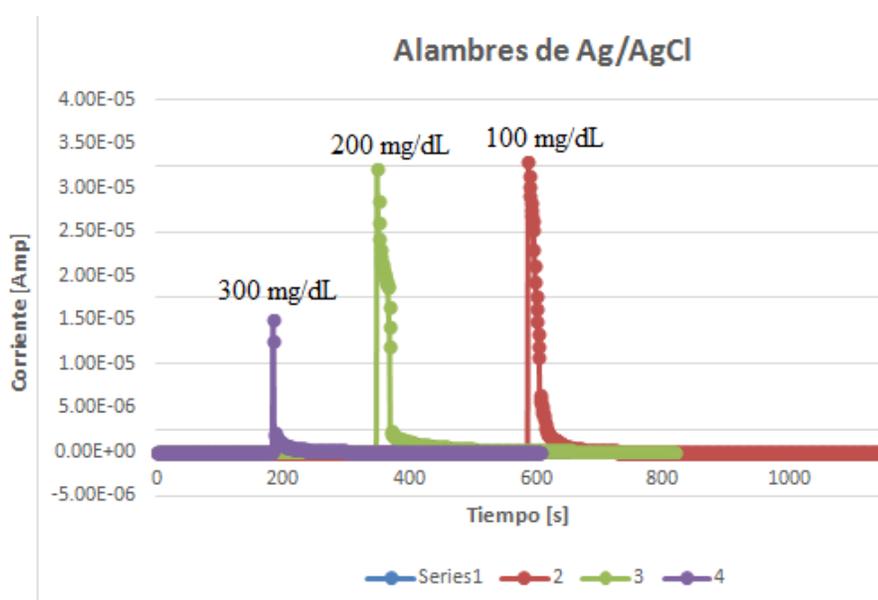
Adicionalmente y como una prueba de la importancia del control de volumen de la muestra de glucosa, se usaron dos alambres de plata de un diámetro de  $600\mu\text{m}$ . El alambre de trabajo se bañó en el gel sensibilizado con la enzima GOx y el alambre de referencia se cloró.

El arreglo de estos microelectrodos de alambre se presenta en la Figura 8.23, donde la gota de glucosa de un volumen de  $1\mu\text{L}$  se depositó directamente sobre estos y por acción de capilaridad

avanzó a lo largo de los microelectrodos (alambres) generando curvas de corriente más rápidas para todas las concentraciones, aunque no precisas debido al tipo de arreglo, ver Figura 8.24.



**Figura 8.23:** Arreglo para microalambres. La gota de la muestra de glucosa se depositó al centro (indicado en la figura con una flecha) y se distribuyó por capilaridad hacia los microalambres.



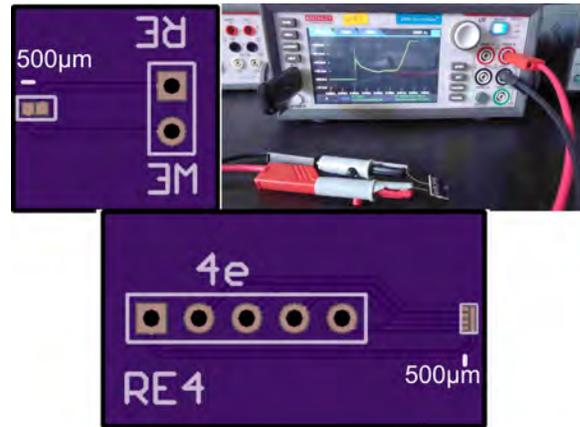
**Figura 8.24:** Figura que muestra las curvas de corriente de las concentraciones 100, 200 y 300 mg/dL usando microelectrodos de alambre de plata con un diámetro de  $600\mu\text{m}$ . El alambre de trabajo se cubrió con el gel sensibilizado con la enzima GOx y el alambre de referencia se cloró.

## 8.5.2. Microelectrodos en PCB

Adicionalmente, se realizaron mediciones con electrodos de oro, con y sin GOx en placas de circuito impreso (PCB: Printed Circuit Board, por sus siglas en inglés), como una forma de verificar si la no reproducibilidad en las mediciones de glucosa con los microelectrodos se debía a la preparación de estos, ver Figura 8.25.

