



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

Biosensores Electroquímicos con base en Transistores de Efecto de Campo

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

PRESENTA:
Bryan Emmanuel Alvarez Serna

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Roberto Giovanni Ramírez Chavarría
Instituto de Ingeniería, UNAM

Ciudad de México, Agosto, 2021



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.

Jurado asignado

Presidente: Dr. Juan Arnaldo Hernández Cordero.

Secretario: Dr. Oleg Viktorovich Kolokoltsev Filatov.

1er Vocal: Dr. Roberto Giovanni Ramírez Chavarría.

2do Vocal: Dr. Naser Qureshi.

3er Vocal: Dr. Pablo Roberto Pérez Alcázar.

Esta tesis se realizó en el Instituto de Ingeniería (II). Ciudad Universitaria, UNAM.

Director de tesis

Dr. Roberto Giovanni Ramírez Chavarría, II-UNAM

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo a las personas que me han acompañado y apoyado a lo largo de mi vida...

A Dios.

A mis papás...

Mamá, por todo tu amor, apoyo, esfuerzo y sacrificio. Por siempre apoyar mis planes y decisiones, por más locos que parezcan, siempre vez lo bueno en mí. Este logro también es tuyo, mamá, no estaría ni a la mitad de donde me encuentro sin ti.

Papá, por tu amor, sacrificio y por ser mi gran ejemplo de esfuerzo. Por todo tu apoyo y confianza durante estos años, este logro también es tuyo, papá, espero poder pagar un poco de lo mucho que me has dado.

Los amo, papás, siempre estaré muy agradecido con ustedes y con la vida por tenerlos.

A la memoria de mis abuelitos, Federico y Juan, siempre los tengo presentes.

A mis hermanos Lalo, Juan, Diego y Paulina, por los momentos y alegrías que me dan.

A mis primos, especialmente a Evelyn y Leo, por las aventuras y momentos que hemos compartido en los últimos años.

A mi familia, por su calidez, motivación y afecto.

A mis amigos, a quienes considero familia, por su lealtad y apoyo a través de los años.

Sinceramente, *Bryan*

Agradecimientos

Este logro es fruto del esfuerzo, constancia y sacrificio, afortunadamente, no sólo mío. Hay muchas personas e instituciones que me brindaron su apoyo durante el desarrollo de este trabajo; por ello, quiero agradecer a todos ellos...

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por la formación y oportunidades brindadas durante mi corta carrera. Por ser una maravillosa institución que cambió mi vida, permitiéndome crecer personal y profesionalmente.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ingeniería de la UNAM, por permitirme realizar mis estudios de maestría.

Al Instituto de Ingeniería de la UNAM, por la excelente infraestructura, servicios y apoyos brindados durante mis estudios. Especialmente, a la coordinación de Mecánica y Energía e Ingeniería Ambiental, por las facilidades brindadas.

Al Dr. Giovanni Ramírez, por permitirme desarrollar este tema de investigación, por su amistad, apoyo, confianza y consejos tanto profesionales como personales. Por haberme mostrado el mundo de la investigación con todos sus matices, lo que me permite mejorar y competir, día a día, en muchos aspectos personales y profesionales de mi vida.

A la Dra. Elizabeth Castillo, por su excelente calidad humana, amistad, ayuda, paciencia y conocimientos compartidos, sobre todo en la última etapa experimental de mi trabajo.

A mis sinodales, Dr. Juan Hernández, Dr. Oleg Kolokoltsev, Dr. Naser Qureshi y Dr. Pablo Pérez, por sus valiosas aportaciones al contenido de esta tesis, así como por su tiempo y esfuerzo invertido en la revisión del trabajo.

A mis profesores, con los que tuve la oportunidad de tomar clase durante la maestría, por su vocación y conocimientos compartidos.

A mi mejor amiga, Karina, por su invaluable amistad, por ser mi confidente y por todos sus consejos. Además, por siempre tener la paciencia y disposición de asesorarme en los temas de química que me permitieron mejorar este trabajo.

A la Universidad Estatal de Arizona, por permitirme participar en el SURI Program.

Al Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología de la UNAM, por los servicios brindados durante mis estudios.

A mis amigos de la Facultad de Ingeniería, que a pesar de los distintos caminos tomados, seguimos conservando la amistad y el buen humor.

A todas las personas que contribuyeron en mi formación profesional y personal, especialmente, a los que siempre confiaron en mí.

Esta tesis fue realizada gracias al apoyo de:

- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante el apoyo económico brindado durante los 24 meses de mis estudios de Maestría (CVU 1004078).
- Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) a través del proyecto UNAM-PAPIIT TA100221.

De verdad, gracias.
Bryan

“El único hombre que no se equivoca es el que nunca hace nada.”
- J.W. Goethe.

“Sometimes science is more art than science...”
- R&M.

Declaración de autenticidad

Por la presente declaro que, salvo que se haga referencia específica al trabajo de otras personas, el contenido de esta tesis es original y no se ha presentado total o parcialmente dentro de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Bryan Emmanuel Alvarez Serna. México, CDMX, 2021.

Resumen

Ante las múltiples enfermedades reemergentes y emergentes que existen a nivel mundial, los dispositivos de diagnóstico y monitoreo se han vuelto una necesidad. Una herramienta muy socorrida y útil son los biosensores, que son dispositivos que permiten cuantificar procesos biológicos y/o físicoquímicos. El gran atractivo de algunos biosensores es que pueden adoptar las características de un dispositivo de prueba en el punto de atención (POC: *point-of-care*), los cuales se destacan por su portabilidad, costo y capacidad de realizar mediciones *in situ*. Actualmente, los biosensores electroquímicos con base en transistores de efecto de campo (Bio-FET: *biological field-effect transistor*) son atractivos dispositivos capaces de cuantificar, principalmente, concentración de analitos en diversas aplicaciones biológicas, biomédicas y biotecnológicas. Sin embargo, ante el enorme avance tecnológico que vivimos día a día, existen diversos retos científicos y tecnológicos que deben ser abordados para obtener dispositivos Bio-FET confiables y robustos. Las principales tendencias de estos sensores, es el desarrollo de Bio-FET con nuevos materiales, la miniaturización y las potenciales aplicaciones. Por ello, los Bio-FET pueden marcar una revolución en el desarrollo de dispositivos POC que coadyuven en distintas áreas para resolver problemas biológicos, médicos, ambientales, industriales y del sector alimentario.

En este trabajo de tesis, se presenta el desarrollo de un Bio-FET que integra un transistor convencional y electrodos serigrafados, lo que permite obtener una estructura modular en los electrodos para múltiples aplicaciones sin alterar la estructura, y realizar mediciones de muestras microvolumétricas. Así como, un sistema de instrumentación diseñado desde un enfoque novedoso y accesible, contrario a lo convencional, que permite caracterizar al Bio-FET de manera simple. Lo que distingue a este sistema radica en que fue implementado sobre un dispositivo *Programmable System-on-Chip* (PSoC) que permite la configuración e implementación de *hardware* mediante *software*, en un mismo chip. Además, se presenta la metodología experimental para la preparación de muestras que se usaron para medir concentración de iones de hidrógeno, ácido ascórbico, glucosa, ferricianuro de potasio y azul de metileno. Finalmente, para todas las aplicaciones se muestra la metodología experimental, curvas de calibración, la comparación con una medición electroanalítica convencional, y una medición en el tiempo, con la finalidad de evaluar el comportamiento y desempeño del Bio-FET como sensor de concentración.

Abstract

Considering the multiple reemerging and emerging diseases that exist worldwide, diagnostic and monitoring devices have become a need. Biosensors are a very useful and helpful tool, which are devices to quantify biological or physicochemical processes. The main advantage of some biosensors is that they can adopt the characteristics of a point-of-care (POC) device, which we highlight for their portability, cost, and ability to make in situ measurements. Currently, Field-Effect-Transistor-based electrochemical biosensors (Bio-FET) are attractive devices to quantify, mainly, the concentration of analytes in biological, biomedical, and biotechnological applications. However, several scientific and technological challenges need to be addressed to obtain reliable and robust Bio-FET devices. The main trends of these sensors are the development of Bio-FET with new materials, miniaturization, and potential applications. Therefore, the Bio-FET can represent a revolution in the development of POC devices to help in different areas to solve biological, medical, environmental, industrial, and food issues.

This thesis introduces the development of a Bio-FET that integrates a conventional transistor and screen-printed electrodes, which allows a modular structure in the electrodes for multiple applications without altering the structure and perform measurements of micro-volumetric samples. On the other hand, we designed an instrumentation system designed from a novel and accessible approach, contrary to the conventional, which allows characterizing a Bio-FET in a simple form. Whatever distinguished this system is that it was implemented on a Programmable System-on-Chip (PSoC) device that allows the hardware configuration via software, within a single chip. Moreover, the work shows the experimental methodology for the preparation of samples that were used to measure the concentration of hydrogen ions, ascorbic acid, glucose, potassium ferricyanide, and methylene blue. Finally, for all applications, the experimental methodology, calibration curves, the comparison with a conventional electro-analytical measurement, and measurement in time are shown, with the purpose of evaluating the behavior and performance of the Bio-FET as a concentration sensor.

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras	II
Índice de tablas	VI
1. Introducción	3
1.1. Antecedentes y motivación	3
1.2. Planteamiento del problema	4
1.3. Contribución	5
1.4. Estructura de la tesis	5
2. Antecedentes	9
2.1. Biosensores electroquímicos	9
2.1.1. Amperométricos	11
2.1.2. Potenciométricos	13
2.1.3. Conductimétricos	13
2.2. Instrumentación electroquímica	14
2.2.1. Celdas electroquímicas	15
2.2.2. Circuito galvanostato	18
2.2.3. Circuito potencióstato	19
2.3. Técnicas electroanalíticas	20
2.3.1. Potenciometría de circuito abierto	21
2.3.2. Voltamperometría cíclica	22
2.3.3. Voltamperometría de onda cuadrada	25
2.3.4. Cronoamperometría	27
2.4. Transistor de efecto de campo	29
2.4.1. Transistor de efecto de campo metal-óxido-semiconductor	31
2.5. Biosensores FET	34
2.5.1. <i>Ion-sensitive</i> FET	35
2.5.2. <i>Chemical modified</i> FET	36
2.5.3. <i>Enzyme modified</i> FET	36

2.5.4. <i>Deoxyribonucleic acid</i> FET	37
2.5.5. <i>Organic</i> FET	38
2.5.6. <i>Extended gate</i> FET	39
3. Diseño experimental	41
3.1. Descripción funcional	41
3.2. Diseño del biosensor	42
3.2.1. Sistema de electrodos	43
3.2.2. Transistor MOSFET	44
3.3. Diseño del sistema de medición	45
3.4. Preparación de muestras	46
3.4.1. Preparación de <i>buffer</i>	46
3.4.2. Preparación de soluciones estándar	47
4. Resultados	51
4.1. Caracterización del sistema	52
4.2. Medición de iones hidrógeno	53
4.3. Medición de ácido ascórbico	57
4.4. Medición de glucosa	61
4.5. Medición de ferricianuro de potasio	64
4.6. Medición de azul de metileno	68
5. Conclusiones y perspectivas	73
Bibliografía	77

ÍNDICE DE FIGURAS

2.1. Esquema general de un biosensor.	9
2.2. Mecanismos de transporte de masa. (a) Difusión, (b) migración y (c) convección.	11
2.3. Conductividad específica κ en función de la concentración molar C , para HCl, NaOH y LiCl.	14
2.4. Estructura de un sistema de instrumentación electroquímico.	15
2.5. Interacción electrodo-electrolito y cambio del estado de oxidación de un ion A.	15
2.6. Esquema de una celda (a) galvánica y (b) electrolítica.	16
2.7. Esquema de una celda de tres electrodos.	17
2.8. Esquema del modelo de Helmholtz para explicar la doble capa eléctrica en una solución en contacto con un electrodo cargado positivamente.	18
2.9. Diagrama esquemático de un circuito galvanostato para celda de tres electrodos.	19
2.10. Diagrama esquemático de un circuito potencióstato para celda de tres electrodos.	20
2.11. Clasificación de las técnicas electroanalíticas.	21
2.12. Curva del potencial de circuito abierto en función del tiempo obtenido con la técnica de OCP.	22
2.13. Señal cuadrada de voltaje con 2 ciclos para voltamperometría cíclica.	23
2.14. Representación de un voltagrama para una reacción RedOx.	23
2.15. Efecto del valor del SR en las curvas obtenidas con CV.	24
2.16. Tipos de voltagramas obtenidos con CV para reacciones reversibles, cuasi-reversibles, irreversibles y sin reacción RedOx.	24
2.17. Señal de excitación para voltamperometría de onda cuadrada.	25
2.18. Representación de un voltagrama para una medición con SWV.	26
2.19. Efecto del valor de la frecuencia en las curvas obtenidas con SWV.	26
2.20. Tipos de voltagramas obtenidos con SWV para reacciones reversibles, cuasi-reversibles, irreversibles y sin reacción RedOx.	27
2.21. Señal de excitación para cronoamperometría.	28
2.22. Representación de la curva de corriente en función del tiempo para una medición con CA.	28
2.23. Efecto del valor del voltaje aplicado en las curvas obtenidas con CA.	29

2.24. Comportamiento de la corriente I en una reacción de reducción y oxidación con CA.	29
2.25. Esquema de la estructura general de un transistor FET.	30
2.26. Esquema de la estructura de un transistor MOSFET canal n	31
2.27. Efecto del voltaje V_{GS} en en MOSFET canal n . (a) Cuando $V_{GS} = 0$ V. (b) Cuando $V_{GS} > 0$	32
2.28. Efecto del voltaje V_{DS} sobre el ancho del canal, representado por el área sombreada, en un MOSFET canal n . (a) Cuando $V_{DS} < (V_{GS} - V_{th})$. (b) Cuando $V_{DS} > (V_{GS} - V_{th})$	33
2.29. Curvas características de un MOSFET canal n (a) Curva de salida de corriente I_{DS} en función del voltaje V_{DS} . (b) Curva de transferencia de corriente I_{DS} en función del voltaje V_{GS}	34
2.30. Esquema general de un biosensor FET.	34
2.31. Estructura de un <i>Ion-sensitive</i> FET.	35
2.32. Estructura de un <i>Chemical modified</i> FET.	36
2.33. Estructura de un <i>Enzyme modified</i> FET.	37
2.34. Estructura de un <i>Deoxyribonucleic acid</i> FET y proceso de hibridación. . . .	38
2.35. Estructura de un <i>Organic</i> FET.	38
2.36. Estructura de un <i>Extended gate</i> FET.	39
3.1. Representación esquemática general de la estructura del sistema y montaje experimental.	42
3.2. Esquema de la arquitectura general de un sensor EGFET.	42
3.3. Dimensiones del sistema de electrodos utilizado como elemento sensor.	43
3.4. Diagrama de bloques del sistema de instrumentación para un Bio-FET.	46
4.1. Caracterización del MOSFET canal n usando el sistema diseñado y una fuente de voltaje comercial. (a) Curvas de salida de la corriente I_{DS} en función del voltaje V_{DS} para diferentes valores de V_{REF} . (b) Curvas de transferencia de la corriente I_{DS} en función del voltaje V_{REF} para diferentes valores de V_{DS}	53
4.2. Resultados experimentales para la caracterización del Bio-FET de pH. (a) Curva de salida I_{DS} en función del voltaje V_{DS} , para los diferentes valores de pH y un valor fijo de V_{REF} . (b) Curva de calibración de la corriente I_{DS} en función del pH. (c) Curva de transferencia I_{DS} en función del voltaje V_{REF} para los diferentes valores de pH y un valor fijo de V_{DS} . (d) Curva de calibración para el voltaje V_{REF} en función del pH.	55
4.3. Resultados experimentales de mediciones de pH usando OCP. (a) Voltagrama para los diferentes valores de pH obtenidos como función del tiempo. (b) Curva de calibración de potencial debido al electrodo de referencia en función del pH.	56
4.4. Medición de pH en tiempo para evaluar la estabilidad del Bio-FET de pH diseñado.	57

4.5. Resultados experimentales para la caracterización del Bio-FET de AA. (a) Curva de salida I_{DS} en función del voltaje V_{DS} , para los diferentes valores de AA y un valor fijo de V_{REF} . (b) Curva de calibración de la corriente I_{DS} en función de AA. (c) Curva de transferencia I_{DS} en función del voltaje V_{REF} para los diferentes valores de AA y un valor fijo de V_{DS} . (d) Curva de calibración para el voltaje V_{REF} en función de AA.	59
4.6. Resultados experimentales de mediciones de concentración de AA usando CV. (a) Voltagrama para los diferentes valores de AA. (b) Curva de calibración de la corriente pico en función de AA.	60
4.7. Medición de concentración de AA en tiempo para evaluar la estabilidad del Bio-FET diseñado.	60
4.8. Resultados experimentales para la caracterización del Bio-FET de G. (a) Curva salida I_{DS} en función del voltaje V_{DS} , para los diferentes valores de G y un valor fijo de V_{REF} . (b) Curva de calibración de la corriente I_{DS} en función de G. (c) Curva de transferencia I_{DS} en función del voltaje V_{REF} para los diferentes valores de G y un valor fijo de V_{DS} . (d) Curva de calibración para el voltaje V_{REF} en función de G.	62
4.9. Resultados experimentales de mediciones de concentración de glucosa usando CA. (a) Voltagrama para los diferentes valores de G. (b) Curva de calibración de la corriente en función de G.	63
4.10. Medición de concentración de G en tiempo para evaluar la estabilidad del Bio-FET diseñado.	64
4.11. Resultados experimentales para la caracterización del Bio-FET de KF. (a) Curva de salida I_{DS} en función del voltaje V_{DS} , para los diferentes valores de KF y un valor fijo de V_{REF} . (b) Curva de calibración de la corriente I_{DS} en función de KF. (c) Curva de transferencia I_{DS} en función del voltaje V_{REF} para los diferentes valores de KF y un valor fijo de V_{DS} . (d) Curva de calibración para el voltaje V_{REF} en función de KF.	66
4.12. Resultados experimentales de mediciones de concentración de glucosa usando CV. (a) Voltagrama para los diferentes valores de KF. (b) Curva de calibración de la corriente pico en función de KF.	67
4.13. Medición de concentración de KF en tiempo para evaluar la estabilidad del Bio-FET diseñado.	68
4.14. Resultados experimentales para la caracterización del Bio-FET de MB. (a) Curva de salida I_{DS} en función del voltaje V_{DS} , para los diferentes valores de MB y un valor fijo de V_{REF} . (b) Curva de calibración de la corriente I_{DS} en función de MB. (c) Curva de transferencia I_{DS} en función del voltaje V_{REF} para los diferentes valores de MB y un valor fijo de V_{DS} . (d) Curva de calibración para el voltaje V_{REF} en función de MB.	70
4.15. Resultados experimentales de mediciones de concentración de glucosa usando SWV. (a) Voltagrama para los diferentes valores de MB. (b) Curva de calibración de la corriente pico en función de MB.	71
4.16. Medición de concentración de MB en tiempo para evaluar la estabilidad del Bio-FET diseñado.	71

ÍNDICE DE TABLAS

3.1. Material de los electrodos usados para las mediciones de concentración. . . .	44
3.2. Parámetros eléctricos del MOSFET canal n que se encuentra en el circuito integrado CD4007UB.	44
3.3. Pares ácido-base usados para preparación de soluciones <i>buffer</i>	47
3.4. Especies usados para la preparación de electrolitos soporte.	47
3.5. Especies usadas para la preparación de soluciones estándar.	48
4.1. Soluciones <i>buffer</i> preparadas para la caracterización del Bio-FET de pH. . .	54
4.2. Parámetros de la potenciometría de circuito abierto para medición de pH. . .	55
4.3. Sensibilidad (\mathcal{S}), coeficiente de determinación (r^2) y límite de detección (LD) de las mediciones de pH.	56
4.4. Soluciones preparadas para la caracterización del Bio-FET de AA.	57
4.5. Parámetros de la voltamperometría cíclica para medición de concentración de AA.	58
4.6. Sensibilidad (\mathcal{S}), coeficiente de determinación (r^2) y límite de detección (LD) de las mediciones de AA.	60
4.7. Soluciones preparadas para la caracterización del Bio-FET de G.	61
4.8. Parámetros de la cronoamperometría para medición de concentración de G. .	63
4.9. Sensibilidad (\mathcal{S}), coeficiente de determinación (r^2) y límite de detección (LD) de las mediciones de G.	64
4.10. Soluciones preparadas para la caracterización del Bio-FET de KF.	65
4.11. Parámetros de la voltamperometría cíclica para medición de concentración de KF.	67
4.12. Sensibilidad (\mathcal{S}), coeficiente de determinación (r^2) y límite de detección (LD) de las mediciones de KF.	67
4.13. Soluciones preparadas para la caracterización del Bio-FET de MB.	69
4.14. Parámetros de la voltamperometría de onda cuadrada para medición de concentración de MB.	69
4.15. Sensibilidad (\mathcal{S}), coeficiente de determinación (r^2) y límite de detección (LD) de las mediciones de MB.	71

En este capítulo se hace una revisión al estado del arte de los biosensores basados en transistores de efecto de campo en cuanto a la fabricación e instrumentación se refiere. Se plantea el problema que se aborda en el presente trabajo, enfatizando en las contribuciones tecnológicas y de aplicaciones. Por último, se presenta la organización del manuscrito.

1.1. Antecedentes y motivación

Un biosensor es un dispositivo capaz de medir parámetros biológicos y físico-químicos que ocurren en procesos fisiológicos, ambientales, industriales, entre otros [1]. El primer biosensor creado en 1962 era un sensor de concentración de oxígeno en sangre, llamado electrodo de Clark en honor a su inventor, lo que motivó el desarrollo y estudio de estos sensores que en la actualidad es un área con infinidad de aplicaciones y campos de estudio. El atractivo tecnológico de los biosensores radica en su alto desempeño, capacidad de proveer alta sensibilidad, estabilidad y capacidad de realizar mediciones en un corto periodo de tiempo [2]. Dentro la extensa revisión al estado del arte se encuentran diferentes tipos de biosensores [3], para este trabajo solo se mencionarán los usados para medir concentración. La medición de concentración permite caracterizar, cuantitativa y cualitativamente, a una disolución acuosa detectando iones o biomoléculas específicas como: iones de metales pesados generados por contaminación que son nocivos a la salud [4], iones presentes en procesos bioquímicos del organismo humano como sodio Na [5], potasio K [6]; enzimas como glucosa [7], material genético [8], por mencionar sólo algunas. Particularmente, respecto a biosensores que miden la concentración de un analito es posible encontrar distintos mecanismo de transducción [9-11], por ejemplo, usando óptica [12], radio frecuencia [13], microondas [14], magnetismo [15], electroquímica [16], por mencionar los más encontrados en la literatura.