Estos electrodos se elaboran sobre placas de cobre en las que se imprimen los diseños deseados y se comunican a través de la placa con caminos impresos hasta determinados puntos (según el diseño) lo que provoca que la placa tenga cierto relieve, que afecta al control de la

microfluídica usando el arreglo 2. Por lo que fue necesario colocar la gota de glucosa de volumen de  $1\mu\text{L}$  directamente sobre los microelectrodos de oro, lo que causó que las curvas de corriente fueran irregulares, sin obtener reproducibilidad en las mediciones, ni para una, ni para cuatro mediciones.



**Figura 8.25:** Microelectrodos de oro en PCB, para una y cuatro mediciones.

# Capítulo 9

## Conclusiones y trabajo futuro

Se presentó un procedimiento para elaborar microelectrodos, que ha sido usado en otras investigaciones del Laboratorio de Óptica Láser con resultados favorables [13]. Este procedimiento implementado en la medición de glucosa presentó retos interesantes debido a que no sólo consistió en preparar electrodos y realizar mediciones, sino que involucró múltiples procesos físicos como el control de las propiedades de los fluidos a microescala, químicos como la reacción redox llevada a cabo en los electrodos, tecnológicos como la implementación de técnicas de microfabricación y elaboración de diseños, electrónicos como la implementación de componentes electrónicos para convertir la corriente producida en la reacción redox en señales eléctricas, y biológicos como el uso de enzimas y muestras para la medición de glucosa.

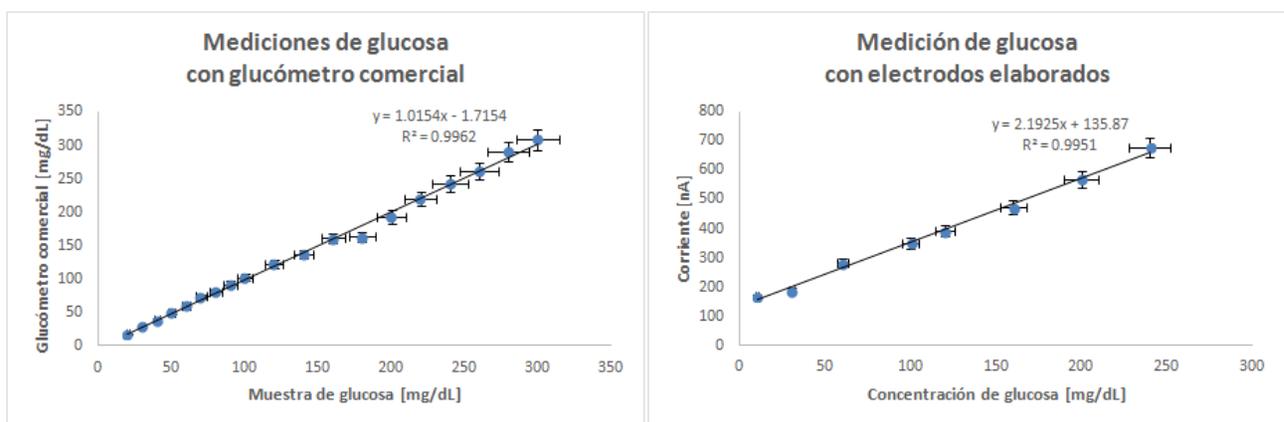
El resultado de esta investigación muestra que los microelectrodos elaborados con la metodología que aquí se presenta, permiten medir la corriente resultante de la reacción redox donde la enzima glucosa oxidasa cataliza la glucosa para determinar la concentración de glucosa presente.

El análisis del control de volumen indica implementar el uso del arreglo 2 en la medición de glucosa, ya sea para una o cuatro mediciones. El análisis con microelectrodos de oro fabricados en PCB (Printed Circuit Board, por sus siglas en inglés) muestra que efectivamente, la medición de glucosa va más allá de la controlada fabricación de electrodos, porque involucra microfluídica, el correcto depósito de la enzima GOx, el arduo trabajo de investigación que falta aún para desarrollar sensores no enzimáticos a partir de materiales catalizadores y el uso de otras técnicas y sustratos que permitan medir glucosa sin enzima.

El peor resultado se obtuvo en el análisis del sensor no enzimático, usando un electrodo de trabajo de plata sin enzima GOx y un electrodo de referencia de plata de dimensiones de (2.5 mm x 2.5 mm  $\pm$  500  $\mu$ m) de área x (300  $\mu$ m  $\pm$  70  $\mu$ m) de profundidad, con el arreglo 2, diseño

vi) (considerando sólo dos electrodos). Se obtuvo que la corriente producida en la reacción no varía proporcionalmente a la concentración de glucosa en un rango de 2.5 mg/dL - 300 mg/dL, obteniendo un valor de  $R^2 = 0.3292$ .

El mejor resultado se obtuvo usando un electrodo de trabajo de Pasta LaserCon sensibilizada con GOx y electrodo de referencia de plata de dimensiones de de 2.0 mm x 2.0 mm  $\pm$  100  $\mu$ m, fabricados con el láser de CD-DVD en PMMA, usando el arreglo 1 y diseño i. Se obtuvo una caracterización en la que los resultados muestran que la corriente producida en la reacción varía proporcionalmente a la concentración de glucosa en un rango de 2.5 mg/dL - 300 mg/dL. Obteniendo un valor de  $R^2 = 0.9951$ , mientras que con el glucómetro comercial ACCUCHEK Performa se obtuvo un  $R^2 = 0.9962$ , esto es, un porcentaje de diferencia de 0.1 %



**Figura 9.1:** Figura comparativa de las mediciones de glucosa realizadas con el glucómetro comercial ACCUCHEK Performa vs las realizadas por los electrodos elaborados en el presente trabajo, de glucosa con electrodo de trabajo de Pasta LaserCon sensibilizada con GOx y electrodo de referencia de plata, fabricados con el láser de CD-DVD en PMMA de área de 2.0 mm x 2.0 mm  $\pm$  100  $\mu$ m. Usando el arreglo 1 y diseño i

Cada proceso presentado se estudió detenidamente hasta estandarizarlo para reducir errores y lograr la caracterización en la medición de glucosa con el objetivo de desarrollar un biosensor de glucosa. Sin embargo, estos procesos tienen limitaciones (como la no reproducibilidad debida a los equipos y procedimientos, empleadas para crear micromoldes y microelectrodos) que crean también limitaciones del producto final. Por ejemplo, una de las dificultades de este proyecto fue el uso de la enzima GOx, ya que aunque su depósito y control sobre los microelectrodos se basó en publicaciones [29, 31], su manipulación fue difícil porque se degrada con solventes, adhesivos, altas temperaturas y contaminación, que introducían error en las mediciones. Adicionalmente para hacer la caracterización se requerían numerosas pruebas, es decir, numerosos electrodos cuya reproducibilidad no se alcanzó con ninguna técnica de microfabricación usada.

Los resultados son favorables y cada uno de estos enriqueció la investigación, y brindó ideas que permitirán continuar con el desarrollo del biosensor de glucosa. Ya que las limitaciones, los análisis de esta investigación y la posibilidad de probar nuevas técnicas para crear microelectrodos como el sputtering, presentan una nueva perspectiva en el desarrollo del biosensor de glucosa, ya que como trabajo futuro se probarán nuevas técnicas de microfabricación, nuevos materiales conductores y nuevas formas de sensibilizar el electrodo con la enzima glucosa oxidasa, que permitan incorporar los análisis obtenidos de esta investigación y lograr mediciones de glucosa en sangre que compitan con las de un glucómetro comercial.

# Anexo

## .1. Preparación de PDMS

### Método

Usando el kit de PDMS (Sylgard 184), mezclar perfectamente el prepolímero con el agente curante en una proporción 10:1 y curar a 60°C durante 48 horas.

### Materiales requeridos

Kit de PDMS (Sylgard 184 Silicone Elastomer Base & Sylgard 184 Silicone Elastomer Base Agent Curant), vaso de precipitados, varilla de acero inoxidable, portaobjetos de vidrio, papel aluminio y toallas de papel.

### Equipos requeridos

Balanza analítica, horno o parrilla, bomba de vacío y desecador.

### Preparación del operador y del área de trabajo

Por seguridad se requiere el uso de bata, guantes de nitrilo y cubrebocas. Es necesario previamente, limpiar el área de trabajo y seleccionar los materiales que se usarán a lo largo del proceso para evitar contratiempos y accidentes.

### Puntos a cuidar

Es importante considerar que el prepolímero y el agente curante están en estado líquido, el primero es más viscoso que el segundo. Además de que la polimerización inicia cuando éstos dos se mezclan.