En este trabajo, bajo la filosofía de desarrollar dispositivos de prueba en el lugar de asistencia (POC: *point-of-care*) por las prestaciones que ofrece como dispositivo bioelectrónico [17], se plantea una solución novedosa usando transducción electroquímica mediante el

diseño de biosensores con base en transistores de efecto de campo, conocidos como Bio-FET (*Biological field-effect transistor*). Este tipo de dispositivos funcionan mediante elementos sensibles como lo son electrodos o membranas que en interacción con el analito generan una respuesta eléctrica ocasionada por reacciones químicas; este elemento sensible es embebido a la entrada de un transistor FET para hacer la transducción por el efecto de campo. Esto permite que los Bio-FET transformen directamente información bioquímica en señales eléctricas que modifican el estado de conducción del transistor FET [18]. Actualmente, los Bio-FET son un área de vanguardia en la que la comunidad científica ha centrado su atención y esfuerzo, principalmente, al diseño y desarrollo de sistemas considerando, esencialmente, dos áreas de estudio: i) diseño de Bio-FET con énfasis en los materiales sensibles y en las dimensiones del sensor, buscando la mayor integración y portabilidad posible; y ii) desarrollo sistemas de medición para Bio-FET buscando instrumentación relativamente simple, robusta y portable.

Entre las aplicaciones principales de los Bio-FET, se encuentran, mediciones de pH [19], determinación de la concentración de enzimas como glucosa [20], detección de moléculas biológicamente compatibles [21], detección y cuantificación de material genético [22], monitorización de agente patógenos [23], y el sensado de gases nocivos contra la salud [24], por mencionar sólo algunas. Sin embargo, los sistemas de medición en dichas aplicaciones requieren, en su mayoría, equipos robustos de laboratorio, como fuentes de voltaje y multímetros digitales programables [25], limitando así las capacidades de desarrollo de dispositivos POC y aplicaciones fuera de un laboratorio.

Por otro lado, se han desarrollado algunos sistemas con base en dispositivos digitales programables. Especialmente, el uso de circuitos electrónicos complementarios muestra la versatilidad y viabilidad de integrar un Bio-FET con un circuito microelectrónico. Por ejemplo, se pueden encontrar circuitos convertidores de señal para procesar la señal del biosensor [26]. Además, se han reportado sistemas de medición que integran arreglos de transistores [27] o circuitos de propósito específico [28].

1.2. Planteamiento del problema

El estudio y desarrollo de Bio-FET, es un área que continúa en crecimiento, por tanto, existen diversos retos que deben ser atendidos para garantizar reproducibilidad en los experimentos, minimizar las fuentes de error en los resultados y maximizar su desempeño, para generar dispositivos POC confiables y eficaces [29]. Más aún, la naturaleza de los Bio-FET, implica lidiar con aspectos como la respuesta del sensor, su sistema de instrumentación en el que está integrado y la propia experiencia del experimentador. Por ello, se requieren nuevos sistemas de medición que faciliten la integración, sean accesibles, portables y que permitan una adquisición de datos simple, conservando la robustez y confiabilidad de las mediciones.

Dicho esto, el problema abordado en el presente trabajo se formula de acuerdo a los siguientes tres puntos: i) desarrollar un Bio-FET con base en un transistor convencional que sea de bajo costo, portable y escalable; además, que sea modular en los electrodos, es decir, se puedan usar electrodos de diferentes materiales, ii) diseñar un sistema de instrumentación para la caracterización del biosensor con base en un dispositivo programable que sea de

hardware mínimo, accesible y de *software* abierto, para que pueda ser replicable; finalmente, iii) hacer mediciones de concentración, en muestras microvolumétricas, y comparar el funcionamiento del biosensor con técnicas electroanalíticas convencionales, con el fin de evaluar su funcionamiento y desempeño.

1.3. Contribución

La contribución de este trabajo radica en el diseño de un Bio-FET con una integración de una manera más simple a lo convencional y modular en los electrodos sensibles, que permite mediciones de concentración en muestras microvolumétricas; y un sistema de instrumentación novedoso y accesible para la caracterización de Bio-FET. Adicionalmente, se propone la medición de concentración de catalizadores, ferricianuro de potasio y azul de metileno, usando Bio-FET, que hasta donde se tiene conocimiento, es una iniciativa propia y que tiene gran potencial en aplicaciones biológicas.

A continuación se presenta una lista de publicaciones realizadas durante el desarrollo de este trabajo.

- **B.E. Alvarez-Serna** y R.G. Ramírez-Chavarría, “EGFET-based pH Sensor integrated with a Low-cost Screen-printed Electrode System,” *Journal of Physics: Conference Series*, vol. 1723, n.º 1, pág. 012024, 2021.
- R.G. Ramírez-Chavarría, **B.E. Alvarez-Serna**, M. Schoukens y L. Alvarez-Icaza, “Data-driven Modeling of Impedance Biosensors: A Subspace Approach,” *Measurement Science and Technology*, vol. 32, n.º 10, pág. 104009, 2021.
- **B.E. Alvarez-Serna**, R.G. Ramírez-Chavarría y E. Castillo-Villanueva, “Mod-FET: A Modular EGFET-based Biochemical Sensor Platform for Analytical Applications,” *To be published Talanta*, 2021.
- T. Lozano-Herrera, **B.E. Alvarez-Serna**, C.G. Villanueva-Ibarra, D.A. Arcos-Santiago, R.F. Padilla-Morán y R.G. Ramírez-Chavarría, “Affordable current source for bioimpedance measurement systems with limited resources,” *Under review*, 2021.
- R.G. Ramírez-Chavarría y **B.E. Alvarez-Serna**, “Biosensores electrónicos con dispositivos de efecto de campo: Fundamentos y aplicaciones,” *Gaceta del Instituto de Ingeniería, UNAM*, n.º 146, pág. 15, 2021.

1.4. Estructura de la tesis

Este trabajo se encuentra dividido en cinco capítulos, incluyendo el presente.

En este Capítulo 1, Introducción, se aborda la motivación y antecedentes que impulsaron al desarrollo de este trabajo. Con base en ello, se plantea la problemática a resolver y las contribuciones que generó este trabajo de investigación.

El Capítulo 2, Antecedentes, contiene los conceptos y preceptos necesarios para entender el contenido del trabajo, se abordan las definiciones y principios físicos más importantes, así como las técnicas de instrumentación electroanalíticas y diferentes estructuras de biosensores con base en transistores de efecto de campo.

Posteriormente, el Capítulo 3, Diseño experimental, presenta el desarrollo del biosensor diseñado, en donde se muestra el tipo de transistor usado como elemento de transducción y los distintos electrodos usados en este trabajo. Además, se muestra el desarrollo del sistema de instrumentación con todos sus elementos que lo componen. Por último, se muestra la metodología experimental para preparar las diferentes muestras usadas.

Por otra parte, en el Capítulo 4, Resultados, se muestran los resultados experimentales obtenidos con el biosensor y sistema de medición diseñados, así como los obtenidos con las técnicas electroanalíticas convencionales usando un circuito potenciostato. Se muestra el proceso de calibración y evaluación de confiabilidad, para el Bio-FET como sensor de concentración para soluciones de diferentes especies químicas.

Finalmente, se presenta el Capítulo 5, Conclusiones y perspectivas, dedicado a las conclusiones obtenidas de este trabajo, así como al trabajo a futuro inmediato de este tema de investigación.

Establecidos los antecedentes y motivaciones que llevaron al desarrollo de este trabajo, en el siguiente capítulo se introduce al lector a los conceptos y bases teóricas, con el fin de dar un marco de referencia que sustente la metodología que se usó para el diseño de un Bio-FET, y su respectivo sistema de instrumentación, bajo una filosofía innovadora, accesible y vanguardista.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

Este capítulo presenta los conceptos teóricos necesarios para comprender este trabajo. Se plantean conceptos fundamentales para entender los fenómenos electroquímicos, las técnicas electroanalíticas implementadas y el funcionamiento del biosensor FET diseñado.

2.1. Biosensores electroquímicos

Un biosensor es un dispositivo capaz de medir parámetros biológicos y físico-químicos que ocurren en diversos procesos fisiológicos [30]. La estructura general de un biosensor está formada por los elementos mostrados en la Figura 2.1.

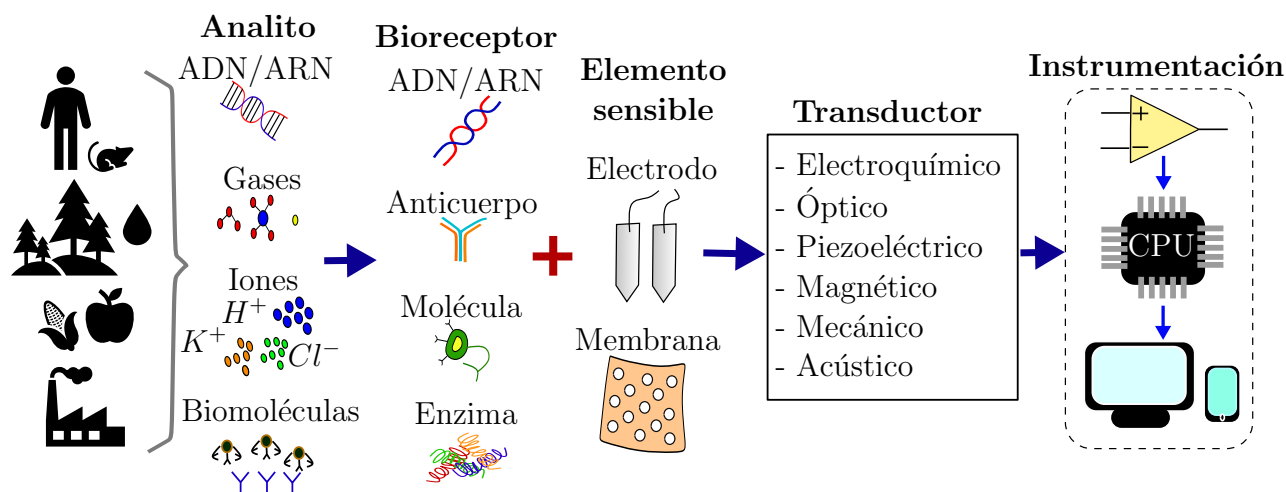


Figura 2.1: Esquema general de un biosensor.

Dichos elementos tienen las siguientes funciones específicas dentro de un biosensor.

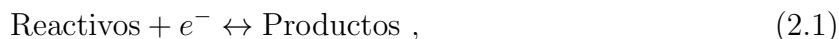
- **Analito:** Es la muestra que contiene iones, microorganismos o biomoléculas que requieren ser detectadas cualitativa y/o cuantitativamente. Y que puede ser una muestra

obtenida de un proceso animal, humano, ambiental, industrial, entre otros.

- **Bioreceptor:** Sirve para dar especificidad a un biosensor, la cual se logra con la interacción que ocurre entre el analito y el bioreceptor. Generalmente, un bioreceptor, puede ser un anticuerpo, enzima, proteína, célula, material genético, por mencionar algunos.
- **Elemento sensible:** Es un electrodo o membrana selectiva que permite detectar los procesos fisicoquímicos, para transmitirlo al transductor.
- **Transductor:** Convierte la detección del elemento sensible en una señal medible, típicamente eléctrica. El mecanismo de transducción puede ser electroquímico, óptico, piezoeléctrico, magnético, mecánico, acústico, entre otros.
- **Instrumentación:** Es la sección encargada de acondicionar, digitalizar y procesar la señal, para guardar y enviar datos que permitan establecer una relación entre las características de la señal con el analito estudiado.

Como se menciona, existen diferentes mecanismos de transducción, pero por los parámetros de diseño especificados en este trabajo, se hará énfasis sólo en la transducción electroquímica.

La electroquímica es la rama de la físico-química que estudia los procesos en las interfases relacionados con la transferencia de carga, y se expresa típicamente con la siguiente expresión



considerando a los Reactivos como sustancias que se unen o separan para formar los Productos, mediante un intercambio de electrones [31]. Un proceso electroquímico se presenta por una reacción óxido-reducción (RedOx), la cual es una reacción de transferencia de electrones. En electroquímica, una reacción RedOx puede generar energía eléctrica debido a una reacción química, o viceversa. En una reacción RedOx los electrones que se transfieren de una especie que se oxida (A), llamada reductora, a una que se reduce (B), llamada oxidante, se pueden clasificar en función de la ganancia o pérdida de estos electrones, i.e.:

- Reducción: $A + ne^- \rightarrow A^{n-}$.
- Oxidación: $B - ne^- \rightarrow B^{n+}$.

La transducción electroquímica permite implementar, físicamente, experimentos con muestras microvolumétricas, dispositivos compactos e instrumentación mínima, por ello, los biosensores que usan esta transducción, pueden tener características de portabilidad, escalabilidad, bajo costo y una estructura modular. Un biosensor electroquímico funciona mediante la interacción electroquímica del analito con los electrodos, es decir, la relación entre los parámetros químicos con la modificación de intensidad de corriente, diferencia de potencial o conductancia eléctrica [32]. Por ello, estos biosensores proveen una forma cuantitativa y cualitativa de

detectar procesos biológicos y bioquímicos de una forma directa. Además, de que el uso de tales dispositivos tienen un amplio campo de aplicaciones, biológicas, biomédicas, ambientales e incluso industriales.

Basado en la técnica de medición utilizada para obtener la información del analito, los biosensores electroquímicos se pueden clasificar como:

- **Amperométricos:** Cuando la reacción genera una corriente medible.
- **Potenciométricos:** Donde se mide una diferencia de potencial eléctrico debido a una acumulación de carga.
- **Conductimétricos:** Cuando se mide el cambio de conductividad del analito.

2.1.1. Amperométricos

Los biosensores amperométricos miden la corriente producida por los procesos de una reacción RedOx al aplicar un potencial constante. Esta técnica de medición permite establecer una relación entre la corriente medida en función de la concentración de un analito.

En los biosensores amperométricos se emplean típicamente dos electrodos, el de trabajo (WE: *working electrode*) y el de referencia (RE: *reference electrode*). En el RE es donde se aplica el potencial constante sobre el analito, y en el WE se produce una corriente eléctrica que es medida bajo condiciones controladas de tiempo, valor del potencial, temperatura, presión, entre otras. Finalmente, se asocia la magnitud de la corriente medida a la concentración del analito bajo estudio [33]. El principio de operación de estos sensores se basa en el fenómeno de transferencia de masa, el cual puede ser descrito con los siguientes tres comportamientos, que se muestran en la Figura 2.2.

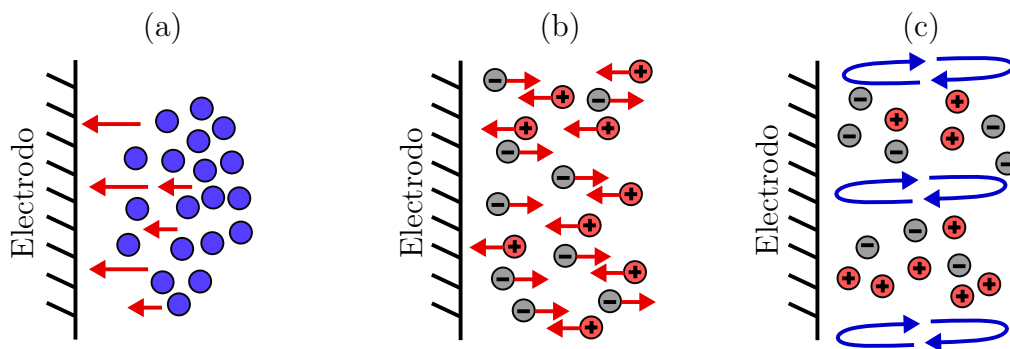


Figura 2.2: Mecanismos de transporte de masa. (a) Difusión, (b) migración y (c) convección.

Difusión: Es el movimiento de las especies debido a un gradiente de concentración, en el cual, la materia se transporta de una región con mayor concentración hacia una de menor concentración para terminar en un estado homogéneo, este mecanismo se muestra en la Figura 2.2(a).

Migración: En la Figura 2.2(b) se muestra este mecanismo, que ocurre cuando los iones con carga eléctrica son transportados mediante un campo eléctrico.

Convección: Cuando el transporte de las especies se hace por un movimiento físico asociado a la agitación, giro o vibración de la solución y/o electrodo, como se muestra en la Figura 2.2(c).

El transporte de masa puede ser cuantificado mediante el flujo (J), que es una medida de la velocidad del transporte de masa en un punto fijo, y que se puede representar mediante la siguiente expresión, conocida como ecuación de Nernst-Planck

$$J(x, t) = -D \frac{\partial C(x, t)}{\partial x} - \frac{zDFC}{RT} \frac{\partial \phi(x, t)}{\partial x} + C(x, t)V(x, t) , \quad (2.2)$$

que indica que el flujo de materia J tiene unidades de ($\text{mol s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), y que se conforma por los aportes de cada mecanismo de transporte; en primer lugar, está el termino debido al transporte por difusión que presenta un coeficiente de difusión D , propio de cada especie, y el gradiente de concentración a una distancia x en un tiempo t , $\frac{\partial C(x, t)}{\partial x}$. En segundo lugar, el termino asociado al transporte por migración, el cual contempla la carga z y concentración C de la especie, la constante de Faraday F , la constante de los gases ideales R , la temperatura T y el gradiente de potencial $\frac{\partial \phi(x, t)}{\partial x}$. Finalmente, la contribución por convección se representa con la concentración en una distancia x a un tiempo t , $C(x, t)$, y por la velocidad hidrodinámica en dirección de x , $V(x, t)$.

La corriente que se genera (i), está relacionada con el flujo J y el área del electrodo (A), y se puede expresar como

$$i = -nFAJ(x, t) , \quad (2.3)$$

en donde n es el número de electrones intercambiados. Es complejo relacionar la corriente i directamente con la concentración C de una solución. Por ello, experimentalmente, se pueden minimizar, considerablemente, los efectos de migración y convección, para que la corriente i sea función únicamente de la difusión. La migración es minimizada al usar un electrolito soporte, el cual es una sal iónica que reduce el campo eléctrico aumentando la conductividad de la solución. Por otro lado, la convección se minimiza, al máximo, manteniendo estático el sistema experimental y la solución. Con estas condiciones, la corriente i puede ser descrita como

$$i = nFAD \frac{\partial C(x, t)}{\partial x} . \quad (2.4)$$

Finalmente, la corriente es proporcional al gradiente de concentración de una solución. La magnitud de corriente que se genera es suficiente, para usar instrumentación simple. Lo que permite que los biosensores amperométricos sean accesibles, portables y una herramienta robusta. Sin embargo, este tipo de biosensores presentan desventajas como un rango lineal de operación corto, baja relación señal a ruido e inestabilidad en las mediciones [34].

2.1.2. Potenciométricos

Este tipo de biosensores se basa en la medición de una diferencia de potencial eléctrico entre un electrodo WE y un RE, en circuito abierto, lo cual establece, idealmente, que la corriente total $i_T = 0$. La corriente i_T está formada por la corriente anódica y catódica, producidas por oxidación y reducción, respectivamente. La corriente i_T se relaciona con el potencial E , mediante la ecuación de Eyring, dada por

$$i_T = nFAk_0 \left(C_{\text{Ox}} \left[e^{\left(\frac{-\alpha nF}{RT}(E-E_0)\right)} \right] - C_{\text{Red}} \left[e^{\left(\frac{(1-\alpha)nF}{RT}(E-E_0)\right)} \right] \right), \quad (2.5)$$

que modela una reacción de transferencia de n electrones en un electrodo con área A , contemplando la constante de Faraday F , la constante estándar de velocidad de transferencia de carga k_0 , la concentración del oxidante C_{Ox} y reductor C_{Red} , la constante de los gases ideales R , la temperatura T , el coeficiente de transferencia de electrones α , el potencial estándar del electrodo E_0 y el potencial aplicado E .

En condición de equilibrio, cuando la corriente anódica es igual a la catódica ($i_T = 0$), y despejando E de la Ecuación 2.5, el potencial E se puede relacionar con la concentración de la solución mediante la siguiente expresión, llamada ecuación de Nernst

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{C_{\text{Ox}}}{C_{\text{Red}}} \right). \quad (2.6)$$

Los sistemas que siguen el comportamiento descrito por la ecuación de Nernst (Ecuación 2.6), son considerados sistemas que generan una reacción electroquímica reversible o nernstiana. Una reacción reversible, es aquella en la que los reactivos se convierten en productos, y viceversa; es decir, es una reacción que ocurre en ambos sentidos.

Los biosensores potenciométricos son ideales para medir concentraciones bajas en muestras microvolumétricas, ya que no influyen químicamente en la muestra, además, presentan ventajas como alta sensibilidad y bajo límite de detección en aplicaciones biológicas. Sin embargo, la estabilidad y reproducibilidad siguen siendo las principales desventajas de estos [35].

2.1.3. Conductimétricos

Miden la conductividad eléctrica de un analito, que es la capacidad para transportar carga eléctrica. Para evaluar la conductividad de una solución, se puede utilizar corriente directa (DC: *direct current*) o corriente alterna (AC: *alternating current*). En DC existe el problema de polarización de cargas, lo cual genera una resistencia adicional a la del analito; por otro lado, con AC se evita la polarización ya que la corriente se invierte alternadamente.

La conductividad específica, κ , es la métrica para indicar la capacidad de la sustancia de transportar carga eléctrica, y presenta una relación directa con la concentración C . Sin embargo, la κ presenta una disminución a concentraciones muy elevadas, debido a la formación de pares iónicos. En la Figura 2.3 se muestra como varía κ en función de la concentración, para algunos compuestos como ácido clorhídrico (HCl), hidróxido de sodio (NaOH) y cloruro de litio (LiCl), y se señala el decaimiento de κ cuando se forman los pares iónicos a concentraciones elevadas [31].

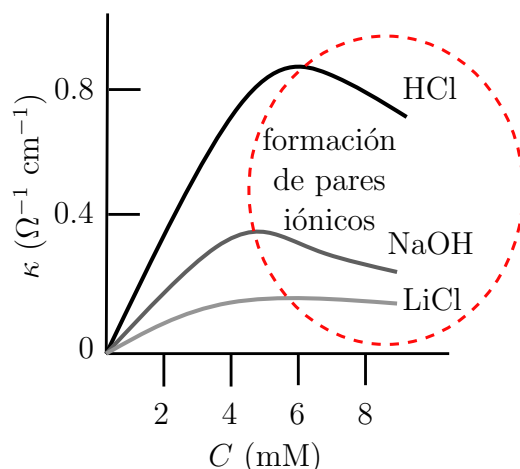


Figura 2.3: Conductividad específica κ en función de la concentración molar C , para HCl, NaOH y LiCl.

La relación que existen entre κ y C se establece mediante la conductividad molar (Λ), que define la conductividad por unidad de concentración mediante la siguiente ecuación

$$\Lambda = \frac{\kappa}{C} . \quad (2.7)$$

Estos sensores son muy utilizados para estudiar reacciones enzimáticas, y detección complementaria de pares anticuerpo-antígeno, drogas en orina humana, agentes contaminante en muestras ambientales, entre otras. Sin embargo, están limitadas en aplicaciones donde se requiere medir concentraciones elevadas, ocasionando que estos sensores tengan un rango dinámico limitado [36].