### Metodología

- i. Colocar el vaso de precipitados sobre la balanza analítica y tarar.
- ii. Con ayuda de una varilla de acero inoxidable, vertir el prepolímero en el vaso de precipitados, registrar el valor y tarar.

- iii. Vertir el agente curante (10 % del peso del prepolímero) en el mismo vaso de precipitados.
- iv. Colocar la varilla de acero inoxidable en el Dremel para mezclar el PDMS perfectamente durante 5 minutos.
- v. Colocar el vaso de precipitados en el desecador, conectado a una bomba de vacío, para eliminar las burbujas de aire formadas en el polímero durante la mezcla. El tiempo varía según la cantidad de PDMS preparada.
- vi. Forrar el portaobjetos de vidrio con el papel aluminio para formar un molde en el que se deposite el PDMS (aún en estado líquido).
- vii. Vaciar el PDMS sobre el molde preparado.
- viii. Calentar el PDMS en el molde en horno o parrilla a 60°C durante 48 horas.
- ix. Desmoldar la membrana de PDMS y recortar los bordes que generalmente son irregulares.
- x. Guardar y etiquetar la muestra de PDMS.
- xi. Limpiar el área de trabajo y guardar los materiales y equipos usados.

### Conclusiones

Se describió un procedimiento para elaborar PDMS, empleado en técnicas de fabricación molde-réplica, que permite crear estructuras de distintas dimensiones para distintos objetivos.

## **.2. Preparación de muestras de glucosa**

### Método

Preparar muestras de glucosa a distintas concentraciones con un pH biológico de 7.4

### Materiales requeridos

Glucosa-D, PBS, agua destilada, ácido clorhídrico, vaso de precipitados, probetas, mosca magnética, soluciones buffer de pH's de 4 y 7.

### Equipos requeridos

Parrilla Heidolph, balanza analítica, pH meter 340 CORNING.

### Preparación del operador y del área de trabajo

Por seguridad se requiere el uso de bata, guantes de nitrilo y cubrebocas. Es necesario previamente, limpiar el área de trabajo y seleccionar los materiales que se usarán a lo largo del proceso para evitar contratiempos y accidentes.

### Puntos a cuidar

Consultar la guía de seguridad del ácido clorhídrico. Considerar que el pH biológico es de 7.35-7.45 [referencia] Ácido baja pH, base sube pH.

#### Metodología

- i. Calibrar el pH meter con soluciones buffer de pH's de 4 y 7.
- ii. Usar vaso de precipitados y probeta para dosificar 1 litro de agua destilada y 100 mililitros de PBS.
- iii. Poner el agua destilada y el PBS en un vaso de precipitados.
- iv. Colocar la disolución sobre la parrilla y agregarle un agitador magnético, para mezclar a 1000 rpm durante tres minutos.
- v. Medir el pH de la disolución con el pH meter.
- vi. Agregar gotas de ácido clorhídrico hasta lograr un pH de 7.42
- vii. Por otro lado, en una balanza analítica pesar la glucosa-D: 2.5, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300 [mg].
- viii. Tomar 1dL de la disolución para agregarle cada peso de glucosa-D.
- ix. Revolver cada muestra de glucosa [mg/dL].
- x. Enfrascar y etiquetar debidamente.
- xi. Limpiar el área de trabajo y guardar los materiales y equipos usados.

#### Conclusiones

Se describió un procedimiento para preparar muestras de glucosa útiles en la calibración del sensor de glucosa.

### **.3. Preparación de pasta conductora sensibilizada con glucosa oxidasa**

#### Método

Preparar pasta de material conductor; mezclando manualmente el conductor y la enzima glucosa oxidasa, en una proporción 10:1

#### Materiales requeridos

Material conductor (rodio en carbón, pasta LaserCon), enzima glucosa oxidasa (Sigma Aldrich), varilla y espátula de acero inoxidable y vaso de precipitados.

#### Equipos requeridos

Balanza analítica

Preparación del operador y del área de trabajo

Por seguridad se requiere el uso de bata, guantes de nitrilo y cubrebocas. Es necesario previamente, limpiar el área de trabajo y seleccionar los materiales que se usarán a lo largo del proceso para evitar contratiempos y accidentes.

Puntos a cuidar

La enzima glucosa oxidasa se degrada con la temperatura, por lo que es conveniente mantenerla a una temperatura de 30°C durante la preparación.

Metodología

- i. Colocar el vaso de precipitados sobre la balanza analítica y tarar.
- ii. Con ayuda de una espátula de acero inoxidable poner el conductor sobre el vaso de precipitados, registrar el valor y tarar.
- iii. Usando la espátula de acero inoxidable poner la enzima glucosa oxidasa (10 % del peso del conductor).
- iv. Mezclar manualmente con una varilla de acero inoxidable hasta incorporar ambos materiales en una sola pasta, aproximadamente 5 minutos.
- v. Cubrir el vaso de precipitados con aluminio.
- vi. Limpiar el área de trabajo y guardar los materiales y equipos usados.

Conclusiones

Se describió un procedimiento para preparar pasta conductora sensibilizada con la enzima glucosa oxidasa.

## **.4. Gel sensibilizado con glucosa oxidasa**

Método

Elaborar un gel con grenetina y la enzima glucosa oxidasa. Su elaboración está inspirada en [referencia], sin embargo en esta reportan la elaboración de una gelatina, que para el presente trabajo no funciona, por lo que a continuación se mencionan las cantidades exactas empleadas en la elaboración del gel muy diluido.

Materiales requeridos

Grenetina, glucosa oxidasa, agua destilada, varilla y espátula de acero inoxidable, vaso de precipitados, agitador magnético.

Equipos requeridos

Balanza analítica, parrilla.

Preparación del operador y del área de trabajo

Por seguridad se requiere el uso de bata, guantes de nitrilo y cubrebocas. Es necesario previamente, limpiar el área de trabajo y seleccionar los materiales que se usarán a lo largo del proceso para evitar contratiempos y accidentes.

Puntos a cuidar

La enzima glucosa oxidasa se degrada con la temperatura, por lo que es conveniente mantenerla a una temperatura de 30°C durante su preparación.

Metodología

- i. Colocar el vaso de precipitados sobre la balanza analítica y tarar.
- ii. Usar una espátula de acero inoxidable para poner 5.27 miligramos de grenetina sobre el vaso de precipitados, registrar el valor y tarar.
- iii. Agregar 12 ml de agua destilada al vaso de precipitados.
- iv. Colocar el vaso de precipitados sobre la parrilla a una temperatura de 100°C.
- v. Agregar un agitador magnético, para mezclar a 500rpm.
- vi. Usar la varilla de acero inoxidable para incorporar la grenetina que se pudiera pegar en las paredes del vaso de precipitados.
- vii. Retirar de la parrilla hasta observar una mezcla homogénea, esto ocurre en aproximadamente 20 minutos.
- viii. Dejar enfriar a temperatura ambiente, aproximadamente 30 minutos.
- ix. Agregar 10.41 mg de glucosa oxidasa.
- x. Colocar el vaso de precipitados sobre la parrilla a una temperatura de 35°C.
- xi. Agregar un agitador magnético, para mezclar a 500rpm durante 10 minutos.
- xii. Retirar el agitador magnético.
- xiii. Cubrir el vaso de precipitados con aluminio.
- xiv. Limpiar el área de trabajo y guardar los materiales y equipos usados.

Conclusiones

Se describió un procedimiento para preparar un gel sensibilizado con la enzima glucosa oxidasa.

## **.5. Procedimiento de fabricación de microelectrodos**

### Método

Se describe el procedimiento de elaboración de microelectrodos, ejemplificando para sustratos de PDMS y PMMA usando plata como conductor, que consiste en depositarla sobre un área determinada y ponerle un alambre para obtener las señales de respuesta deseadas..

### Materiales requeridos

Los materiales necesarios son sustratos de PMMA (Plastiglas de México S.A. de C.V.) y PDMS (Sylgard 184 Silicone Elastomer Base y Sylgard 184 Silicone Elastomer Base Agent Curant) con micrograbados, cinta adhesiva, tijeras, alambres delgados, hisopos, navaja, espátula de goma (preferentemente), varilla de acero inoxidable, alcohol isopropílico, acetona, tinta de plata (CW2200MTP de Chemtronics), balines, imán de neodimio, brocas, perforadora o aguja para realizar perforación sobre PDMS. Por las dimensiones de los microelectrodos, los alambres necesarios deben tener un diámetro pequeño, por ejemplo, 110 micras de grosor o menos si es posible.