2.2. Instrumentación electroquímica

Actualmente, muchos de los métodos electroanalíticos requieren infraestructura grande y técnicas que sólo pueden ser efectuadas en laboratorios especializados con equipo sofisticado, voluminoso y costoso. Por ello, una de las áreas más exploradas en la actualidad es la instrumentación electroquímica, que consiste en generar sistemas de instrumentación que permitan aprovechar las ventajas de la transducción electroquímica. Estas ventajas de bajo costo, miniaturización, portabilidad, accesibilidad, por mencionar algunas, son muy atractivas para dispositivos de prueba en el lugar de asistencia (POC: *point-of-care*) que permiten mediciones *in situ*, con muestras microvolumétricas, son accesibles, entre otras [37].

Los sistemas de instrumentación electroquímicos buscan controlar y monitorear reacciones químicas debidas a un potencial eléctrico o viceversa. En la Figura 2.4 se muestra la estructura de un sistema de instrumentación electroquímico que requiere un generador de señal (GS) conectado a un circuito de acondicionamiento (CG) para estimular un analito y generar una reacción química. Dicha reacción es medida con un circuito de medición (CM) y un bloque de procesamiento de las señales (PS), para caracterizar de manera cuantitativa y cualitativa al analito.

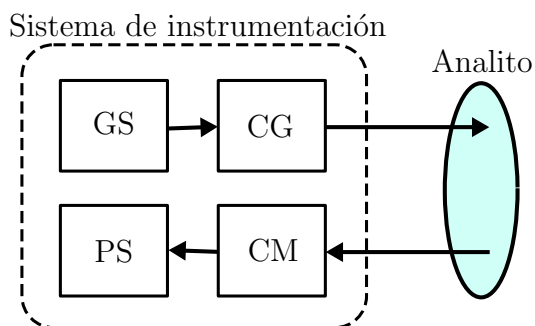


Figura 2.4: Estructura de un sistema de instrumentación electroquímica.

Para interactuar con el analito, generalmente, se usan electrodos fabricados de algún material conductor. Los métodos convencionales se basan en celdas electroquímicas y circuitos electrónicos que permiten caracterizar analitos mediante los procesos electroquímicos que se generan en éstos.

2.2.1. Celdas electroquímicas

Experimentalmente los procesos electroquímicos son observados a través de una celda electroquímica, que se define como dos electrodos separados por un electrolito. Los electrodos son elementos conductores que permiten conducir carga eléctrica y que se pueden representar como



en donde M es el material conductor del electrodo, la línea vertical | indica un cambio de fase, Red y Ox la forma reducida u oxidada de la especie química. En la Figura 2.5 se muestra el proceso electrodo-electrolito, en donde se muestra que un electrodo polarizado hace cambiar el estado de oxidación de un ion A mediante una reacción del tipo

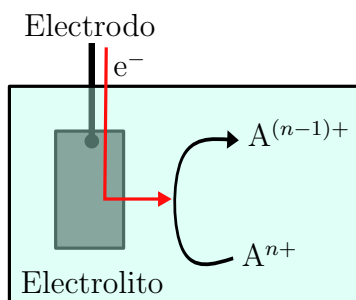


Figura 2.5: Interacción electrodo-electrolito y cambio del estado de oxidación de un ion A.

En la Figura 2.6 se muestran los dos tipos de celdas electroquímicas, éstas se pueden clasificar como galvánica o electrolítica según su comportamiento.

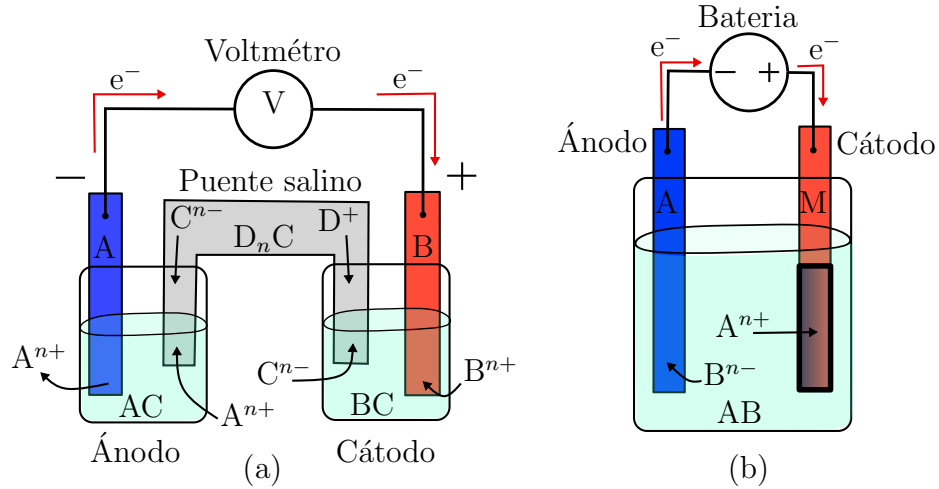
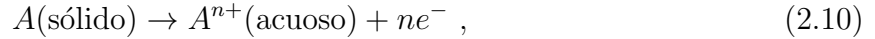


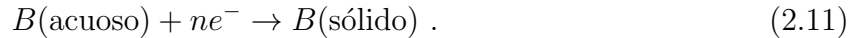
Figura 2.6: Esquema de una celda (a) galvánica y (b) electrolítica.

Una celda galvánica, que se muestra en la Figura 2.6(a), se compone de dos semiceldas que contienen soluciones acuosas AC y BC; en la solución AC se encuentra inmerso un electrodo de material A y en la BC un electrodo de material B; ambas semiceldas se unen mediante un puente salino que contiene una sal D_nC que tiene como función evitar la mezcla entre AC y BC, pero también permite la conductividad iónica mediante el intercambio de iones C^{n-} y D^+ , finalmente la diferencia de potencia es medida con un voltímetro.

El electrodo en donde ocurre el proceso de oxidación se denomina ánodo, y se describe como



y en su contraparte, en el electrodo llamado cátodo ocurre la reacción de reducción dada por



El potencial de la celda (E_{celda}) se define como la diferencia entre el potencial del cátodo, $E_{\text{cátodo}}$, y del ánodo, $E_{\text{ánodo}}$, i.e.

$$E_{\text{celda}} = E_{\text{cátodo}} - E_{\text{ánodo}}. \quad (2.12)$$

Por otro lado, la Figura 2.6(b) muestra una celda electrolítica, en la cual la reacción química se lleva a cabo por la imposición de un potencial eléctrico externo (batería), aunque, es posible imponer una corriente como señal de excitación. Esta configuración experimental también se conoce como baño electrolítico, el cual consiste en generar una capa que galvanice al cátodo para protegerlo, principalmente, de la corrosión [38]. Una celda electrolítica tiene dos electrodos, ánodo y cátodo, inmersos en una celda que contiene una solución acuosa AB; el cátodo es un electrodo de material metálico M y el ánodo un electrodo de material A. La reacción química provocada por el potencial de la batería hace que la solución AB se separe en catión (A^{n+}) y anión (B^{n-}); finalmente el catión A^{n+} se deposita sobre la superficie del cátodo formando un recubrimiento.

Estos dos tipos de celda mencionadas representan múltiples ventajas, principalmente, en su tamaño y que la reacción química sólo se puede monitorear o controlar. Por ello, es que se emplea una celda de tres electrodos para controlar y monitorear la reacción electroquímica. Las celdas de tres electrodos están formadas por un electrodo de referencia (RE), un auxiliar (AE) y uno de trabajo (WE), tal como se muestra en la Figura 2.7.

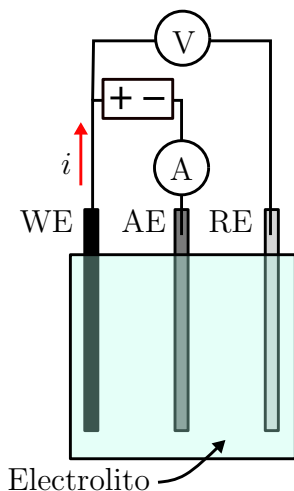


Figura 2.7: Esquema de una celda de tres electrodos.

Los electrodos de esta celda tienen una función específica para controlar y monitorear la reacción electroquímica del analito [31], i.e.

Electrodo de referencia (RE): Su función es fijar la variación de los parámetros que se imponen para generar la reacción electroquímica. Por ello, este electrodo debe ser de un material conocido y químicamente estable, que mantenga el parámetro de excitación constante. Así, cualquier variación en la celda se le atribuye directamente al WE. En resumen, el RE sirve para controlar el potencial del WE, en donde observamos los cambios de potencial o corriente que permiten caracterizar un analito.

Electrodo auxiliar (AE): Sirve, principalmente, para cerrar el circuito eléctrico de la celda. Además, en el AE es donde ocurre el proceso electroquímico que puede ser cuantificado mediante la corriente que circula por él, y que es un proceso opuesto al que pasa en el WE.

Electrodo de trabajo (WE): En este electrodo se impone un potencial o corriente, con el fin de caracterizar al analito mediante el monitoreo de las reacciones electroquímicas que ocurren en éste.

Con este tipo de celda es posible controlar y monitorear los procesos que ocurren antes, durante y posterior a la reacción electroquímica. Estos procesos involucran las reacciones producidas en la interfase electrodo-electrolito, reacciones RedOx, disociación e intercambio de electrones. Sin embargo, al aplicar una diferencia de potencial en los electrodos, éstos se polarizan, y acumulan una carga en su superficie debido a la existencia de un campo

eléctrico, este fenómeno se conoce como doble capa eléctrica. En la Figura 2.8 se muestra el modelo de Helmholtz, que permite explicar el fenómeno de doble capa eléctrica. En dicha figura se muestra un electrodo cargado positivamente, que acumula una carga negativa sobre su superficie, esto hace que los iones de carga negativa sean repelidos y los de carga positiva atraídos. Los iones de carga positiva, cationes, se aproximan a una distancia d del electrodo. La distancia d separa los planos interno (PIH) y externo (PEH) de Helmholtz, en dicho plano la interfase se comporta como un capacitor. La separación de los iones se hace por medio de las moléculas de solvatación, que son las moléculas de disolvente que se disocian. El fenómeno de doble capa eléctrica hace que el potencial entre electrodos sea variable, en el plano de Helmholtz, esto depende de la distancia d y de la concentración de la especie. Fuera del plano de Helmholtz se conoce como capa difusa, en donde no ocurre el fenómeno de doble capa eléctrica y el potencial permanece constante.

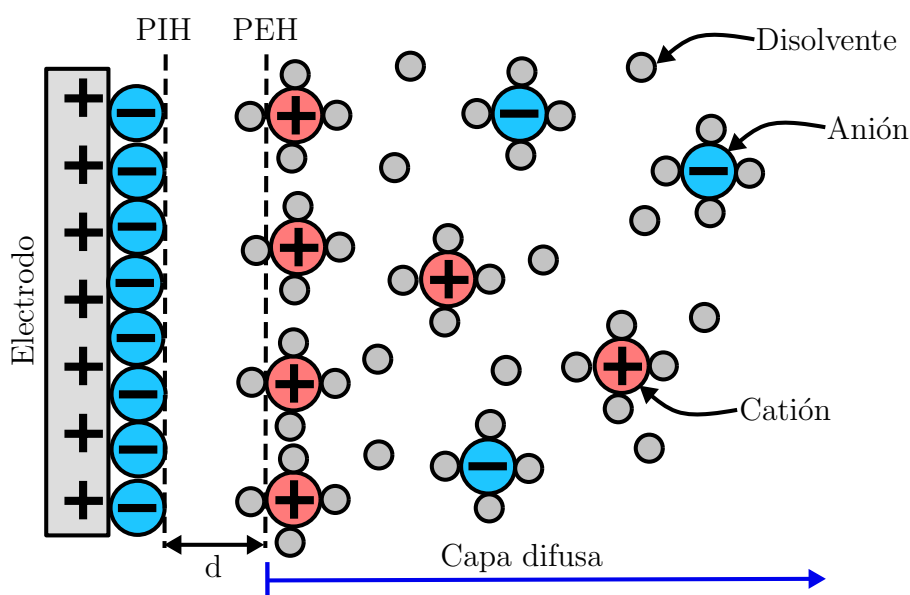


Figura 2.8: Esquema del modelo de Helmholtz para explicar la doble capa eléctrica en una solución en contacto con un electrodo cargado positivamente.

2.2.2. Circuito galvanostato

También conocido como amperostato, debido que permite aplicar una señal de corriente al analito, que se encuentra sobre una celda electroquímica de tres electrodos, y obtener una diferencia de potencial como respuesta. Dicho circuito permite caracterizar muestras microvolumétricas con una celda electroquímica de tres electrodos [39]. En la Figura 2.9 se muestra un circuito galvanostato, para una celda electroquímica con tres electrodos, de referencia (RE), auxiliar (AE) y de trabajo (WE). Dicho circuito funciona de la siguiente manera:

1. Se aplica un voltaje V_i por medio de una resistencia R por la entrada inversora del amplificador (CC) que permite convertir V_i a una corriente I_{in} , la corriente I_{in} se aplica

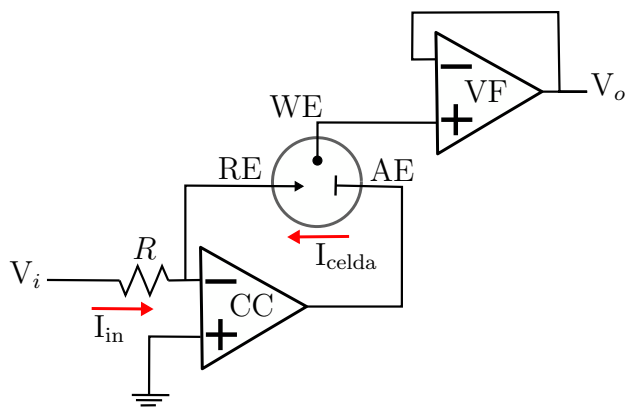


Figura 2.9: Diagrama esquemático de un circuito galvanostato para celda de tres electrodos.

por medio del electrodo RE, dicha corriente es proporcional al voltaje de entrada V_i y se expresa como

$$I_{in} = \frac{-V_i}{R} . \quad (2.13)$$

2. El electrodo AE cierra el circuito en la celda.
3. Del electrodo AE al electrodo RE circula la corriente de celda I_{celda} que genera un potencial sobre el electrodo de trabajo WE. La corriente I_{celda} es igual a

$$I_{celda} = I_{in} . \quad (2.14)$$

4. Finalmente, a la salida de un seguidor de voltaje (VF) se mide el voltaje del electrodo WE referido al electrodo RE (V_o), el cual corresponde a la respuesta del analito generada por la corriente I_{in} .

2.2.3. Circuito potencioestado

El potencioestado es un circuito ampliamente utilizado para aplicaciones electroquímicas, debido a su mayor simplicidad en cuanto control de la señal de entrada. Para muestras microvolumétricas se emplea una celda de tres electrodos, de referencia (RE), auxiliar (AE) y de trabajo (WE), además que permite aplicar distintas técnicas electroquímicas [40]. La Figura 2.10 muestra el diagrama de un circuito potencioestado para mediciones electroquímicas, el cual funciona de la siguiente manera.

1. Se aplica un voltaje V_i en la terminal no inversora del amplificador de control CA.
2. En la terminal inversora del CA se conecta el electrodo RE, el cual mide la diferencia de potencial V_{WR} entre el electrodo WE y el electrodo RE.
3. El CA compara el voltaje V_{WR} con el voltaje de la entrada V_i , para hacer que sean iguales.

4. El voltaje aplicado en el electrodo AE es el necesario, para compensar las caídas de potencial en el electrodo WE.
5. La corriente I que fluye por el analito colocado en la celda electroquímica se mide con el electrodo WE, usando un amplificador de transimpedancia (TIA). La corriente I el proporcional al voltaje de salida del TIA, V_o , y se relaciona como

$$V_o = -R_f I . \quad (2.15)$$

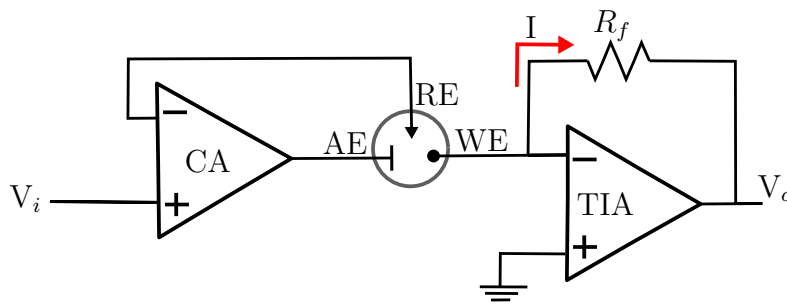


Figura 2.10: Diagrama esquemático de un circuito potencioestado para celda de tres electrodos.

2.3. Técnicas electroanalíticas

Además de los biosensores electroquímicos, existen distintas técnicas para caracterizar a un analito. Las técnicas electroanalíticas son aquellas que permiten el estudio de los procesos de una reacción que ocurre en la interfase electrodo-electrolito. Estos procesos ocurren antes, durante y después de imponer una perturbación eléctrica sobre el sistema, considerando que el tipo de perturbación que se imponga define el tipo de respuesta que permite caracterizar al analito.

En la Figura 2.11 se muestra la clasificación de las técnicas electroanalíticas, las cuales se dividen como estáticas cuando la medición es en circuito abierto y la corriente i es igual a $i = 0$, y dinámicas cuando la corriente es diferente a cero, i.e., $i \neq 0$. En las técnicas estáticas se tienen la técnica de potencimetría, la cual consiste en medir una diferencia de potencial entre los electrodos sumergidos en una solución, siendo el potencial una métrica que se le asocia a la reacción química de los electrodos y el analito. Por otro lado, en las técnicas dinámicas se aplica una perturbación eléctrica, mediante un potencial o una corriente.

Si el potencial es variable en el tiempo, se considera un método de voltamperometría que consiste en medir una corriente generada por la diferencia de potencial aplicado, considerando la forma de la señal de polarización. La respuesta se reporta, convencionalmente, en curva de corriente en función del potencial generado en el electrodo que polariza el analito, dichas curvas se conocen como voltagramas. En caso de un potencial fijo, se clasifican como amperometría cuando se mide la cantidad de corriente que circula, al aplicar un potencial fijo, y que depende de la concentración del analito en que están inmersos los electrodos; y coulombimetría controlada por potencial (CP) que consiste en relacionar cuantitativamente

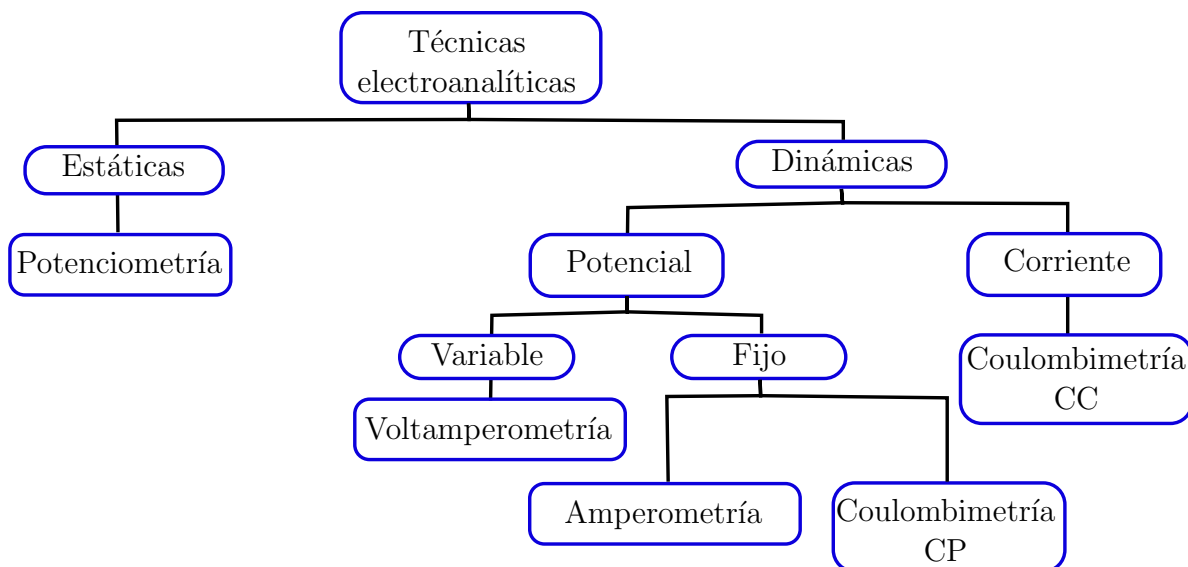


Figura 2.11: Clasificación de las técnicas electroanalíticas.

la carga eléctrica y la concentración del analito. La carga eléctrica se obtiene midiendo la corriente, generada por el potencial fijo, en un intervalo de tiempo.

En cuanto a las técnicas dinámicas que usan una señal de corriente como perturbación, se tiene la coulombimetría controlada por corriente (CC), que relaciona la carga eléctrica con la concentración del analito. En esta técnica, la corriente se genera con una fuente de corriente, lo que permite un mayor control en el valor de la corriente.

Existen múltiples técnicas que se caracterizan por la forma de la señal de potencial o corriente aplicada y la forma en que se mide la respuesta, además, de que la técnica más adecuada para una aplicación biológica depende del tipo de analito que se quiere caracterizar [16, 31, 41]. Por ello, a continuación se presentan las técnicas electroanalíticas usadas en este trabajo, mostrando sus características principales y el principio de operación de cada una de ellas. Además, todas éstas fueron implementadas mediante un circuito potenciostato.

2.3.1. Potenciometría de circuito abierto

La potenciometría de circuito abierto (OCP: *open circuit potentiometry*) es una técnica estática, en la cual no se usa el electrodo AR, de tal manera, que se mide la diferencia de potencial entre el electrodo RE y el WE. Esta diferencia de potencial en circuito abierto E_{OCP} depende únicamente de la reacción electroquímica del analito, y está dado por la siguiente expresión

$$E_{\text{OCP}} = E_{\text{WE}} - E_{\text{RE}} , \quad (2.16)$$

considerando a E_{WE} el potencial del WE y a E_{RE} el potencial del RE. Ésto implica, que la corriente $i = 0$.

La Figura 2.12 muestra la curva del E_{OCP} en función del tiempo t , la cual se obtiene midiendo E_{OCP} durante un intervalo total de tiempo t_{interval} y el potencial E_{OCP} se media en cada intervalo t_{run} de tiempo.

La relación entre los tiempos t_{interval} y t_{run} define el número de muestras N que se toman de E_{OCP} , el cual, idealmente, debe mantener un valor constante durante todo el tiempo t_{interval} . El número de muestras N se puede definir con la siguiente expresión

$$N = \frac{t_{\text{interval}}}{t_{\text{run}}} . \quad (2.17)$$

La condición experimental para hacer mediciones de concentración con OCP, es mantener la solución y electrodo en un estado estático, que permita que la medición sea en un régimen únicamente de difusión.