### Equipos requeridos

Computadora con editores gráficos como Inkscape, Illustrator, Paint, etc, para crear los diseños de microelectrodos; Dremel y brocas para realizar perforación sobre PMMA; multímetro digital o Keithley SMU 2450 (ver protocolo) para verificar continuidad y caracterizar los microelectrodos; cámara fotográfica, profesional o de celular para tomar fotografías; microscopio Nikon Eclipse CI-L para observar los microelectrodos.

### Control y validación del método

Al proporcionar un micromolde en sustrato de acrílico seguir el presente procedimiento de fabricación de microelectrodos. i. Perforar el sustrato con una broca de 1/64” e introducir un alambre de 110 micras a través de la perforación; fijarlo y enmascararlo con cinta adhesiva para evitar que se rompa con el uso. ii. Verificar visualmente que el alambre y la base del micromolde están en el mismo plano. iii. Depositar la plata y retirar el excedente usando la técnica de Doctor Blade. iv. Dejar secar y usar hisopo con alcohol isopropílico para limpiar los bordes del microelectrodo, a fin de evitar residuos de material conductor en áreas no deseadas. v. Verificar continuidad entre el alambre y el microelectrodo, con un multímetro digital.

## Preparación del operador y del área de trabajo

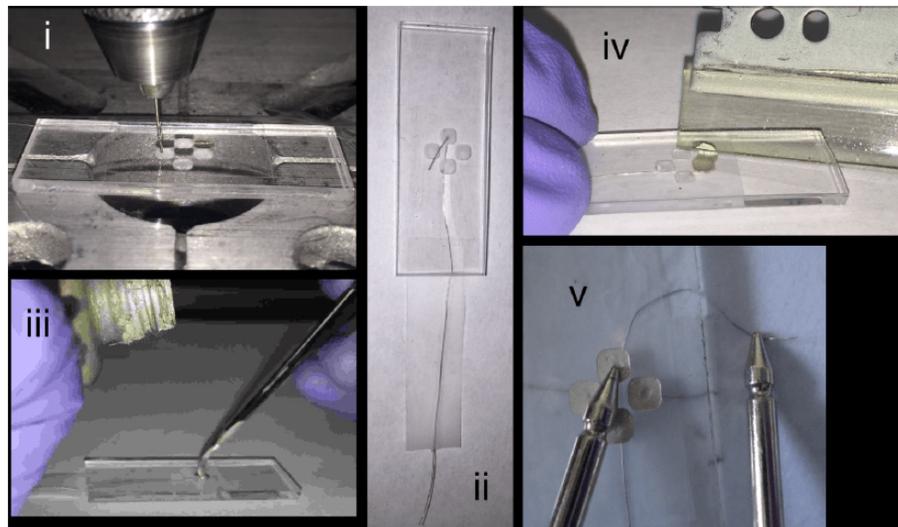
Por seguridad se requiere el uso de bata, guantes de nitrilo y cubrebocas. Es necesario previamente, limpiar el área de trabajo y seleccionar los materiales que se usarán a lo largo del proceso para evitar contratiempos y accidentes.

La tinta de plata puede conseguirse en forma de pluma, sin embargo es difícil su utilización porque la mayoría de las veces “se tapa”, una solución es vaciarla en un frasco de vidrio y agregarle balines para que al momento de usarla, con un imán de neodimio se mezcle de nuevo perfectamente.

## Puntos a cuidar

Se pueden elaborar microelectrodos sobre sustratos de PMMA y PDMS sin micrograbar, sólo enmascarando la superficie de los sustratos con cinta adhesiva, sin embargo, no se recomienda porque se tiene poco control sobre el área deseada; además el PDMS es un material hidrofóbico, y es muy fácil que se ensucie.

## Metodología



**Figura 2:** Ejemplo de tira reactiva FreeStyle. En la figura se muestran los electrodos impresos y su arreglo. Estos electrodos hacen contacto con el circuito interno del dispositivo digital.

i. Usar un editor gráfico como Inkscape, Illustrator, Paint, etc, para elaborar el diseño con la geometría deseada para el microelectrodo.

ii. Seleccionar materiales y equipos para fabricar el microelectrodo con la técnica más conveniente y disponible (grabado láser, maquinado CNC, shrinky dinks).

iii. Limpiar los sustratos con los micrograbados perfectamente con hisopo y alcohol isopropílico. En el caso de sustratos de PDMS ayuda usar un trozo de cinta adhesiva para

retirar polvo y pelusas. Enseguida se debe realizar un etiquetado de los mismos.