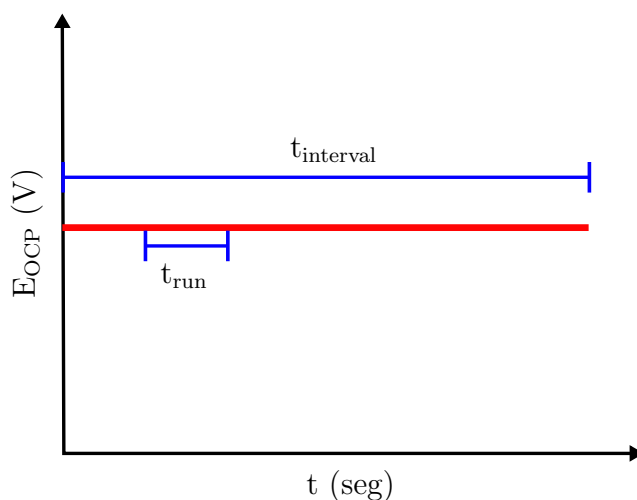


Figura 2.12: Curva del potencial de circuito abierto en función del tiempo obtenido con la técnica de OCP.

2.3.2. Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica (CV: *cyclic voltammetry*) es una técnica dinámica controlada por un potencial variable. Es una de las técnicas más usadas para caracterizar una reacción RedOx, ya que aporta una respuesta rápida del comportamiento de ésta. La señal de excitación para implementar esta técnica es una señal triangular, como se muestra en la Figura 2.13, que tiene un número n de ciclos o periodos, en donde $n = 1, 2, 3, \dots, M$, siendo M un número entero y finito. La señal de excitación inicia el barrido en un voltaje de inicio V_{begin} , que puede ser el mismo valor que el voltaje límite de barrido directo V_{V1} , y que termina en el voltaje límite de barrido inverso V_{V2} . Del punto a al punto b se conoce como barrido anódico o de oxidación, y del punto b a c como barrido catódico o de reducción. Los voltajes de límite V_{V1} y V_{V2} se escogen tomando en cuenta los valores en los que se produce la oxidación y reducción de la especie, dichos valores son estándar para cada especie. La señal triangular no es completamente lineal, ya que debe ser generada incrementando el voltaje gradualmente, ese incremento se conoce como V_{step} . El tiempo que tarda en aumentar el voltaje V_{step} de un punto a otro se conoce como *scan rate* (SR). Finalmente, el número de mediciones de corriente I por segundo (N), que se hacen en el intervalo señalado como

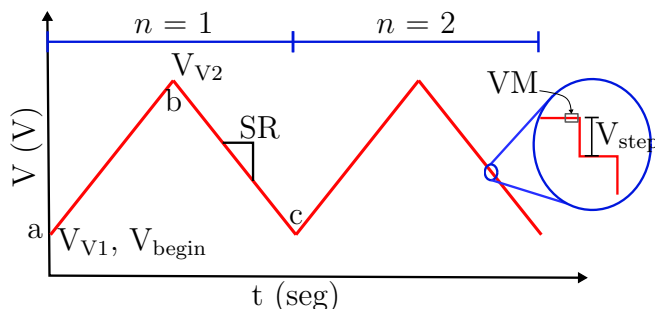


Figura 2.13: Señal cuadrada de voltaje con 2 ciclos para voltamperometría cíclica.

ventana de muestreo (VM), depende del valor de SR y V_{step} y se expresa como

$$N = \frac{SR}{V_{step}} \quad (2.18)$$

En la CV se mide una corriente I , para obtener una curva de corriente en función del potencial generado en el electrodo de referencia RE, conocido como voltagrama. En la Figura 2.14 se muestra un voltagrama típicamente obtenido con CV para una reacción RedOx. En dicho voltagrama se observa que en el proceso de oxidación, se genera una corriente positiva, y tiene un pico anódico i_a ; y en el proceso de reducción, se genera una corriente negativa, y se tiene un pico cátodico i_c . Los valores de i_a e i_c se obtienen mediante la línea base de oxidación (LBO) y de reducción (LBR), respectivamente.

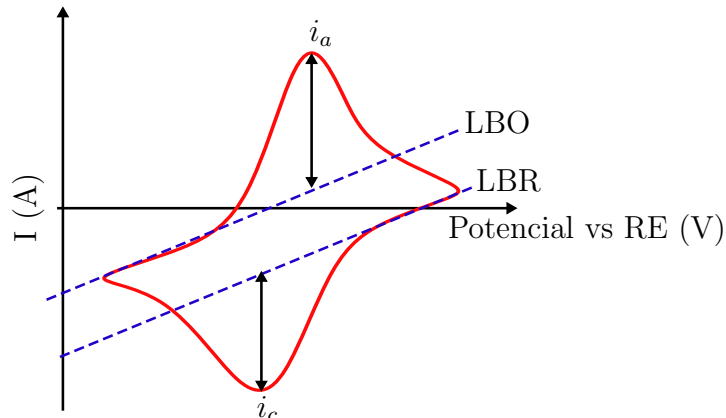


Figura 2.14: Representación de un voltagrama para una reacción RedOx.

La amplitud de las curvas de una CV dependen, considerablemente, del valor del SR, ya que entre mayor sea el valor de SR mayor será la amplitud de la curva obtenida.

En la Figura 2.15 se puede observar que la amplitud de las corriente i_a e i_c aumenta en función del aumento del valor de SR, lo que indica una relación directa entre ellos. La forma de la señal del voltagrama indica que tipo de reacción química se genera, puede ser reversible, cuasi-reversible e irreversible, como se muestra en la Figura 2.16.

Para reacciones reversibles se observa una curva mas simétrica, debido a que la transferencia de carga es rápida, por lo que la reacción está controlada por la difusión de las

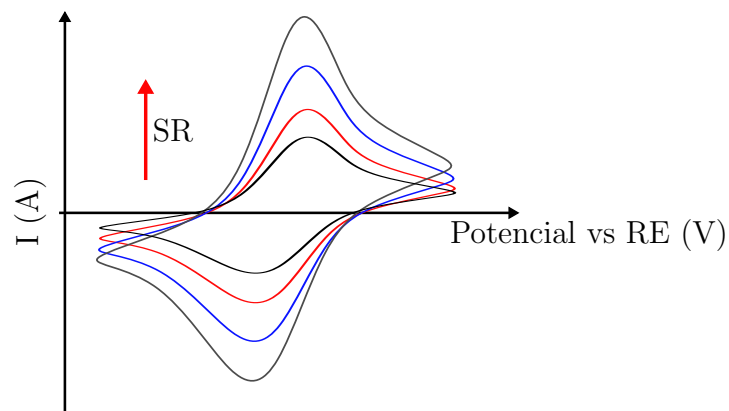


Figura 2.15: Efecto del valor del SR en las curvas obtenidas con CV.

especies. En las cuasi-reversibles, la transferencia de carga es menos rápida, por lo tanto la reacción depende de la difusión y de un factor de rapidez de transferencia de carga, lo que provoca un menor simetría en la curva. En una reacción irreversible se observa una semion-

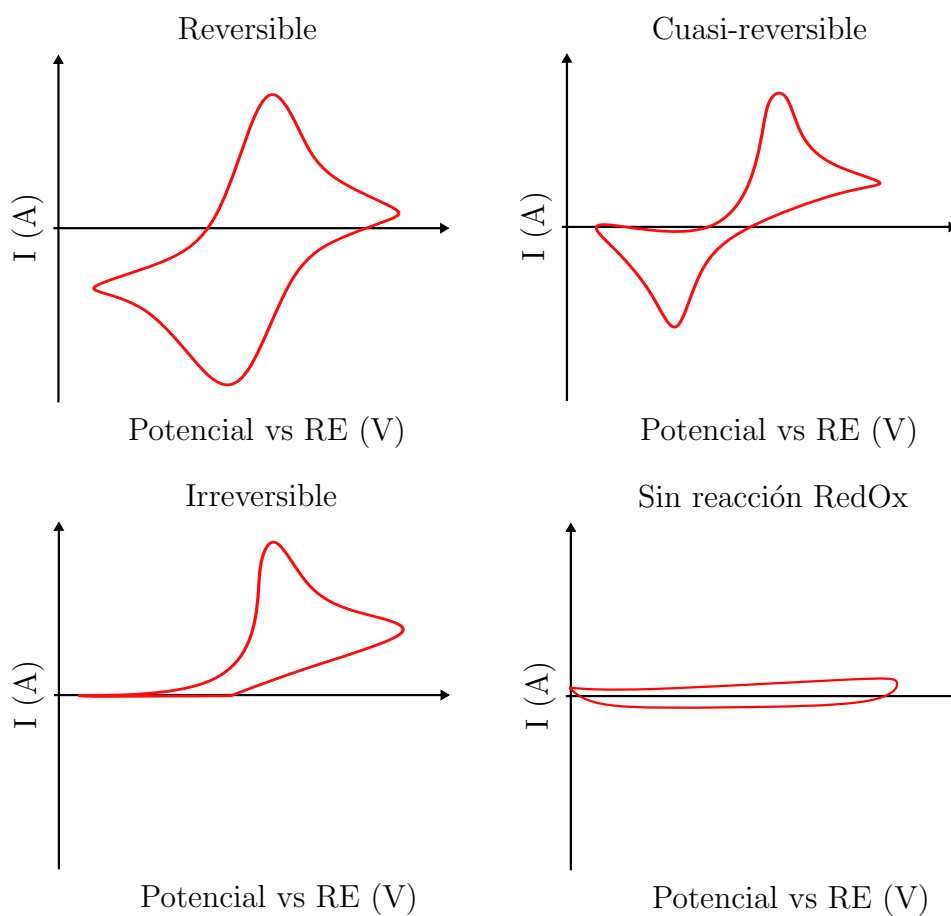


Figura 2.16: Tipos de voltagramas obtenidos con CV para reacciones reversibles, cuasi-reversibles, irreversibles y sin reacción RedOx.

da, debido a que la reacción no regresa a su estado basal, el comportamiento de este tipo de reacciones son gobernadas, en su totalidad, por el factor de rapidez de transferencia de carga. Por último, en reacciones que no generan una reacción RedOX no se puede visualizar una curva simétrica que indique los picos i_a e i_c .

Por ello, experimentalmente, para caracterizar un analito con CV y poder caracterizarlo en función de su concentración, éste debe generar una reacción RedOX o tener agregado un catalizador que propicie la reacción RedOX.

2.3.3. Voltamperometría de onda cuadrada

La técnica de voltamperometría de onda cuadrada (SWV: *square wave voltammetry*) se usa para medir la velocidad de una reacción. Es una técnica implementada para caracterizar reacciones con potenciales de reacción negativos que generan un pulso de corriente. La excitación es mediante una señal de pulsos cuadrados combinada con una señal rampa, como se muestra en la Figura 2.17.

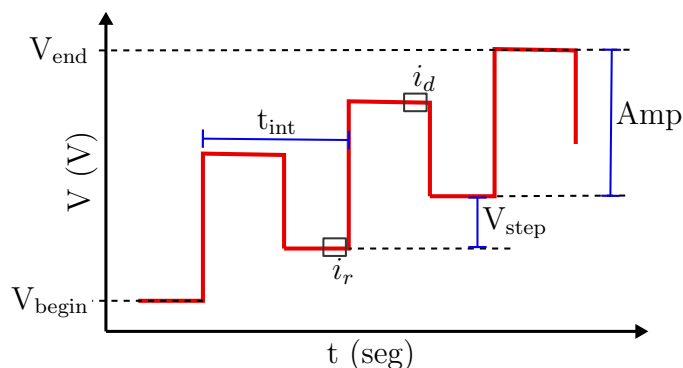


Figura 2.17: Señal de excitación para voltamperometría de onda cuadrada.

La señal comienza en un voltaje de inicio V_{begin} , en donde empiezan pulsos cuadrados con una amplitud Amp , y un tiempo de intervalo t_{int} que es el inverso de la frecuencia f de la señal de pulsos, i.e.

$$f = \frac{1}{t_{int}} , \quad (2.19)$$

adicionalmente, estos pulsos están combinados con una señal rampa que incrementa con un valor V_{step} hasta el valor del voltaje final V_{end} . En SWV la medición de corriente i , para obtener un voltagrama, se hace obteniendo las corrientes de los procesos directo i_d e inverso i_r , ya que la corriente i se obtiene como

$$i = i_d - i_r , \quad (2.20)$$

y el número de muestras por segundo N de corriente i para el voltagrama se puede calcular con la siguiente expresión

$$N = \frac{V_{end} - V_{begin}}{V_{step} \cdot f} . \quad (2.21)$$

La Figura 2.18 muestra el voltograma típico de una reacción RedOx obtenido con la técnica SWV. En dicho voltograma se observa una curva de corriente I en función del potencial generado en el electrodo de referencia RE que tiene un pico máximo i_p generado por una reacción tipo RedOx, el valor de la corriente i_p se considera tomando como referencia la línea base (LB).

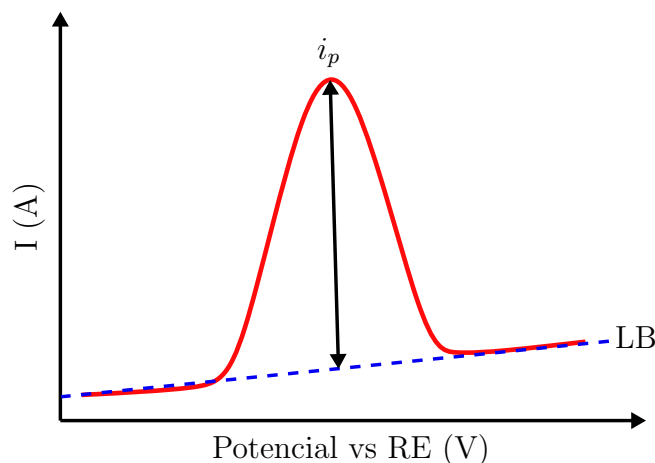


Figura 2.18: Representación de un voltograma para una medición con SWV.

La amplitud de las curvas obtenidas usando SWV dependen de la frecuencia de la señal de excitación. Este comportamiento se muestra en la Figura 2.19; en donde, se observa que la amplitud de la corriente I aumenta en función que aumenta el valor de la frecuencia f .

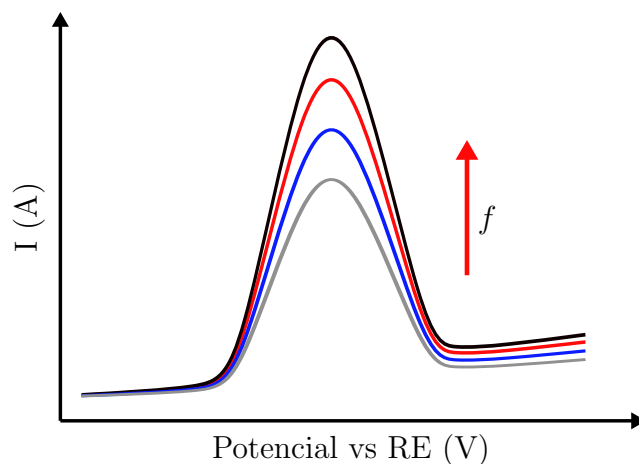


Figura 2.19: Efecto del valor de la frecuencia en las curvas obtenidas con SWV.

Por otro lado, en la Figura 2.20 se muestran los voltagramas que se pueden obtener dependiendo el tipo de reacción química que se presente, reversible, cuasi-reversible, irreversible y cuando no existe una reacción RedOx. En la reversible y cuasi-reversible, la curva de corriente pico está centrada en el valor de 0 del potencial generado en el electrodo de referencia RE, y la diferencia es que la amplitud en la reacción reversible es mayor. En las

reacciones irreversibles, la corriente pico se centra en el potencial de reacción, que depende de la especie, y puede ser positivo o negativo. Por último, en reacciones que no generan reacción RedOx no se genera un pico de corriente.

La técnica SWV se emplea típicamente para caracterizar analitos con reacción reversible en función de su concentración, y su gran ventaja es que ofrece una mayor rapidez de medición que la técnica CV.

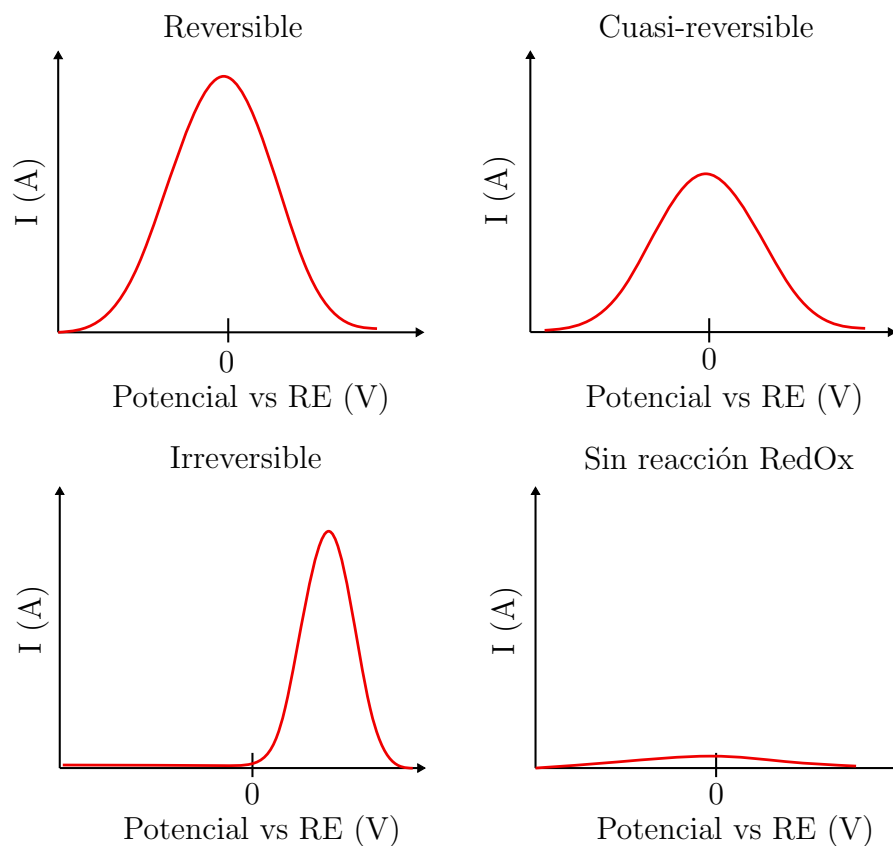


Figura 2.20: Tipos de voltagramas obtenidos con SWV para reacciones reversibles, cuasi-reversibles, irreversibles y sin reacción RedOx.

2.3.4. Cronoamperometría

La cronoamperometría (CA: *chronoamperometry*) es un tipo de amperometría que requiere una señal de voltaje fijo como señal de excitación. Se usa para caracterizar analitos en los que existe una reacción de transferencia de carga debida al fenómeno de difusión [31]. La Figura 2.21 muestra la señal de excitación, la cual es un voltaje constante con un valor V_{dc} .

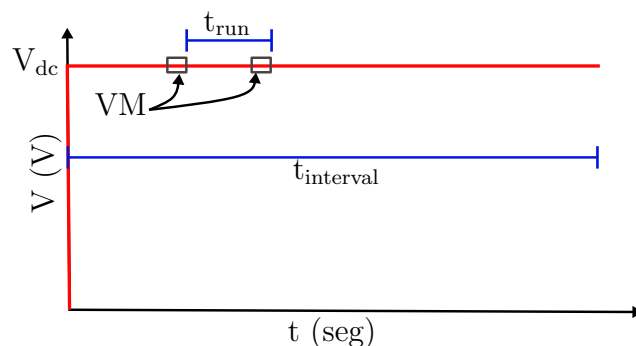


Figura 2.21: Señal de excitación para cronoamperometría.

Dicha señal tiene una duración acotada por el intervalo de tiempo t_{interval} ; en donde, se hacen las mediciones de corriente I cada tiempo t_{run} , tomando las muestras en la ventana de muestreo (VM), señaladas con un recuadro. Con base en esto, el número de muestras de la corriente I medida N se puede expresar como

$$N = \frac{t_{\text{interval}}}{t_{\text{run}}} . \quad (2.22)$$

La respuesta de la CA se observa en una curva de corriente i en función del tiempo. En donde, es posible observar un cambio en la corriente debido a la reacción electroquímica del analito generada por un potencial fijo. En la Figura 2.22 se muestra la curva de corriente I en función del tiempo t , dicha curva es la respuesta de una medición usando CA, y tiene un comportamiento semejante al de una función exponencial decreciente. Dicho comportamiento se debe al fenómeno de doble capa eléctrica, el cual produce cambios en el potencial del electrodo de referencia RE y hace que la corriente en el electrodo de trabajo WE tenga variaciones.

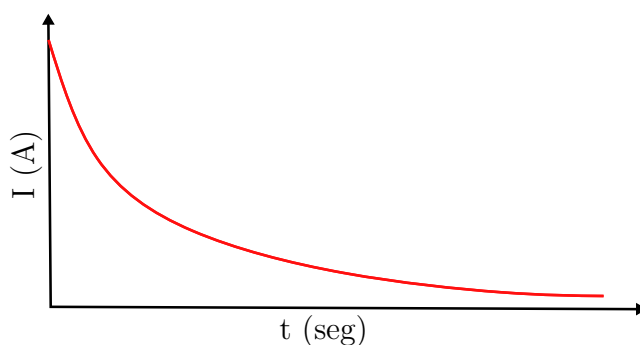


Figura 2.22: Representación de la curva de corriente en función del tiempo para una medición con CA.

En la Figura 2.23 se muestra el efecto del voltaje V_{dc} sobre la amplitud de la corriente medida I , en donde se observa que la amplitud de I aumenta en función del incremento del valor de V_{dc} , lo que indica que existe una relación directa entre ellos.

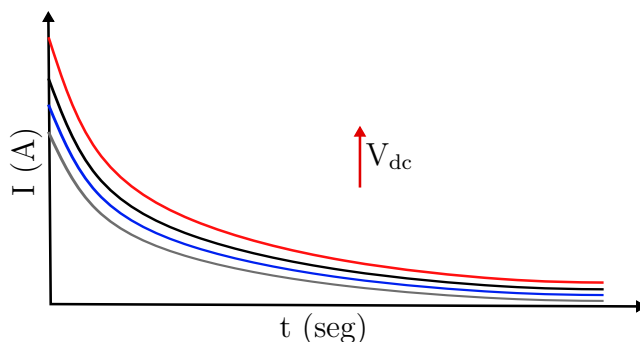


Figura 2.23: Efecto del valor del voltaje aplicado en las curvas obtenidas con CA.

Adicionalmente, caracterizar un analito con CA permite saber que tipo de reacción ocurre. La Figura 2.24 muestra las curvas de corriente I en función del tiempo t , en donde el valor de la corriente es positiva cuando ocurre una reacción de reducción, y para el caso contrario, una reacción de oxidación, el valor de la corriente es negativo.

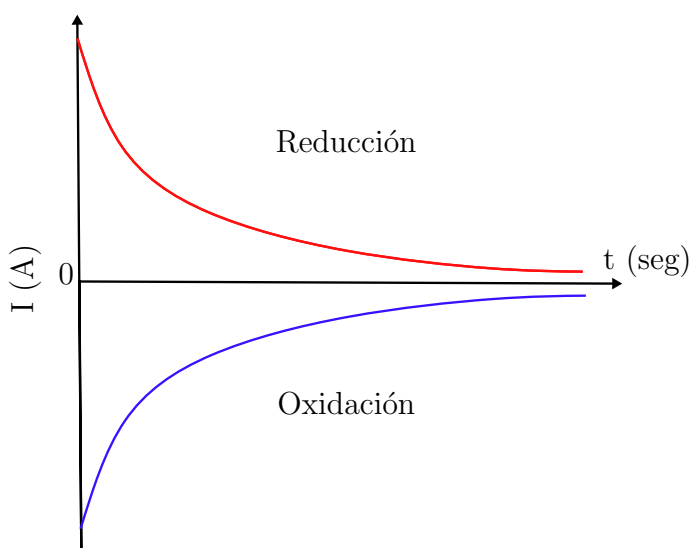


Figura 2.24: Comportamiento de la corriente I en una reacción de reducción y oxidación con CA.

2.4. Transistor de efecto de campo

Los transistores de efecto de campo (FET: *field effect transistor*) son dispositivos electrónicos de tres terminales, basados en materiales semiconductores, ampliamente utilizado en biosensores electroquímicos como elemento de transducción [42]. Un transistor FET, como circuito electrónico, es una fuente de corriente controlada por voltaje, que consta de tres terminales: *gate* (G), *drain* (D) y *source* (S). En la Figura 2.25 se muestra la estructura general de un transistor FET, en donde circula una corriente I de la terminal D a la S, esa

corriente I es controlada por el voltaje aplicado en la terminal G. La corriente I circula a través de un conductor metálico, llamado canal, conectado entre la terminal D y S.

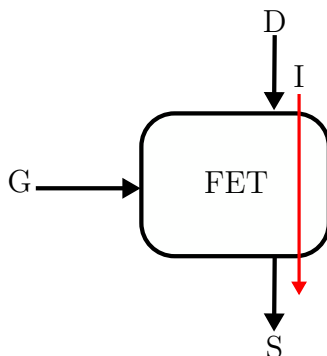


Figura 2.25: Esquema de la estructura general de un transistor FET.

Existen tres tipos de transistores FET, que se explican brevemente a continuación, y que se clasifican por el tipo de unión o juntura que los conforma, éstos son [43]:

JFET: Un transistor FET de juntura (JFET: *junction FET*) usa una unión o juntura pn que es la unión entre un material semiconductor tipo p y otro tipo n . Su funcionamiento se basa en el encogimiento o ensanchamiento del canal de conducción, dicho comportamiento es controlado por un voltaje aplicado en la terminal G. Los JFET tiene como ventaja su alta impedancia de entrada, del orden de $10^{11} \Omega$, pero desventaja como necesitar un voltaje alto para controlar el estado de conducción.

MESFET: Los transistores MESFET (*metal-semiconductor FET*) usan un metal para aislar la terminal G del material semiconductor. Su funcionamiento es similar al de un JFET, pero usando una unión metal-semiconductor, conocida como unión Schottky, en lugar de una unión semiconductor-semiconductor. El MESFET tienen una velocidad de respuesta mayor a la del JFET, debido al efecto Schottky que se genera por el contacto metálico. Por ello, es muy utilizado en aplicaciones de microondas y radio frecuencia, con la desventaja de que su fabricación es costosa y compleja.

MOSFET: En los transistores MOSFET (*metal-oxide-semiconductor FET*) se aprovecha la unión metal-óxido-semiconductor, esta unión se logra al usar material, como el dióxido de silicio (SiO_2), como aislante para separar la terminal G del canal. Los MOSFET son los dispositivos más utilizados en la mayoría de dispositivos electrónicos, debido a que su fabricación es más simple y menos costosa a la del MESFET, además de tener una velocidad de respuesta alta.

A continuación se presenta un análisis más detallado del transistor MOSFET, ya que es el usado en este trabajo como elemento de transducción. Abordando un enfoque cualitativo y cuantitativo de su principio de operación.

2.4.1. Transistor de efecto de campo metal-óxido-semiconductor

Los transistores MOSFET, son los dispositivos más utilizados como elemento de transducción en biosensores FET. Los MOSFET ofrecen ventajas como alta estabilidad ante variaciones de temperatura o luz, facilidad de miniaturización, integración, así como la posibilidad de variar la geometría del elemento sensible que se encuentra embebido en su terminal *gate* [44].

Los transistores MOSFET poseen una estructura metal-óxido-semiconductor que se compone de un substrato semiconductor dopado con un material p o n , sobre el cual se coloca una capa de óxido, generalmente de silicio, que posee propiedades dieléctricas. Finalmente, sobre la capa de óxido se deposita una capa de metal. El tipo de semiconductor que se usa como substrato define el tipo de canal del MOSFET, si es un substrato de material tipo n dopado con tipo p se llama MOSFET canal p ; por otro lado, si el substrato es tipo p dopado con un semiconductor tipo n se denomina MOSFET canal n . Para este trabajo se utilizó un MOSFET canal n como elemento de transducción, debido a su practicidad de polarización y características electrónicas como mayor velocidad, menor ruido, menor impedancia de empaquetado, entre otras, en comparación a los MOSFET canal p [19].

En la Figura 2.26(a) se puede observar el esquema de la estructura de un MOSFET canal n , el cual tiene un substrato semiconductor tipo p dopado, en dos regiones, con material n . Sobre las regiones de semiconductor tipo n se tienen dos contactos metálicos, que son las terminales *drain* (D) y *source* (S). Arriba del material p y entre las terminales D y S, existe una capa de óxido y un contacto metálico para la terminal *gate* (G), el tamaño de esa capa de óxido se denomina canal de conducción. El canal de conducción permite que circule una corriente *drain-source*, I_{DS} , de la terminal D a la S, y que tiene un ancho W y un largo L , con dimensiones en orden micrométrico.

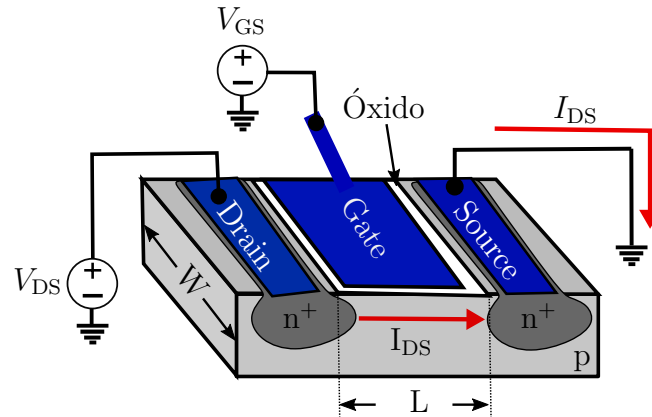


Figura 2.26: Esquema de la estructura de un transistor MOSFET canal n .

El flujo de la corriente I_{DS} depende del comportamiento del canal, el cual se controla con el voltaje *gate-source*, V_{GS} , que se aplica en la terminal G, mientras que el voltaje *drain-source*, V_{DS} , polariza al MOSFET y el voltaje de disparo, V_{th} , es el voltaje en el cual el MOSFET enciende. Los voltajes V_{DS} y V_{GS} , son parámetros controlados, mientras que el

voltaje V_{th} depende de la fabricación del MOSFET y tiene un valor fijo. Por ello, se puede hacer un análisis de la influencia de los voltajes V_{GS} y V_{DS} sobre la corriente I_{DS} .

En la Figura 2.27 se muestra el comportamiento del MOSFET cuando el voltaje $V_{DS} = 0$ V, y el voltaje V_{GS} cambia. La Figura 2.27(a) muestra que para un voltaje $V_{GS} = 0$ V, no circula la corriente I_{DS} , incluso, si el voltaje V_{DS} fuera mayor a cero. Posteriormente, en la Figura 2.27 se observa que cuando el voltaje $V_{GS} > 0$ V aparece un campo eléctrico \vec{E} , el cual provoca que los electrones se coloquen en la zona del *gate* y los huecos en una zona opuesta, aunque esto no genera ninguna corriente por el aislamiento que produce el óxido. Sin embargo, si se aumentara el valor del voltaje V_{GS} , la acumulación de electrones formaría una zona *n*, en donde, se formaría un canal tipo *n* que permitiría el flujo de la corriente I_{DS} de la terminal D a la S. Por ello, se puede afirmar que entre mayor sea el valor de V_{GS} aplicado, mayor será el ancho del canal de conducción. Cuando ocurre este comportamiento, debido a que $V_{DS} = 0$ V, se dice que el MOSFET opera en la región de corte, región donde no circula corriente I_{DS} y se considera al MOSFET apagado, dicho comportamiento se expresa con la siguiente ecuación

$$I_{DS} = I_{D0} e^{\left(\frac{V_{GS}-V_{th}}{V_T}\right)}, \quad (2.23)$$

que considera la corriente *drain* de saturación, I_{D0} , el voltaje térmico, V_T , y que sólo es válida cuando se cumple $V_{GS} < V_{th}$.

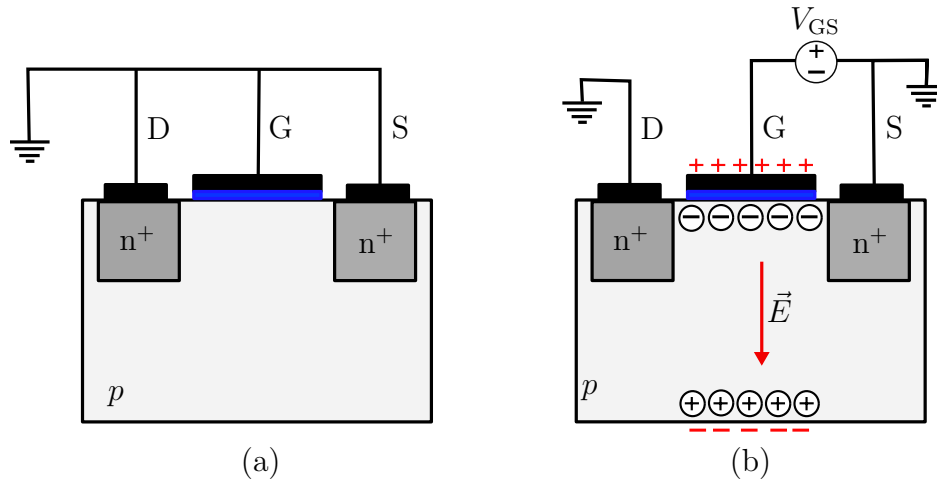


Figura 2.27: Efecto del voltaje V_{GS} en un MOSFET de canal *n*. (a) Cuando $V_{GS} = 0$ V. (b) Cuando $V_{GS} > 0$.

Por otro lado, la influencia del voltaje V_{DS} define el comportamiento del canal de conducción, únicamente, cuando el $V_{GS} > V_{th}$. En la Figura 2.28(a) se muestra que para valores pequeños de V_{DS} , i.e. $V_{DS} < (V_{GS} - V_{th})$, el estrechamiento del canal permite una conducción lineal, que permite una relación lineal entre el voltaje V_{DS} y la corriente I_{DS} , como lo establece la ley de Ohm, debido a este comportamiento se denomina región óhmica o lineal de operación. La corriente I_{DS} en la región óhmica tiene un comportamiento descrito por la siguiente expresión

$$I_{DS} = \mu C_{ox} \frac{W}{L} \left[(V_{GS} - V_{th}) V_{DS} - \frac{1}{2} V_{DS}^2 \right], \quad (2.24)$$

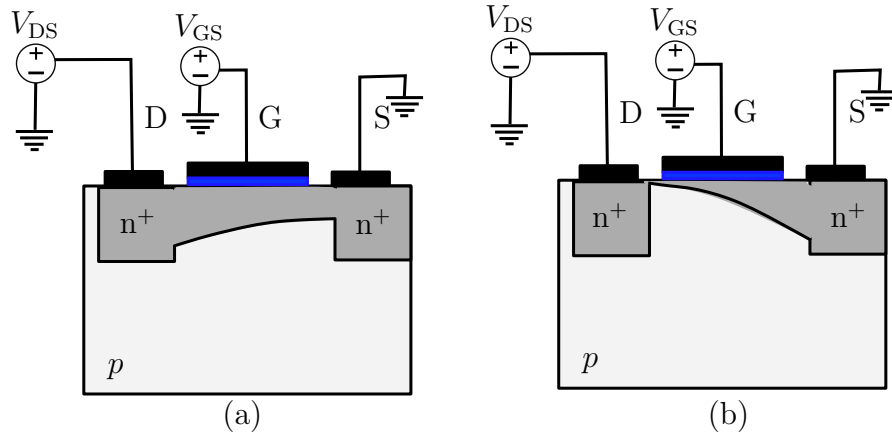


Figura 2.28: Efecto del voltaje V_{DS} sobre el ancho del canal, representado por el área sombreada, en un MOSFET canal n . (a) Cuando $V_{DS} < (V_{GS} - V_{th})$. (b) Cuando $V_{DS} > (V_{GS} - V_{th})$.

dicho comportamiento depende de la movilidad de los electrones, μ , la capacitancia por unidad de área debida a la capa de óxido, C_{ox} , el ancho W y largo L del canal. A medida de que el valor de V_{DS} aumente, el canal comenzará a reducirse, como se muestra en la Figura 2.28(b), haciendo que la corriente I_{DS} deje de tener un comportamiento lineal y llegue a su máximo valor, en el cual se mantendrá constante. En este caso, se dice que el MOSFET opera en la región de saturación, donde la corriente I_{DS} mantiene un valor constante y esta dada por la expresión siguiente

$$I_{DS} = \frac{1}{2} \mu C_{ox} \frac{W}{L} (V_{GS} - V_{th})^2 . \quad (2.25)$$

La forma de caracterizar un MOSFET, es mediante sus curvas características que permiten observar el comportamiento de la corriente I_{DS} en función de los voltajes V_{DS} y V_{GS} . En la Figura 2.29(a) se muestra la curva de salida, en la cual se muestra la corriente I_{DS} en función del voltaje V_{DS} . En donde, se muestran las tres regiones de operación del MOSFET, la región óhmica en donde tiene un comportamiento lineal, limitada con una línea punteada. La región de saturación, en donde, la corriente I_{DS} mantiene un valor constante, finalmente, la región de corte donde la corriente $I_{DS} = 0$ A. Adicionalmente, en la curva de salida se observa como incrementa la amplitud de la corriente I_{DS} en función del incremento del valor de V_{GS} .

La Figura 2.29(b), muestra la curva de transferencia de la corriente I_{DS} en función de voltaje V_{GS} . Se puede observar que la corriente I_{DS} presenta un desplazamiento hacia la izquierda en función del aumento del voltaje V_{DS} , lo que indica que entre mayor valor del voltaje V_{DS} , menor valor de voltaje V_{GS} necesita el MOSFET para operar.

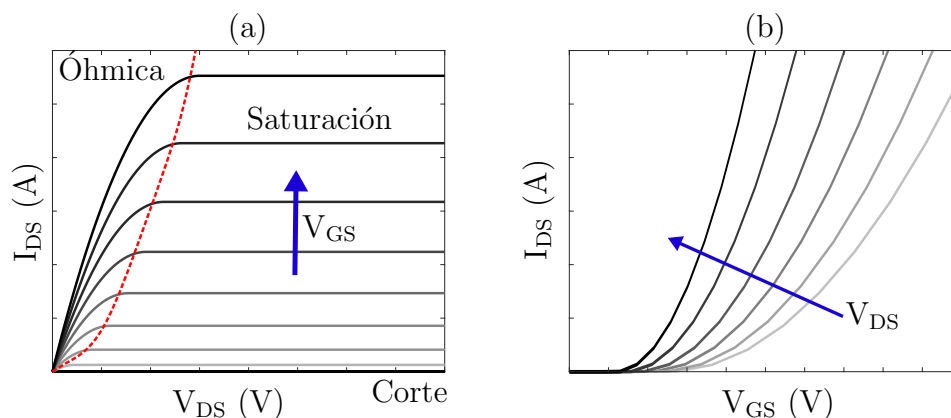


Figura 2.29: Curvas características de un MOSFET canal n (a) Curva de salida de corriente I_{DS} en función del voltaje V_{DS} . (b) Curva de transferencia de corriente I_{DS} en función del voltaje V_{GS} .

2.5. Biosensores FET

Los biosensores FET (Bio-FET) son considerados una herramienta robusta y novedosa, que resulta atractiva por su capacidad de miniaturización, velocidad de respuesta, integración a dispositivos portables, manufactura, por mencionar algunas ventajas [45].

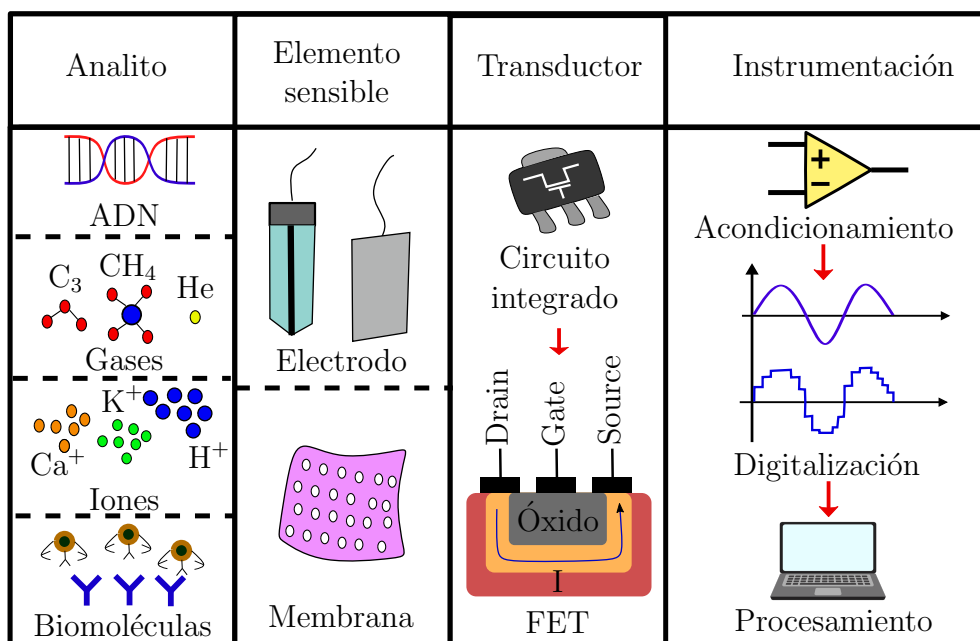


Figura 2.30: Esquema general de un biosensor FET.

Los Bio-FET son una combinación de un sensor potenciométrico y un transductor de efecto de campo. En la Figura 2.30 se muestra el esquema general de un biosensor FET, en

donde se tiene el analito, el elemento sensible, electrodos o membrana, que es donde ocurre el fenómeno potenciométrico que genera una diferencia de potencial asociada a la reacción electroquímica del analito. Dicha diferencia de potencial, es aplicada en la compuerta de entrada del transistor MOSFET, que funciona como elemento transductor, y que genera una corriente I proporcional a la diferencia de potencial del elemento sensible que tiene embebido en la terminal *gate*. La corriente I es acondicionada, digitalizada y procesada mediante un sistema de instrumentación para poder caracterizar, cualitativa y cuantitativamente, al analito.

Los materiales usados para fabricar un Bio-FET pueden variar dependiendo de la aplicación, en la extensa revisión al estado del arte, se encontraron Bio-FET fabricados con substratos flexibles [46], nanohilos [47], grafeno [48], materiales bio-orgánicos [49], por mencionar los más vanguardistas.

Existen diferentes tipos de Bio-FET, cada uno de estos funciona bajo el mismo principio de operación, pero con diferente estructura. A continuación se presentan algunos de los Bio-FET más utilizados para aplicaciones biológicas, principalmente, para medición de concentración.

2.5.1. *Ion-sensitive* FET

El dispositivo FET sensible a iones (ISFET: *Ion-sensitive* FET) fue el primer Bio-FET fabricado con el fin de cuantificar concentración de iones hidrógeno. Los ISFET se caracterizan por usar la estructura de un transistor MOSFET, con la diferencia que en un ISFET no existe contacto metálico en la terminal *gate*, y en su lugar se coloca una membrana sensible. Dicha membrana es sensible a iones específicos, por lo que sólo reacciona ante un ion concreto, la selección iónica se puede dar por una membrana porosa, con poros del tamaño de ion, o por una membrana cargada eléctricamente con carga opuesta a la del ion para atraerlo. En la Figura 2.31 se muestra la estructura de un ISFET, muy similar a un transistor MOSFET canal n pero con la terminal *gate* modificada, con una membrana sensible (MS), en donde se coloca el analito. El analito es polarizado mediante un electrodo de referencia (RE), que esta conectado a un voltaje de corriente directa, V_{REF} .

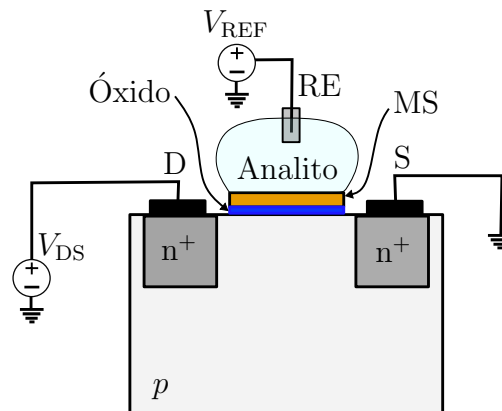


Figura 2.31: Estructura de un *Ion-sensitive* FET.

El material con el que se fabrica la MS define la sensibilidad y rango de operación del ISFET. La principal desventaja de los ISFET es la corta vida útil que tiene, debido a que la MS se desgasta y con ella el óxido, por lo cual se vuelve desechable, además, de necesitar una fabricación compleja. Sin embargo, al permitir una interacción más directa del analito con la MS y el MOSFET, permite una mayor relación señal a ruido y menor límite de detección en las mediciones [50].

2.5.2. *Chemical modified FET*

Los sensores FET químicamente modificados (CHEMFET: *chemical modified FET*) tienen una estructura similar al ISFET, con la diferencia que sobre la membrana sensible MS, tiene un hidrogel (HG). Un HG es un polímero, generalmente orgánico, hidrófilo; que en presencia de un líquido, lo absorbe ocasionando un aumento considerable en su volumen, sin embargo, tienen la capacidad de mantener su forma hasta alcanzar un equilibrio químico. Cuando no hay presencia de líquido sobre el HG, éste mantiene una apariencia similar a la de un cristal. Al igual que el ISFET, el analito es excitado mediante un denominado electrodo de referencia (RE) conectado a un voltaje V_{REF} .