iv. Opcionalmente, en ambos sustratos (PDMS y PMMA) se puede enmascarar alrededor del micrograbado con cinta adhesiva, con el fin de que el sustrato no se desgaste tanto cuando se deposite el material conductor en el micrograbado.

v. Para el sustrato de PMMA se usa el DREMEL y con una broca (del menor diámetro posible) se hace una perforación sobre el micrograbado. Para el sustrato de PDMS se usa una perforadora (del menor diámetro posible) o una aguja de acero inoxidable para hacer la perforación.

vi. De nuevo, realizar limpieza sobre los sustratos, debido a que pueden quedar partículas de los materiales al momento de realizar las perforaciones sobre éstos.

vii. Introducir el alambre (del menor diámetro posible) a través de la perforación. Para el caso del PMMA se introduce el alambre atravesando completamente el sustrato y se fija sobre el otro lado pegando con cinta adhesiva. Para el caso del PDMS se procede igual que con el PMMA, aunque si no se cuenta con perforadora, se introduce el alambre en una aguja y ésta a su vez en el micrograbado; fijando el alambre sobre el otro lado con cinta adhesiva.

viii. Jalar el alambre ligeramente y despacio, cuidando que no se rompa, hasta que quede su menor longitud posible sobre el área donde se depositará el conductor, si esto no es posible, se puede cortar el alambre con tijeras o navaja de acero inoxidable, es decir, el extremo del alambre debe quedar sobre el mismo plano que la base del micromolde. Recordemos que los alambres nos sirven para obtener las señales de respuesta de los microelectrodos.

ix. Enmascarar el alambre con cinta adhesiva para evitar que se rompa con el uso.

x. Mezclar perfectamente la tinta conductora de plata (que tiene en su interior balines) usando el imán de neodimio, haciendo movimientos circulares sobre la base del recipiente de vidrio o en su defecto agitar fuertemente.

xi. Usar una varilla de acero inoxidable o un alambre para tomar un poco de plata y depositarla sobre el micrograbado.

En PDMS se recomienda previamente realizar descarga corona para hacer hidrofílica su superficie y lograr un mejor depósito de plata.

xii. Emplear la técnica de Doctor Blade, deslizando una espátula de goma, inclinada aproximadamente a  $45^\circ$  para retirar el exceso de plata sobre el micrograbado.

xiii. Dejar secar a temperatura ambiente, el tiempo depende de la cantidad de plata depositada.

xiv. De ser necesario, repetir desde paso 9.

xv. En su caso, retirar las máscaras de cinta adhesiva de alrededor del microelectrodo. Se procede a limpiar los bordes del microelectrodo pasando ligeramente un hisopo con alcohol isopropílico hasta eliminar la plata depositada en áreas no deseadas.

xvi. Tomar fotos y reportar en la bitácora.

xvii. Usar multímetro digital para verificar continuidad entre el alambre que se colocó y el microelectrodo; y según la aplicación usar el medidor Agilent LCR meter E4980A (ver protocolo) ó el Keithley SMU 2450 (ver manual) para caracterizar la impedancia de los microelectrodos y garantizar su correcto funcionamiento.

#### Conclusiones

Se presentó un procedimiento fácil y accesible para elaborar microelectrodos en sustratos de PDMS y PMMA, usando plata como material conductor, pero indicando la posibilidad de elaborarlos con otros materiales.

# Bibliografía

- [1] Organización Mundial de la Salud; Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>; Consultada el 20-12-16.
- [2] Rahman Md. , Ahammad A. J. (2010). A Comprehensive Review of Glucose Biosensors Based on Nanostructured Metal-Oxides. *Sensors*, 10, 4855-4886.
- [3] Donnelly R, Emslie-Smith AM, Gardner I, Morris A. (2000) ABC of vascular disease: Vascular complications of diabetes. *BMJ*. 320(7245):1062-1066.
- [4] Aguilar-Salinas C, Gómez-Pérez FJ. (2006). Declaración de Acapulco: Propuesta para la reducción de la incidencia de diabetes en México. *Rev Invest Clin*. 58(1):71-77.
- [5] M. Kutz. (2009). "Biomedical Engineering and design Handbook", 2nd ed. Mc Graw Hill.
- [6] Gennady Evtugyn. (2014). *Biosensors: Essentials*. Springer, Volume 84, Cap1-3. 1.
- [7] Grieshaber D., MacKenzie R. (2008). *Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures*. *Sensors*, 8, 1400-1458.
- [8] Marinesco S., Dale N.. (2013). *Microelectrode Biosensors*. Springer Protocols, 1, 3-25, 95-114.
- [9] Wang Joseph. (2008). *Electrochemical Glucose Biosensors*. *Chem. Rev.*, 108.
- [10] Toghil K. and Compton R. (2010). *Electrochemical Non-enzymatic Glucose Sensors: A Perspective and an Evaluation*. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 5, 1246 - 1301.
- [11] Zhu Z., Garcia-Gancedo L.. (2012). *A Critical Review of Glucose Biosensors Based on Carbon Nanomaterials: Carbon Nanotubes and Graphene*. *Sensors*, 12, 5996-6022.
- [12] Montenegro Irene; *Microelectrodes: Theory and Applications*; Springer Science .

- [13] López Jehú; Hautefeuille Mathieu. (2017). Use of a CD laser pickup head to fabricate microelectrodes in polymethylmethacrylate substrates for biosensing applications. *Biomedical Microdevices*.
- [14] D. Bronzino Joseph, R. Peterson Donald; *The Biomedical Engineering Handbook*; Tercera Edición; Capítulo 47 Biopotential electrodes; 2006.
- [15] G. Sreenivas, Simon S. Ang; *Fabrication and Characterization of Sputtered-Carbon Microelectrode Arrays*; *Anal. Chem.* 1996, 68, 1858-1864.
- [16] Chakraborty Suman. (2010). *Microfluidics and Microfabrication*. Springer.
- [17] Madou Marc J. (2011). *Fundamentals of Microfabrication: The Science of Miniaturization*. Vol1, Vol2, Vol3: CRC Press.
- [18] Rieutord, Michel. (2015). *Fluid Dynamics An Introduction*. Springer.
- [19] Lambert Pierre . (2014). *Surface Tension in Microsystems*. *Microtechnology and MEMS*. Springer..
- [20] Ng Lee J., Park C. (2003). Solvent Compatibility of Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices. *Anal. Chem.*, 75, 6544-6554.
- [21] Qin Dong , Xia Younan . (2010). Soft lithography for micro- and nanoscale patterning. *Nature Protocols*, 5, 491 - 502..
- [22] M. Hautefeuille, L. Cabriaes.(2013). New perspectives for direct PDMS microfabrication using a CD-DVD laser. *Lab on a Chip*, 13(24), 4848-4854 ..
- [23] Chia-Wen Tsao , Don L. DeVoe. (2009). Bonding of thermoplastic polymer microfluidics. *Microfluid Nanofluid*, 6, 1–16.
- [24] Daniel R. Thevenot, Klara Toth . (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors & Bioelectronics*, 16, 121–131.
- [25] L. Nelson, M. Cox. (2014). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Barcelona. OMEGA.
- [26] AR Teal and Dr PEO Wymer, *Guidance notes for Advanced Biology No.3 Enzymes and their Role in Biotechnology* (London: The Biochemical Society, 1995)..
- [27] Guckenberger .D, E. de. Groot T. (2015). Micromilling: a method for ultra-rapid prototyping of plastic microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 15, 2343–2524..

- [28] Haubert K., Drier T. (2006). PDMS bonding by means of a portable , low-cost corona system. *Lab on a Chip*, 6, 1548–1549.
- [29] Nam Sun Wang; Experiment No. 7C, Enzyme Immobilization Protocol, Entrapment in gelatin gel; Department of Chemical & Biomolecular Engineering; University of Maryland..
- [30] Torrijo Cabriaes Lucía; Estudio de la microestructuración del polidimetilsiloxano por grabado láser y sus aplicaciones. Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, 2015. Tesis Licenciatura.
- [31] Wang Joseph, Zhang Xueji. (2001). Needle-Type Dual Microsensor for the Simultaneous Monitoring of Glucose and Insulin. *Anal. Chem.*, 73, 844-847.
- [32] Jiménez Díaz Edgar A. Desarrollo de plataforma con microflujo para cultivo celular. Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, 2016. Tesis Licenciatura.
- [33] Sathish Babu Murugaiyan, Ramesh Ramasamy. (2014). Biosensors in clinical chemistry: An overview. *Adv Biomed Res*.