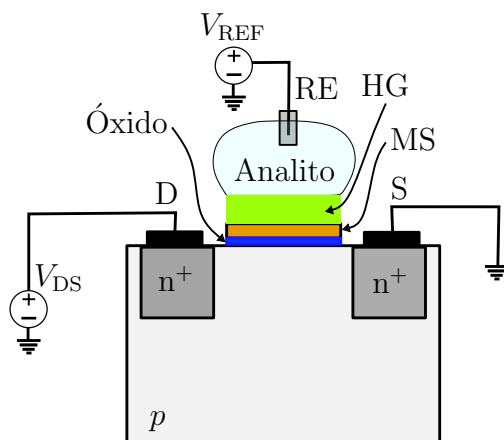


Figura 2.32: Estructura de un *Chemical modified FET*.

Los CHEMFET tienen una vida útil larga, una alta velocidad de respuesta, además, se pueden hacer mediciones con volúmenes pequeños y la selectividad de iones se da por el hidrogel que presenta una mayor especificidad, al ser un elemento orgánico puede generar reacciones electroquímicas con otras moléculas orgánicas como glucosa, agarosa, fructosa, albúmina, entre otras [51].

2.5.3. *Enzyme modified FET*

Un sensor FET modificado enzimáticamente (EMFET: *enzyme modified FET*) es un dispositivo bioelectrónico que tiene una capa de enzimas inmovilizadas sobre la superficie de una membrana. Incluso, se considera al EMFET como un ISFET que tiene una capa enzimática sobre su membrana. Las enzimas funcionan como bioreceptor, lo que aumenta la

especificidad del sensor para detectar una molécula con mayor facilidad. En la Figura 2.33 se muestra la estructura de un EMFET, que sobre la superficie de su membrana sensible (MS) tiene una capa de enzimas inmovilizadas, el analito, polarizado por medio del electrodo de referencia (RE) con un voltaje V_{REF} , reacciona ante la presencia de las enzimas.

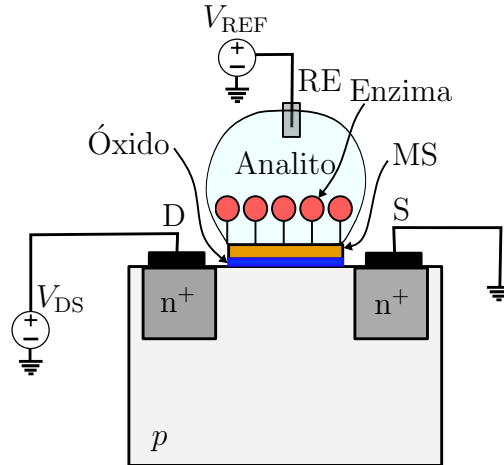


Figura 2.33: Estructura de un *Enzyme modified FET*.

El usar una capa enzimática, además de aumentar la especificidad del sensor, aumenta considerablemente la sensibilidad y resolución de éste, así como la rapidez de respuesta, por lo que los EMFET son una herramienta muy confiable para detección de algún agente biológico [52].

2.5.4. *Deoxyribonucleic acid FET*

Los sensores de ácido desoxirribonucleico FET (DNAFET: *Deoxyribonucleic acid FET*) permiten detectar ADN gracias al proceso de hibridación. En dicho proceso, se combinan dos cadenas complementarias simples de ADN y forman una molécula de doble cadena o hélice. En la Figura 2.34 se muestra la estructura y procesos de hibridación de un DNAFET, en donde sobre la capa de óxido se inmoviliza una cadena de DNA, el analito contiene la cadena complementaria, y es polarizado con un electrodo de referencia (RE). Cuando ocurre el proceso de hibridación se forman las cadenas dobles sobre la capa de óxido, lo que hace cambiar la conducción del MOSFET.

Por su estructura, los DNAFET tienen la desventaja de que el área de la capa de óxido es un factor importante que limita la operación del sensor. Sin embargo, la capacidad de detectar material genético permite que el DNAFET sea una herramienta muy socorrida en la detección de enfermedades como coronavirus, influenza, hepatitis, Alzheimer, cancer, malaria, entre otras [53].

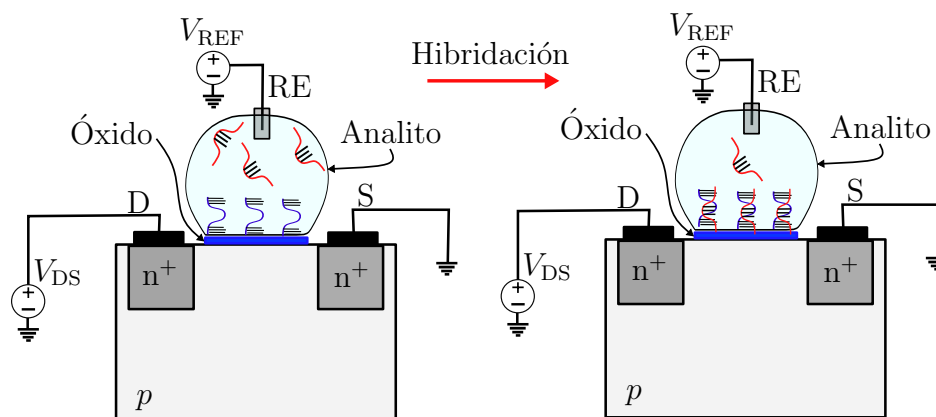


Figura 2.34: Estructura de un *Deoxyribonucleic acid* FET y proceso de hibridación.

2.5.5. *Organic* FET

Los sensores FET orgánicos (OGFET: *Organic* FET) son dispositivos que usan un sustrato semiconductor orgánico, en donde se genera el canal de conducción, un sustrato dieléctrico y no hace uso de electrodo de referencia. La Figura 2.35 muestra la estructura de un OFET, en donde las terminales *drain* y *source* están conectadas en el semiconductor orgánico, debajo del semiconductor tiene una capa dieléctrica, conectada por el otro extremo a la capa de óxido que aísla la terminal *gate*. En la terminal *gate* se aplica un voltaje V_{REF} , esto genera una acumulación de carga entre la capa dieléctrica y el semiconductor orgánico, y circula una corriente de *drain* a *source* que está controlada por la acumulación de carga mencionada y de la interacción del semiconductor orgánico con el analito, que provoca modificaciones en las propiedades del semiconductor orgánico.

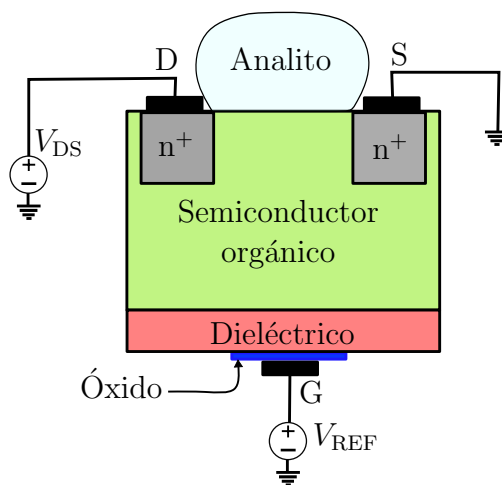


Figura 2.35: Estructura de un *Organic* FET.

El usar un semiconductor orgánico, permite la fabricación de dispositivos OFET flexibles, biocompatibles y biodegradables; además, como sensor presenta buena sensibilidad, estabilidad y precisión [54].

2.5.6. *Extended gate* FET

Un sensor FET de *gate* extendido (EGFET: *Extended gate* FET) es uno de los BioFET más sencillos de fabricar, al diferencia de los anteriores, un EGFET no tiene embebido el elemento sensible en la terminal *gate*, por ello, su estructura permite que los elementos sensibles puedan ser intercambiables. En la Figura 2.36 se muestra la estructura de un EGFET, en donde se observa que en la terminal *gate* se conecta un electrodo de trabajo (WE), en el cual se genera una diferencia de potencial debida a la reacción electroquímica del analito provocada por un electrodo denominado de referencia (RE), en donde se aplica un voltaje V_{REF} .

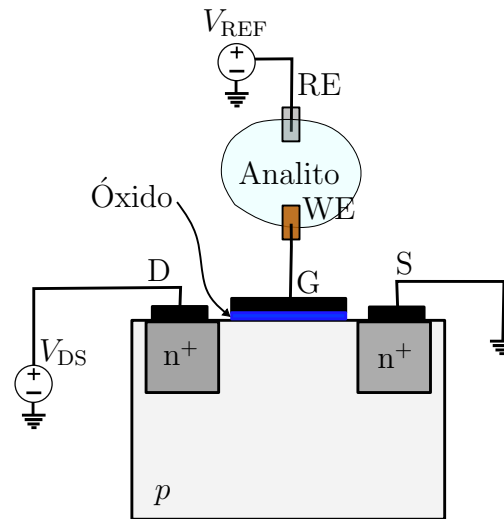


Figura 2.36: Estructura de un *Extended gate* FET.

Por su estructura, los sensores EGFET permiten modularidad en los electrodos de trabajo, mediciones en muestras microvolumétricas, portabilidad, facilidad de integración y bajo costo. Además, permite que el electrodo WE tenga diferentes geometrías, sea de distintos materiales, contenga biomoléculas inmovilizadas, entre otras [44]. Por ello, ésta fue la estructura usada en este trabajo y se explica más a detalle en el Capítulo 3.

Los conceptos abordados en este capítulo pretenden mostrar el marco de referencia para el lector. Se presentaron los conceptos más importantes sobre biosensores electroquímicos, desde un punto de vista ingenieril, mencionando los fenómenos electroquímicos en soluciones, las técnicas e instrumentación utilizadas en aplicaciones electroquímicas, funcionamiento de dispositivos MOSFET, hasta finalmente abordar los diferentes tipos de biosensores FET, mencionando brevemente sus ventajas y desventajas. Con ello, en el siguiente capítulo se presenta el diseño del biosensor FET y de su sistema de instrumentación, así como la preparación de muestras usadas para las mediciones de concentración desarrolladas.

CAPÍTULO 3

DISEÑO EXPERIMENTAL

En este capítulo se presenta el diseño del biosensor FET y su sistema de medición. Se muestran las partes fundamentales que los conforman, así como la metodología de preparación de las muestras usadas para las mediciones de concentración de iones hidrógeno, ácido ascórbico, glucosa, ferricianuro de potasio y azul de metileno.

3.1. Descripción funcional

Este trabajo presenta el diseño de un biosensor FET (Bio-FET), modular en sus electrodos y su sistema de instrumentación, portable, accesible y de *hardware* mínimo. Como se muestra en la Figura 3.1, el sistema consta de tres elementos principales: el primer elemento es el elemento sensible, electrodos, donde se deposita una muestra microvolumétrica del analito, de $50 \mu\text{L}$; el segundo es el dispositivo transductor, integrado por un dispositivo MOSFET canal n que esta embebido en una tarjeta PCB (*Printed Circuit Board*) junto a una resistencia y un conector para los electrodos; por último se tiene una tarjeta PSoC (*Programmable System-on-Chip*), que permite la configuración de *hardware* mediante *software* en un mismo chip, en la cual fue desarrollado el sistema de medición así como el envío de datos a una computadora personal (PC).

Todo el sistema fue diseñado pensando en ser portable y modular, de modo que los electrodos puedan ser intercambiados. Ésto permite estudiar distintos analitos sin necesidad de alterar la estructura del sistema, ni el montaje experimental. Por tanto, todos los resultados mostrados en el Capítulo 4 fueron obtenidos con el montaje experimental que se muestra en la Figura 3.1. En dicha figura, se observa el analito que es depositado con una micropiteta sobre los electrodos, los cuales están conectados al transductor que esta embebido en la tarjeta PSoC, en donde se encuentra el sistema de instrumentación que permite la adquisición y envío de datos a una computadora personal.

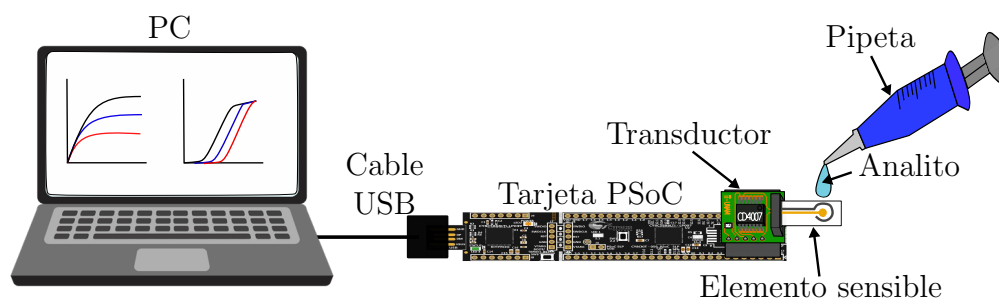


Figura 3.1: Representación esquemática general de la estructura del sistema y montaje experimental.

3.2. Diseño del biosensor

El Bio-FET diseñado corresponde a una configuración EGFET (*Extended-Gate Field-Effect Transistor*), el cual permite el intercambio de electrodos, debido a esta configuración no necesita tener embebidos los electrodos en la terminal de entrada del transistor. El EGFET diseñado, se conforma de dos elementos principales, los electrodos y un transistor MOSFET (*Metal-Oxide-Semiconductor Field-Effect Transistor*), como se ilustra en la Figura 3.2. Donde se puede observar un voltaje V_{REF} conectado al electrodo de referencia (RE) para excitar el analito que se tiene bajo estudio, posteriormente se tiene un electrodo de trabajo (WE) que es usado como elemento sensible ante las reacciones electroquímicas del analito, dicho electrodo WE se encuentra embebido en la terminal *gate* del dispositivo MOSFET. El MOSFET es polarizado en su terminal *drain* con un voltaje V_{DS} , para poder generar la corriente *drain-source*, I_{DS} .

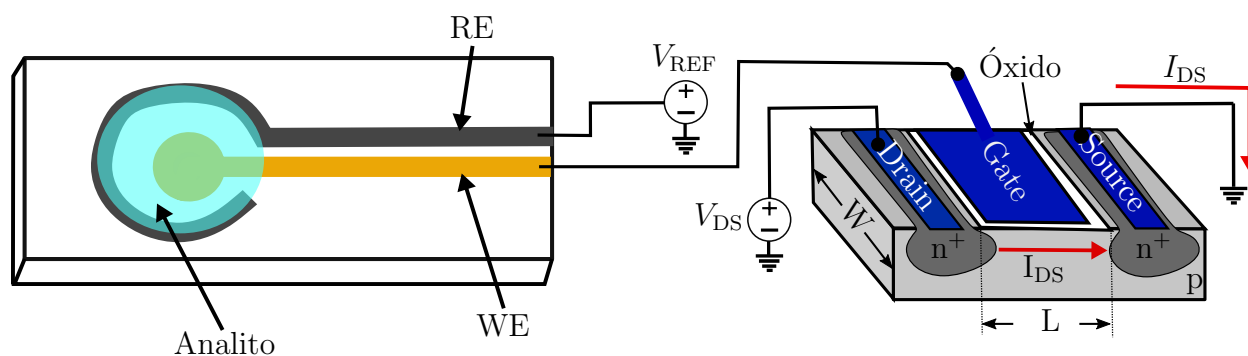


Figura 3.2: Esquema de la arquitectura general de un sensor EGFET.

Un Bio-FET, es la combinación de un sensor potenciométrico, electrodos, y un transductor de efecto de campo, transistor. Es decir, los procesos electroquímicos de analito generado por el electrodo RE, generan un potencial sentido por el electrodo WE que al estar embebido al *gate* del MOSFET, modifica la conducción de éste. Por ello, el comportamiento del Bio-FET diseñado puede representarse con el modelo de la corriente, I_{DS} , del MOSFET en

la zona lineal, i.e.

$$I_{DS} = \mu C_{ox} \frac{W}{L} \left[(V_{REF} - V_{th}^*) V_{DS} - \frac{1}{2} V_{DS}^2 \right], \quad (3.1)$$

donde μ es la movilidad de los portadores de carga, C_{ox} la capacitancia por unidad de área debida al óxido del *gate*, W y L el ancho y largo del canal, respectivamente, y V_{th}^* el voltaje de umbral. En el voltaje V_{th}^* , se engloba la contribución electroquímica y el comportamiento electrónico del transistor, dado por

$$V_{th}^* = V_{th} + V_{CHEM}, \quad (3.2)$$

con V_{th} siendo el voltaje de umbral, propio del MOSFET, y V_{CHEM} el voltaje que involucra los procesos entre la interfaz electrodo-electrolito, y que está dada por [55]

$$V_{CHEM} = E_{REF} - \psi_0 + \chi_{sol} - \frac{\phi_m}{q}, \quad (3.3)$$

considerando que E_{REF} es el potencial del electrodo RE, ψ_0 es el potencial químico que depende de la actividad iónica, χ_{sol} es el potencial debido a un dipolo generado por moléculas del electrolito, ϕ_m es la función de trabajo del electrodo RE y q la carga del electrón.

El potencial E_{REF} corresponde a la ecuación de Nernst utilizada para calcular potenciales de reducción de un electrodo según la concentración del analito, descrito por la siguiente expresión

$$E_{REF} = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln Q, \quad (3.4)$$

siendo E_0 el potencial estándar del electrodo RE, para este trabajo $E_0 = 0.22$ V (para RE de Ag/AgCl), R la constante de los gases ideales, T la temperatura, n la cantidad de moles de electrones que participan en la reacción, F la constante de Faraday y Q el cociente de la reacción.

Finalmente, la caracterización, cualitativa y cuantitativa, del Bio-FET como sensor de concentración se hizo mediante las curvas de transferencia, I_{DS} en función de V_{DS} , y de salida, I_{DS} como función de V_{REF} , con sus respectivas curvas de calibración.

3.2.1. Sistema de electrodos

En este trabajo se emplean electrodos serigrafados (SPEs, *screen-printed electrodes*), fabricados por Metrohm DropSens, los cuales tienen una geometría plana y dimensiones que permiten mediciones en muestras de $50 \mu\text{L}$. En la Figura 3.3 se muestra un diagrama esquemático del sistema de electrodos, conformado por un electrodo de referencia (RE) y uno de trabajo (WE).

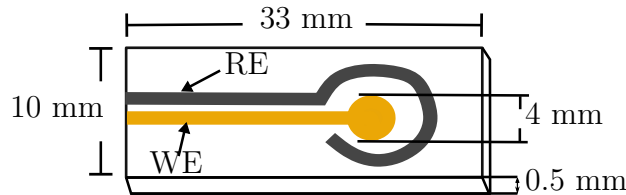


Figura 3.3: Dimensiones del sistema de electrodos utilizado como elemento sensor.

El electrodo RE sirve para fijar el voltaje de referencia que polariza al analito. El potencial de dicho electrodo es fijo, por lo que cualquier cambio de potencial se le atribuye al electrodo WE. En consecuencia, la composición del RE debe ser constante y conocida. Por ello, el electrodo RE usado en este trabajo es de una aleación de plata con cloruro de plata (Ag/AgCl), ya que es un elemento químicamente estable, se considera un electrodo no polarizable y tiene mayor estabilidad ante cambios de temperatura, dichas características hacen que el RE de Ag/AgCl sea un electrodo adecuado para aplicaciones biológicas [56].

Para el electrodo de trabajo WE se usaron diferentes materiales, dependiendo de cada aplicación, como: óxido de indio y estaño (ITO: *Indium Tin Oxide*), carbón (C) y carbón con glucosa oxidasa (C/GOx) inmovilizada sobre su superficie. En la Tabla 3.1 se resumen los materiales de los electrodos usados para los distintos analitos.

Tabla 3.1: Material de los electrodos usados para las mediciones de concentración.

Medición	Material del WE	Material del RE
Iones hidrógeno	ITO	Ag/AgCl
Ácido ascórbico	C	Ag/AgCl
Glucosa	C/GOx	Ag/AgCl
Ferricianuro de potasio	C	Ag/AgCl
Azul de metileno	C	Ag/AgCl

3.2.2. Transistor MOSFET

La etapa de transducción por efecto de campo, se implementó con un transistor MOSFET canal n, usando el circuito integrado CD4007UB (*Texas Instruments*), que contiene tres MOSFET tipo *n* y tres tipo *p*, en el mismo chip. Los parámetros del CD4007UB más importantes, para este trabajo, son el ancho y largo del canal W y L respectivamente, la capacitancia por unidad de área del óxido C_{ox} , el voltaje de umbral V_{th} y el voltaje de operación máximo en la terminal *drain* V_{DSM} , todos estos valores se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2: Parámetros eléctricos del MOSFET canal n que se encuentra en el circuito integrado CD4007UB.

Parámetro	Valor
W	$5 \mu\text{m}$
L	$100 \mu\text{m}$
C_{ox}	0.27 nF/m
V_{th}	0.9 V
V_{DSM}	18.0 V

El desempeño del MOSFET es importante, debido a que es el encargado de la transducción por efecto de campo. Por ello, para este trabajo el circuito CD4007UB fue el adecuado;

sin embargo, se puede usar otro modelo diferente que cumpla con las características ya especificadas.

3.3. Diseño del sistema de medición

El propósito del sistema de medición es brindar una instrumentación accesible y de *hardware* mínimo, para caracterizar al Bio-FET como sensor de concentración. Para caracterizar al Bio-FET, el sistema puede generar, adquirir, procesar y transmitir las señales necesarias para obtener las curvas características de éste.

En la Figura 3.4 se muestra el diagrama del sistema desarrollado, con todas las etapas que lo conforman. Se observa que tiene como unidad central de procesamiento un dispositivo PSoC 5LP, de la familia Cypress Semiconductor, que tiene microcontrolador de 32 bits (ARM CORTEX M-3), y que fue seleccionado por su capacidad de implementar y configurar *hardware* mediante *software*. Es decir, todos los elementos que se describen a continuación están embebidos en el dispositivo PSoC 5LP, a excepción de la resistencia R_f y el Bio-FET.

El voltaje *drain-source*, V_{DS} , es generado por medio de un convertidor digital analógico (DAC: *digital to analog converter*) de 8 bits, que en su salida tiene un seguidor de voltaje (V_f). Este voltaje es aplicado a la terminal *drain* (D) del MOSFET, en un intervalo de 0 a 4.0 V. Similarmente, el voltaje de referencia, V_{REF} , se genera mediante un DAC, cuya salida esta conectada a un V_f , y que genera un voltaje en un intervalo de 2.0 a 4.0 V. El voltaje V_{REF} se aplica en el electrodo de referencia (RE) del Bio-FET, para polarizar el analito bajo estudio (AUT). El electrodo de trabajo (WE) esta embebido en la terminal *gate* del MOSFET, el potencial medido con el WE controla la conducción del MOSFET, lo cual se ve reflejado en la corriente *drain-source* (I_{DS}). La corriente es medida en la terminal *source* (S) del MOSFET mediante un amplificador de transimpedancia (TIA), con una resistencia externa (R_f) de 1 k Ω . La salida del TIA (V_o), es un voltaje proporcional a la corriente medida I_{DS} , y que se relaciona con la siguiente expresión

$$V_o = -R_f I_{DS} . \quad (3.5)$$

El voltaje V_o es digitalizado mediante un convertidor analógico digital (ADC: *analog to digital converter*), Sigma Delta ($\Delta\Sigma$) de 16 bits. Posteriormente, los datos se envían mediante un modulo UART (*universal asynchronous receiver-transmitter*), vía puerto USB (*universal serial bus*), para procesar y obtener las curvas de la corriente medida I_{DS} , en función del voltaje V_{DS} y V_{REF} . La curva de corriente I_{DS} en función del voltaje V_{DS} , se conoce como curva de salida y se obtiene variando el valor de V_{DS} de 0 a 4.0 V, con un valor fijo de V_{REF} . Mientras que la curva de corriente I_{DS} en función del voltaje V_{REF} , llamada curva de transferencia, se obtiene variando el voltaje V_{REF} de 0 a 4.0 V, con un valor fijo de V_{DS} .

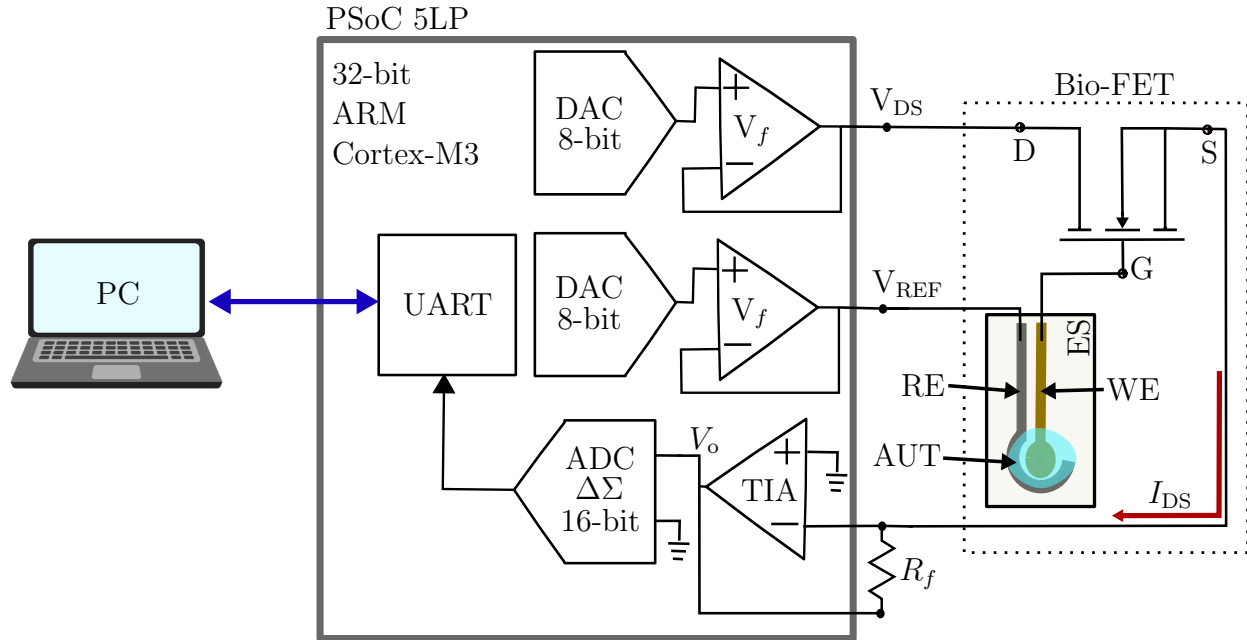


Figura 3.4: Diagrama de bloques del sistema de instrumentación para un Bio-FET.

3.4. Preparación de muestras

Para las mediciones de iones hidrógeno, ácido ascórbico (AA), glucosa (G), ferricianuro de potasio (KF) y azul de metileno (MB), se prepararon diferentes soluciones. Para la medición de concentración de iones hidrógeno o de pH, se prepararon soluciones tipo *buffer*; y para las demás mediciones se prepararon soluciones diluyendo AA, G, KF y MB en un electrolito soporte. Por ello, en esta sección se explica la preparación de estas muestras y las especies utilizadas.

3.4.1. Preparación de *buffer*

Un *buffer* es una solución que mantiene su acidez o basicidad dentro de un intervalo reducido de pH, por lo cual se dice que mantiene un valor de pH constante [57]. Para preparar una solución *buffer*, con un valor fijo de pH, se requiere un ácido débil y una sal de su base conjugada, y calcular la concentración de cada una de estas mediante la ecuación mediante la ecuación de Henderson-Hasselbalch, que esta dada por

$$pH = pK_a + \log \frac{[A]}{[B]}, \quad (3.6)$$

siendo pK_a la constante de disociación ácida, propia de cada especie, $[A]$ y $[B]$ la concentración del ácido y base conjugada, respectivamente. En la Tabla 3.3 se muestran los pares ácido-base usados para la preparación de las soluciones *buffer*, su constante pK_a y valor final de pH.

Tabla 3.3: Pares ácido-base usados para preparación de soluciones *buffer*.

Par ácido-base	Fórmula química	pK_a	pH
Ácido cloroso/Dióxido de cloro	$\text{HClO}_2/\text{ClO}_2$	2.00	2
Ácido nitroso/Dióxido de nitrógeno	$\text{HNO}_2/\text{NO}_2^-$	3.37	4
Ácido acético/Acetato	$\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$	4.47	5
Ácido fosfórico/Fosfato ácido	$\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$	7.21	7
Amonio/Amoniaco	$\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$	9.25	9

3.4.2. Preparación de soluciones estándar

Una solución estándar es aquella que tiene una concentración conocida de una especie específica, que son el tipo de soluciones que se usaron en este trabajo. Dichas soluciones constan de dos partes, el electrolito soporte y la solución estándar. El electrolito soporte es aquel formado por una sal iónica que aumenta la conductividad de una solución sin participar en la reacción química, y tiene como función minimizar el efecto de migración [31]. En este trabajo se usaron diferentes electrolitos soporte para las mediciones de AA, G, KF y MB, los cuales fueron preparados con las especies que se muestran en la Tabla 3.4, en donde se indica la especie, su fórmula química, el peso molecular (n) y la aplicación en la que se usa.

Tabla 3.4: Especies usados para la preparación de electrolitos soporte.

Especie	Fórmula química	n (g/mol)	Aplicación
Cloruro de potasio	KCl	74.55	Ácido ascórbico y ferricianuro de potasio
Cloruro de sodio	NaCl	58.44	Glucosa
<i>Buffer</i> fosfato salino (PBS)	-	411.04	Azul de metileno

El electrolito soporte, para cada aplicación, se preparó diluyendo una masa m de una especie en un volumen V de agua destilada, para calcular m se usó la ecuación de molaridad dada por

$$m = MnV, \quad (3.7)$$

que permite calcular el valor de m para una solución de concentración molar M .

Una vez obtenidos los electrolitos soporte, se prepararon las soluciones estándar de ácido ascórbico, glucosa, ferricinuro de potasio y azul de metileno. Para preparar las soluciones a diferentes concentraciones molares M se calculó la m necesaria de la especie mediante la Ecuación 3.7, y se diluyó en un volumen V , de electrolito soporte previamente preparado. En la Tabla 3.5 se muestran las especies, su fórmula química y su valor de n .

Tabla 3.5: Especies usadas para la preparación de soluciones estándar.

Soluto	Fórmula química	n (g/mol)
Ácido ascórbico	$C_6H_8O_6$	176.12
D-(+)-Glucosa	$C_6H_{12}O_6$	180.16
Ferricianuro de potasio	$K_3[Fe(CN)_6]$	368.34
Azul de metileno	$C_{16}H_{18}N_3SCl \cdot 3H_2O$	379.90

En resumen, en este capítulo se abordó el diseño del Bio-FET y su sistema de instrumentación, para poder realizar las mediciones de concentración de iones hidrógeno, ácido ascórbico, glucosa, ferricianuro de potasio y azul de metileno. Se expusieron las diferentes etapas que conforman al Bio-FET, así como los componentes y funcionamiento del sistema de medición. Finalmente, se presentó la metodología experimental para la preparación de soluciones *buffer*, electrolitos soporte y soluciones estándar, usadas en las mediciones que se muestran en el siguiente capítulo.

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos con el biosensor y sistema de medición descritos en el capítulo anterior. Se muestra la caracterización del sistema, en donde se comparan las mediciones hechas con el sistema diseñado con un equipo de laboratorio comercial. Posteriormente, se muestra la caracterización del Bio-FET como sensor para mediciones de concentración de iones hidrógeno, ácido ascórbico, glucosa, ferricianuro de potasio y azul de metileno. Para cada aplicación se realizaron repetidas mediciones, sin embargo, como el objetivo de este trabajo es presentar la metodología fundamental de calibración, para medir concentración con Bio-FET, sólo se reportan las curvas de transferencia y salida más adecuadas y que fueron seleccionadas de acuerdo a lo que se reporta en la literatura [44]. Por otro lado, en cada experimento se usaron distintos sistemas de electrodos serigrafados, con excepción del experimento de medición glucosa, los cuales fueron enjuagados y reutilizados para realizar las mediciones; idealmente, no es lo más viable, sin embargo, por cuestiones de practicidad y debido a que experimentalmente se observó que las variaciones en las mediciones eran ligeras e insignificantes, se concluyó que para fines de demostración de calibración del Bio-FET como sensor de concentración es viable reutilizarlos. Cabe mencionar, que el reutilizar electrodos tiene limitaciones debido al desgaste, oxidación y alteraciones químicas del material sensible. En lo que concierne al experimento de medición de glucosa, no existió este problema ya que se utilizaron tiras reactivas, comerciales, de un sólo uso.

Posteriormente, para cada aplicación se realizó una medición usando técnicas electroanalíticas convencionales, usando el circuito potenciostato EmStat Pico Development Kit de la marca PalmSens, con el fin de tener una métrica de comparación para el Bio-FET diseñado. Esto debido a que comercialmente no existen Bio-FET con la arquitectura que se presenta en este trabajo. Experimentalmente, las mediciones se hicieron de la misma forma que en el Bio-FET y usando los mismos electrodos que se mencionan en cada aplicación. Finalmente, aunque el principio de transducción, electroquímica, es el mismo en ambas mediciones la comparación de desempeño y funcionamiento del Bio-FET se hizo mediante el límite de detección (LD), que es un parámetro de suma importancia en sensores de concentración [58-60].

4.1. Caracterización del sistema

Para evaluar y comprobar el correcto funcionamiento del sistema de medición diseñado, se realizó la caracterización eléctrica del MOSFET usado como transductor, la cual también se realizó con una fuente de voltaje, programable y que se usa típicamente para caracterizar Bio-FET [20]. Dicha caracterización se hizo obteniendo las curvas de salida y transferencia, sin usar el sistema de electrodos, conectando el voltaje V_{REF} directamente a la terminal *gate* del MOSFET.

En la Figura 4.1(a) se muestra la curva de salida, donde se observa la corriente I_{DS} como función del voltaje V_{DS} , para cinco diferentes valores de V_{REF} en el rango de 2.0 a 4.0 V. En dicha curva, se observa cómo disminuye la amplitud de la corriente I_{DS} al disminuir el valor de V_{REF} . En la curva de salida, se puede observar, claramente, las zonas de operación del MOSFET, remarcando que para valores de $V_{DS} > 0.5$ V el MOSFET opera en la zona activa, y para $V_{DS} < 0.5$ V opera en la zona lineal. Con una línea sólida se indican las curvas obtenidas con el sistema de medición diseñado, mientras que con una línea punteada se muestran las obtenidas con una fuente de voltaje KEITHLEY 2220-30-1, se puede observar que en las curvas obtenidas con la fuente de voltaje se presenta una mayor cantidad de variación en las mediciones, que se puede notar en la región activa del MOSFET.

La Figura 4.1(b) muestra la curva de transferencia, en donde la corriente I_{DS} es función del voltaje V_{DS} para cuatro diferentes valores de V_{DS} en el rango de 0.1 a 1.5 V. En dicha curva, se puede observar que el voltaje de umbral V_{th} es aproximadamente 1.2 V; es decir, para voltajes $V_{REF} < V_{th}$ la corriente I_{DS} del MOSFET será nula. De igual manera, las curvas obtenidas con el sistema diseñado se muestran con una línea sólida y las obtenidas con la fuente de voltaje con una línea punteada.

El realizar la caracterización con ambos sistemas, el diseñado y el comercial, permitió validar el correcto funcionamiento del sistema diseñado, ya que las curvas obtenidas con éste se asemejan a las obtenidas con la fuente de voltaje comercial. La principal ventaja del sistema diseñado es que permite realizar mediciones con un mayor número de muestras en menor tiempo, esto debido a que el tiempo de conmutación de la fuente de voltaje es mucho mayor al del sistema diseñado. Por lo cual, el sistema diseñado permite tomar 255 muestras en un tiempo de aproximadamente 0.25 minutos, mientras que la fuente de voltaje tarda aproximadamente 4 minutos para tomar el mismo número de muestras. Por último, físicamente el sistema diseñado es más portable, ya que tiene dimensiones de 9.75 cm de largo, 2.41 cm de ancho y una altura despreciable; mientras que la fuente de voltaje programable mide 38.40 cm de largo, 24.18 cm de ancho y 10.53 cm de altura.

Finalmente, la caracterización del MOSFET sirvió para definir los valores más adecuados de los voltajes V_{REF} y V_{DS} , para obtener las curvas de salida y transferencia, respectivamente, que permitieron caracterizar al Bio-FET como sensor de concentración.

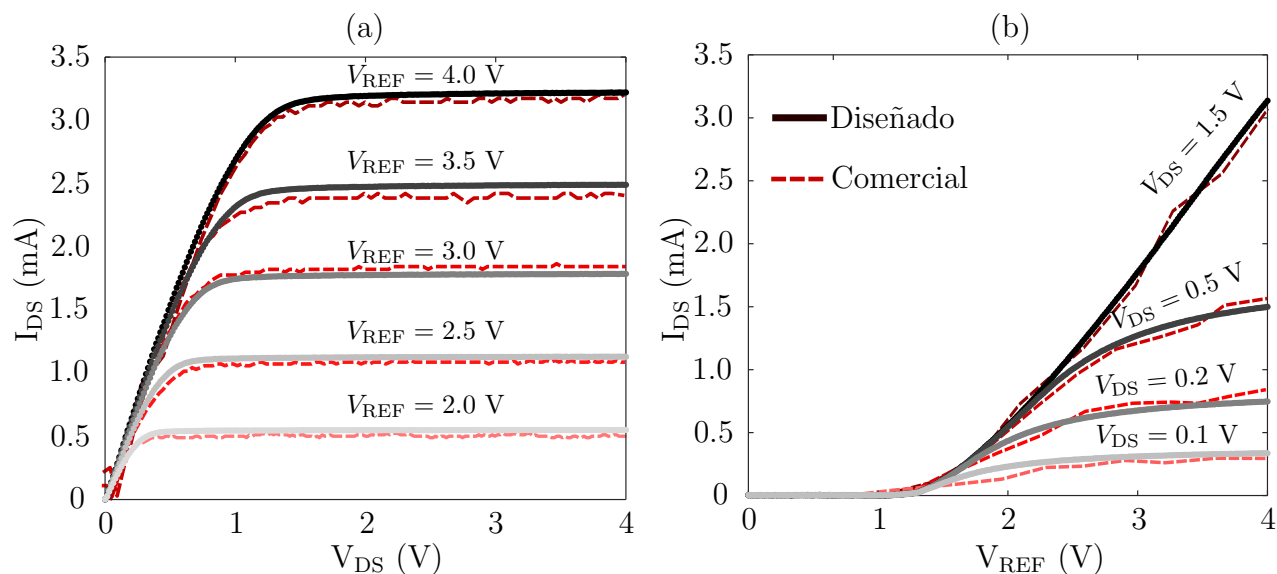


Figura 4.1: Caracterización del MOSFET canal n usando el sistema diseñado y una fuente de voltaje comercial. (a) Curvas de salida de la corriente I_{DS} en función del voltaje V_{DS} para diferentes valores de V_{REF} . (b) Curvas de transferencia de la corriente I_{DS} en función del voltaje V_{REF} para diferentes valores de V_{DS} .

4.2. Medición de iones hidrógeno

El pH es una escala que permite cuantificar iones hidrógeno H^+ e hidróxido OH^- en una solución para determinar si es alcalina, neutra o básica. El pH se cuantifica de forma logarítmica mediante la siguiente expresión

$$pH = -\log_{10}[H^+] . \quad (4.1)$$

Una solución ácida o alcalina ($pH < 7$) posee mayor concentración de iones H^+ que de OH^- , por otra parte en una solución neutra ($pH = 7$) existe la misma concentración de H^+ y OH^- ; finalmente, en una solución básica ($pH > 7$) la concentración de H^+ es mayor a la de OH^- [57].

La motivación de este experimento fue, en primer lugar, porque el pH es un indicador muy importante en diversos procesos biológicos. Por ejemplo, en la piel humana, donde el pH puede ser un indicador de prevención ante algún estado fisiológico [61], en detección de procesos que involucran material genético [62] mediante cambios de pH, para detección de bacterias con base en incrementos o decrementos de pH [63], incluso, en muestras provenientes de alimentos comerciales [64]. Aunado a ello, es la aplicación típica, ya que permite caracterizar de forma simple pero versátil a los Bio-FET [65].

Para caracterizar al Bio-FET como sensor de pH, se prepararon cinco soluciones *buffer*, diluyendo un par ácido-base en agua destilada. El valor de pH para cada *buffer*, se calculó usando la fórmula de Henderson-Hasselbalch (ver Sección 3.4), obteniendo los valores que se muestran en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1: Soluciones *buffer* preparadas para la caracterización del Bio-FET de pH.

Solución	pH
<i>Buffer</i> 1	2
<i>Buffer</i> 2	4
<i>Buffer</i> 3	5
<i>Buffer</i> 4	7
<i>Buffer</i> 5	9

Experimentalmente, para esta aplicación se usó un sistema de electrodos de geometría plana, formado por un electrodo de referencia de plata con una aleación de cloruro de plata (Ag/AgCl) y un electrodo de trabajo fabricado de de ITO (*Indium Tin Oxide*). Posteriormente, se colocó una muestra de, aproximadamente, $50\mu\text{L}$ de cada *buffer*, cubriendo ambos electrodos. Finalmente, el electrodo se enjuagó con agua destilada después de cada medición.

En la Figura 4.2(a) se muestra la curva de salida, donde se observa la corriente *drain-source*, I_{DS} , como función del voltaje *drain-source*, V_{DS} , para un voltaje de referencia, V_{REF} , fijo. En dicha curva, se observa cómo disminuye la amplitud de la corriente I_{DS} al aumentar el valor de pH, lo que sugiere una relación inversa entre ellos. Además, en la Figura 4.2(a) se indica con una línea punteada el valor de V_{DS} , en el cual se toman los valores de I_{DS} para caracterizar cualitativa y cuantitativamente al sensor.

En la Figura 4.2(b) se muestra la curva de calibración del Bio-FET de pH. Dicha curva muestra una relación inversa entre la raíz cuadrada de la corriente I_{DS} como función del valor de pH. Los datos experimentales fueron ajustados a un modelo lineal, obteniendo un coeficiente de determinación, r^2 , mayor a 99%, lo que garantiza una respuesta lineal del sensor diseñado. Por otra parte, de forma cuantitativa se obtuvo una sensibilidad de $1.16 (\mu\text{A})^{1/2}/\text{pH}$ y un límite de detección (LD) de pH igual a 0.8. En la Figura 4.2(c) se muestra la curva de transferencia del Bio-FET de pH, en la cual se observa la corriente I_{DS} como función del voltaje V_{REF} , para los diferentes valores de pH y a un voltaje V_{DS} fijo de 1.5 V. En dicha curva de transferencia es posible observar un desplazamiento hacia la derecha del voltaje V_{th} en función del valor de pH. El punto de operación para caracterizar al sensor, se colocó en 0.3 mA y está señalado con la línea punteada de la Figura 4.2(c).

En la Figura 4.2(d) se muestra la curva de calibración, en donde, se observa un incremento proporcional de V_{REF} conforme el pH aumenta. Los datos experimentales fueron ajustados a un modelo lineal, obteniendo un coeficiente r^2 muy cercano a 1, lo que indica un comportamiento altamente lineal por parte del Bio-FET. Además, la sensibilidad obtenida de dicha curva es de $53.2 \text{ mV}/\text{pH}$, un valor que coincide con el límite de Nernst, y un LD de pH 1.1.

La técnica electroanalítica típicamente implementada para medir pH, usando un circuito potencióstato, es la potenciometría de circuito abierto (OCP: *open circuit potentiometry*) [66]. Los parámetros de la técnica OCP que se usaron se muestran en la Tabla 4.2, t_{run} es el valor de tiempo de escaneo; es decir, cada cuanto tiempo se hace una medición, y t_{interval} el tiempo que dura la medición de potencial.

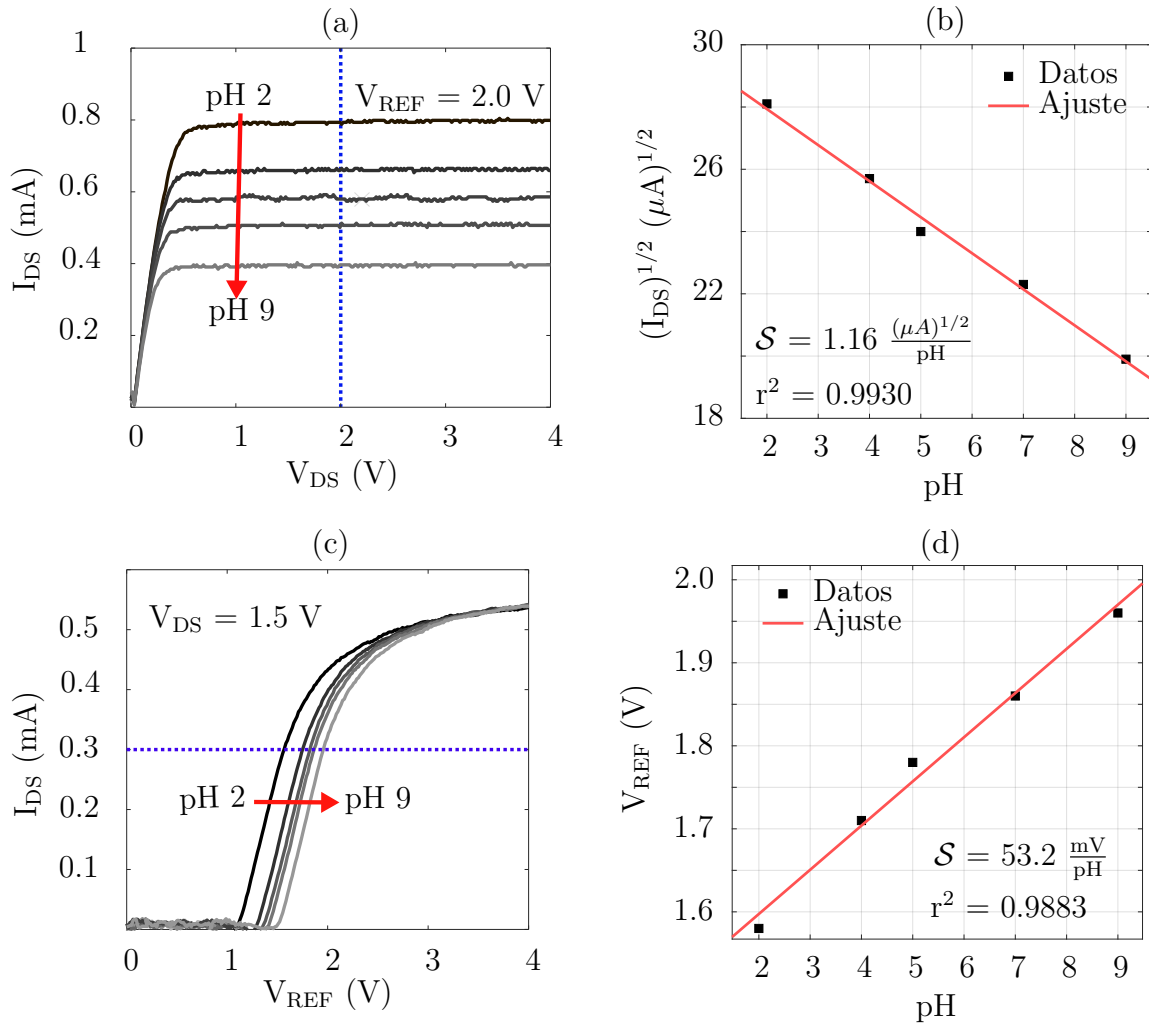


Figura 4.2: Resultados experimentales para la caracterización del Bio-FET de pH. (a) Curva de salida I_{DS} en función del voltaje V_{DS} , para los diferentes valores de pH y un valor fijo de V_{REF} . (b) Curva de calibración de la corriente I_{DS} en función del pH. (c) Curva de transferencia I_{DS} en función del voltaje V_{REF} para los diferentes valores de pH y un valor fijo de V_{DS} . (d) Curva de calibración para el voltaje V_{REF} en función del pH.

Tabla 4.2: Parámetros de la potenciometría de circuito abierto para medición de pH.

Parámetro	Valor
t_{run}	0.1 seg
$t_{interval}$	10 seg

La Figura 4.3(a) muestra el voltograma obtenido, donde se observa el potencial generado en el electrodo de referencia, de Ag/AgCl, para cada *buffer*. La medición de dicho potencial se hizo durante un intervalo de tiempo de 10 segundos, y posteriormente, se repitió para cada *buffer*. Como se puede notar, existe un decremento en el potencial en función del incremento

de pH. Una vez realizadas las mediciones, se tomaron los valores de potencial en el segundo 4, marcado con la línea punteada. La curva de calibración para la técnica OCP, se muestra en la Figura 4.3(b). En ella, se observa una relación lineal entre el potencial debido al electrodo de referencia y el valor de pH con un coeficiente r^2 de 0.9307, una sensibilidad de 21.8 mV/pH y un LD de pH 2.8.

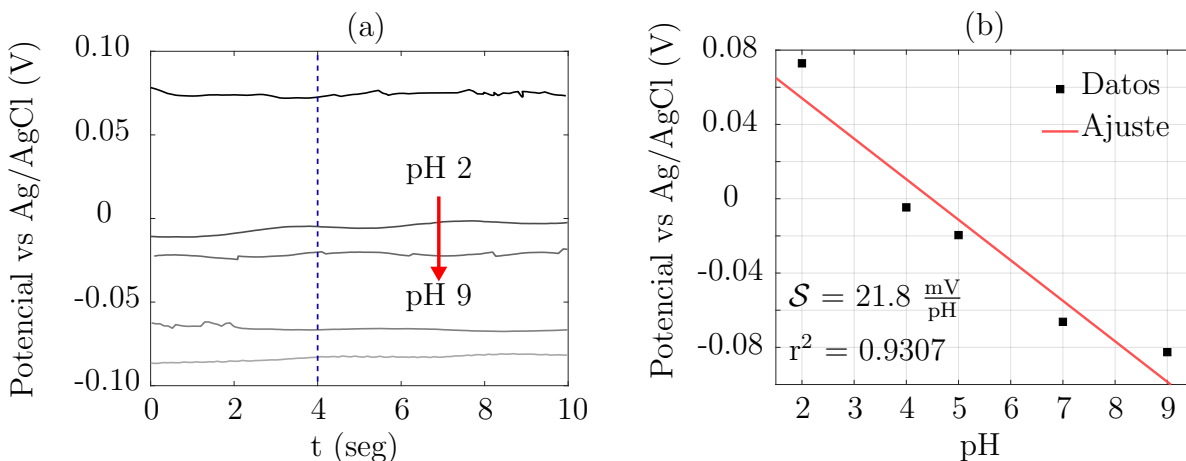


Figura 4.3: Resultados experimentales de mediciones de pH usando OCP. (a) Voltagrama para los diferentes valores de pH obtenidos como función del tiempo. (b) Curva de calibración de potencial debido al electrodo de referencia en función del pH.

El realizar la medición de pH usando la técnica de OCP permitió analizar y corroborar los parámetros de desempeño obtenidos con el Bio-FET diseñado. En la Tabla 4.3 se resumen los parámetros de caracterización obtenidos con el Bio-FET en corriente (EGFET (I)), en voltaje (EGFET (V)) y con la técnica de potenciometría de circuito abierto (OCP).

Tabla 4.3: Sensibilidad (S), coeficiente de determinación (r^2) y límite de detección (LD) de las mediciones de pH.

Metodo	S	r^2	LD
EGFET (I)	$1.16 (\mu\text{A})^{1/2}/\text{pH}$	0.9930	0.8
EGFET (V)	53.2 mV/pH	0.9883	1.1
OCP	21.8 mV/pH	0.9307	2.8

Finalmente, en la Figura 4.4 se muestra la medición de corriente I_{DS} en función del tiempo para los distintos valores de pH. Dicho experimento permitió evaluar la rapidez de respuesta y estabilidad del Bio-FET desarrollado. Esta medición se realizó con voltajes fijos de $V_{DS} = 3.5 \text{ V}$ y $V_{REF} = 2.5 \text{ V}$, para cada *buffer*, durante 1 minuto por cada uno. Se puede observar, que la rapidez de respuesta es casi instantánea, y que las mediciones muestran una mínima varianza, de aproximadamente $5.6 \mu\text{A}$, en el valor de corriente. Así, este comportamiento permitió verificar la estabilidad de las mediciones del Bio-FET para aplicaciones de cuantificación de pH.

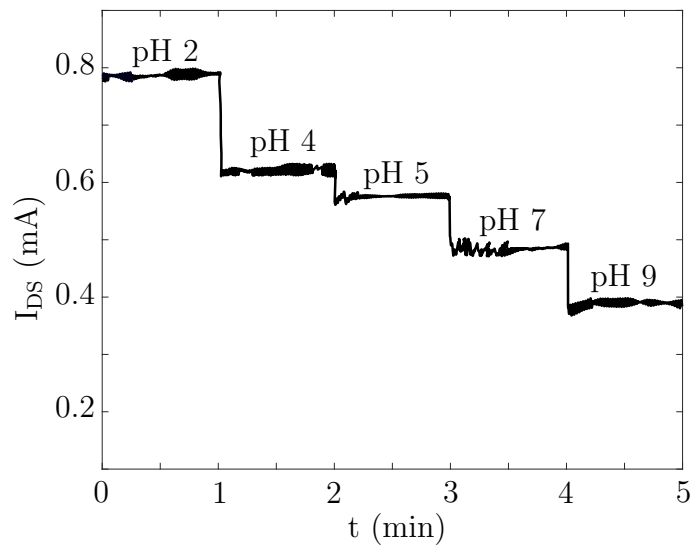


Figura 4.4: Medición de pH en tiempo para evaluar la estabilidad del Bio-FET de pH diseñado.

4.3. Medición de ácido ascórbico

El ácido ascórbico (AA) es una biomolécula orgánica, soluble en agua, que funciona como antioxidante, ayudando a la protección de células contra el daño causado por radicales libres, formados en procesos metabólicos. El AA, como antioxidante, tiene la capacidad de donar electrones al radical libre que se encuentra inestable con el fin de prevenir la oxidación de otros compuestos [67]. La importancia del AA en diversos procesos biológicos fue la principal motivación de este experimento. Por ejemplo, en la sangre, donde la concentración de AA permite establecer una métrica para detectar varios tipos de problemas fisiológicos debidos al estrés oxidativo [68], en bebidas y alimentos comercializados evaluando la calidad y aporte nutricional mediante los niveles de AA [69, 70].

Para la caracterización del Bio-FET como sensor de AA, se usaron seis soluciones a diferente concentración. Las soluciones se prepararon diluyendo AA en un electrolito soporte de cloruro de potasio (KCl) a 0.1 M. En la Tabla 4.4 se muestran los valores de concentración de AA de cada disolución.

Tabla 4.4: Soluciones preparadas para la caracterización del Bio-FET de AA.

Solución	AA (mM)
S1	0
S2	2
S3	4
S4	6
S5	8
S6	10

Físicamente, para este experimento se usó un sistema de electrodos planos, formados por un electrodo de referencia de plata con aleación de cloruro de plata (Ag/AgCl) y un electrodo de trabajo de carbón (C). Se colocó una muestra de 50 μL de cada disolución, sobre ambos electrodos, y se enjuagaron con agua destilada después de cada medición.

La Figura 4.5(a) muestra la curva de salida, donde se observa la corriente *drain-source*, I_{DS} , como función del voltaje *drain-source*, V_{DS} , con un voltaje de referencia, V_{REF} , fijo. En esta curva, se observa que la amplitud de la corriente I_{DS} aumenta al incrementar la concentración de AA, lo que indica una relación directa entre ellos. Adicionalmente, se indica con una línea vertical punteada el valor de V_{DS} , en donde se toman los valores de I_{DS} para caracterizar al Bio-FET como sensor de AA.

En la Figura 4.5(b) se muestra la curva de calibración del Bio-FET de AA, la cual presenta una relación directa entre la raíz cuadrada de la corriente I_{DS} en función de A. Los datos experimentales se ajustaron a un modelo lineal, con el que se obtuvo un coeficiente de determinación, r^2 , muy cercano al 100 %, lo cual indica un comportamiento lineal del sensor. Además, cuantitativamente se obtuvo una sensibilidad $\mathcal{S} = 0.53 (\mu\text{A})^{1/2}/\text{mM}$ y un límite de detección $\text{LD} = 0.9 \text{ mM}$. En la Figura 4.5(c) se muestra la curva de transferencia, de la corriente I_{DS} en función del voltaje V_{REF} , con un voltaje V_{DS} igual a 1.5 V. La curva de transferencia presenta un desplazamiento hacia la izquierda en función del incremento de AA. Para caracterizar al Bio-FET como sensor de AA, se fijó un valor de corriente $I_{\text{DS}} = 1.0 \text{ mA}$ como se señala con la línea punteada en la Figura 4.5. En la Figura 4.5(d) se muestra la curva de calibración, en donde, se observa un decremento en el voltaje V_{REF} conforme AA aumenta. Los datos experimentales fueron ajustados a un modelo lineal, obteniendo un coeficiente r^2 de 0.9949, lo que indica un comportamiento altamente lineal. Además, se obtuvo una $\mathcal{S} = 20.5 \text{ mV}/\text{mM}$ y un $\text{LD} = 0.6 \text{ mM}$.

Dentro de las técnicas electroanalíticas, la voltamperometría cíclica (CV: *cyclic voltammetry*) es la más utilizada para medir concentración de AA [71]. Por ello, mediante un circuito potenciostato, se realizaron mediciones de CV con los parámetros de voltaje inicial (V_{begin}), voltajes límite de barrido directo (V_{V1}) e inverso (V_{V2}), incremento de voltaje de barrido (V_{step}) y el tiempo con que ocurre el incremento de voltaje (SR), mostrados en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5: Parámetros de la voltamperometría cíclica para medición de concentración de AA.

Parámetro	Valor
V_{begin}	0.0 V
V_{V1}	0.0 V
V_{V2}	0.5 V
V_{step}	50.0 mV
SR	50.0 mV/s

En la Figura 4.6(a) se muestra el voltagrama obtenido, para la corriente I en función del potencial generado en el electrodo de referencia, de Ag/AgCl, para cada solución. Se puede observar que existe un incremento de la amplitud de la corriente I en función del aumento de concentración de AA. Para cada medición, se tomaron los valores de la corriente anódica (I_p),

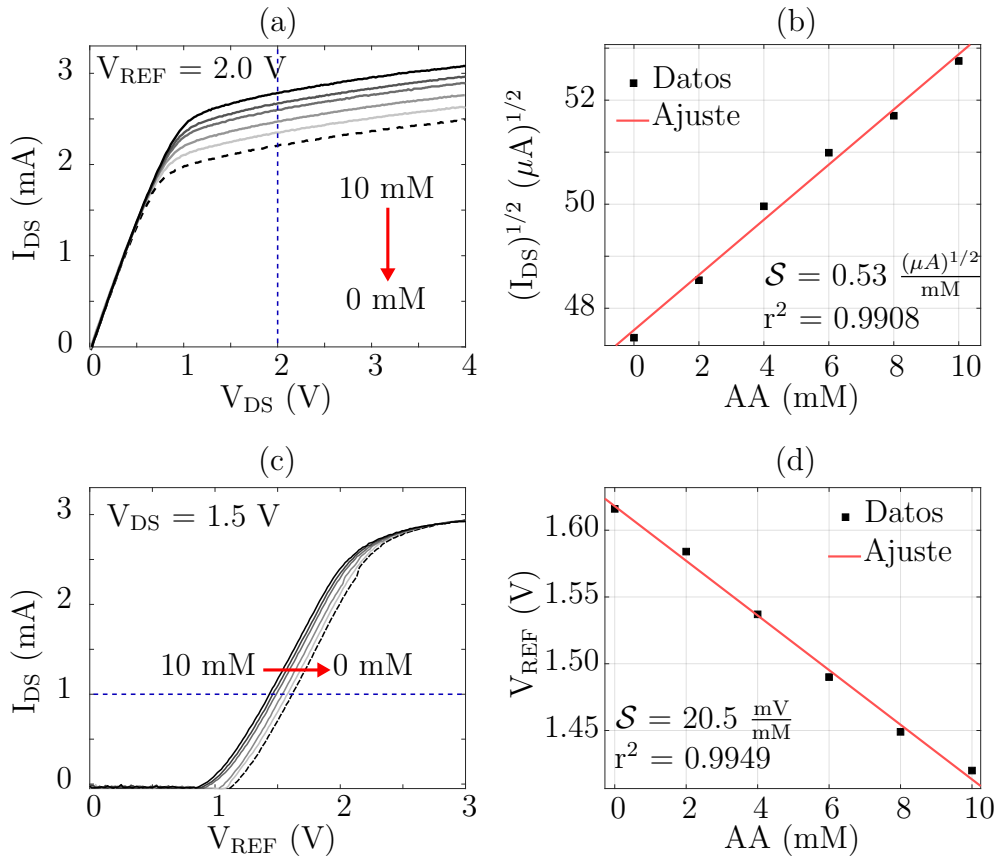


Figura 4.5: Resultados experimentales para la caracterización del Bio-FET de AA. (a) Curva de salida I_{DS} en función del voltaje V_{DS} , para los diferentes valores de AA y un valor fijo de V_{REF} . (b) Curva de calibración de la corriente I_{DS} en función de AA. (c) Curva de transferencia I_{DS} en función del voltaje V_{REF} para los diferentes valores de AA y un valor fijo de V_{DS} . (d) Curva de calibración para el voltaje V_{REF} en función de AA.

señalada con una marca cuadrada, los cuales permitieron obtener la curva de calibración de la Figura 4.6(b). En dicha curva se puede observar que la corriente I_p aumenta linealmente en función del aumento de AA, con un $r^2 = 0.9832$, una $S = 3.68 (\mu A)/mM$ y un $LD = 1.1$ mM.

En la Tabla 4.6 se muestran los parámetros de caracterización obtenidos con el Bio-FET diseñado en corriente (EGFET(I)), voltaje (EGFET(V)) y con la técnica CV, que son la S para cada medición, el r^2 que para los tres casos es muy cercano al 100% y un LD menor para el EGFET, tanto en corriente como voltaje, en comparación con CV. Lo que indica, que para medición de concentración de AA, el Bio-FET permite mediciones de concentraciones menores en comparación con la CV, lo cual se puede observar en el LD.

Por último, en la Figura 4.7 se muestra la medición de corriente I_{DS} en función del tiempo para las distintas soluciones de AA. Este experimento permitió evaluar la rapidez de respuesta y estabilidad del Bio-FET como sensor de AA. Dicha medición se realizó con voltajes fijos de $V_{DS} = 2.5$ V y $V_{REF} = 2.0$ V, para cada solución, durante un intervalo de 1 minuto cada una. Como se puede apreciar, la rapidez de respuesta es casi instantánea, y

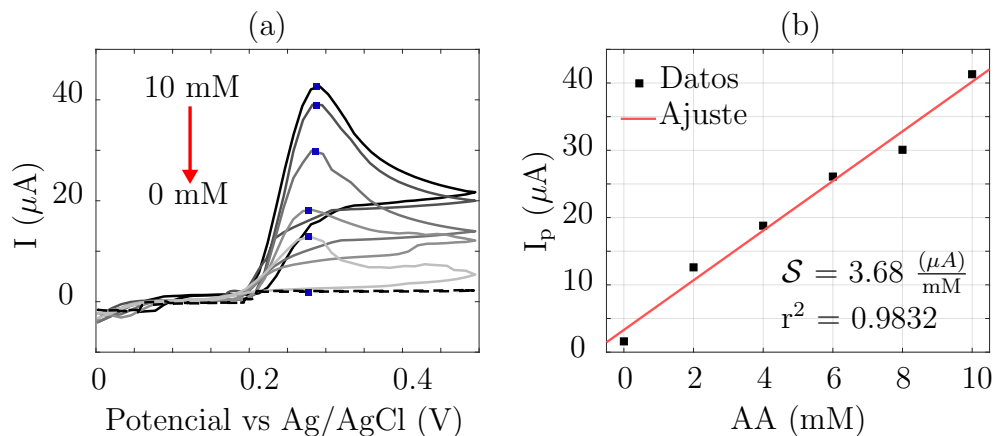


Figura 4.6: Resultados experimentales de mediciones de concentración de AA usando CV. (a) Voltagrama para los diferentes valores de AA. (b) Curva de calibración de la corriente pico en función de AA.

Tabla 4.6: Sensibilidad (S), coeficiente de determinación (r^2) y límite de detección (LD) de las mediciones de AA.

Metodo	S	r^2	LD
EGFET (I)	$0.53 (\mu\text{A})^{1/2}/\text{mM}$	0.9908	0.9 mM
EGFET (V)	20.5 mV/mM	0.9949	0.6 mM
CV	$3.68 \mu\text{A}/\text{mM}$	0.9832	1.1 mM

las mediciones presentan una mínima variación, de aproximadamente $20 \mu\text{A}$, en el valor de la corriente I_{DS} . Con ello, se pudo verificar la estabilidad de las mediciones con el Bio-FET para mediciones de concentración de AA.

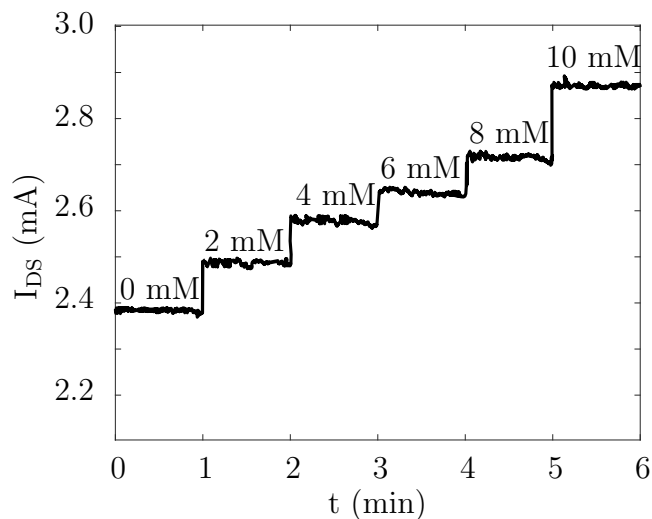


Figura 4.7: Medición de concentración de AA en tiempo para evaluar la estabilidad del Bio-FET diseñado.

4.4. Medición de glucosa

La D-(+)-Glucosa o glucosa (G) es una enzima considerada como monosacárido o azúcar simple, que permite al organismo humano mantener y regular sus condiciones internas. El rango de concentración adecuada de G, en sangre, (de 75 a 100 mg/dL) es fundamental para mantener un correcto funcionamiento del organismo. Por ello, el monitoreo de niveles de G en sangre es muy importante, principalmente, para personas con diabetes, ya que el incremento o decremento de éste puede producir alteraciones cognitivas, daño en múltiples sistemas e, incluso, la muerte [72].

El monitoreo de concentración de G, principalmente en sangre, fue la motivación de este experimento. Por ejemplo, la concentración de G, mediante una escala, indica el nivel de azúcar en sangre para monitorear y evaluar pacientes diabéticos [73]; o en bebidas industrializadas para determinar la calidad y beneficio nutricional mediante la concentración de G [74].

Para caracterizar el Bio-FET como sensor de G, se usaron ocho soluciones a diferente concentración, con los valores que se muestran en la Tabla 4.7. Las cuales se prepararon diluyendo D-(+)-Glucosa en un electrolito soporte de cloruro de sodio (NaCl) a 17 mM.

Tabla 4.7: Soluciones preparadas para la caracterización del Bio-FET de G.

Solución	G (mg/dL)
S1	0
S2	36
S3	72
S4	108
S5	144
S6	180
S5	216
S8	252

En este experimento se utilizaron tiras reactivas comerciales, OneTouch Ultra Blue, que están formadas por un electrodo de referencia de plata con aleación de cloruro de plata (Ag/AgCl) y un electrodo de trabajo de carbón con glucosa oxidasa (GOx), inmovilizada sobre su superficie. La GOx es una enzima que aumenta la velocidad de la reacción RedOx de la glucosa; por ello, funciona como bioreceptor en este experimento. Experimentalmente, se colocó una muestra de 50 μL de cada disolución sobre la tira reactiva, y se desechó después de cada medición.

En la Figura 4.8(a) se muestra la curva de salida, donde se observa la corriente I_{DS} como función del voltaje V_{DS} , con un voltaje $V_{\text{REF}} = 2.5 \text{ V}$. En dicha curva se observa que la amplitud de la corriente I_{DS} aumenta al incrementar la concentración de G, lo que sugiere una relación directa entre ellos. Además, con una línea vertical punteada se indica el valor de V_{DS} , en donde se tomaron los valores de I_{DS} para la caracterización del Bio-FET como sensor de G.

La Figura 4.8(b) muestra la curva de calibración del sensor de G. En donde se observa una

relación directa entre la corriente I_{DS} como función del valor de G . Los datos experimentales fueron ajustados a un modelo lineal, con un coeficiente de determinación $r^2 = 0.9963$, lo que indica un comportamiento altamente lineal del sensor. Además, se obtuvo una sensibilidad $\mathcal{S} = 6.36 \text{ (pA)}^{1/2}/(\text{mg/dL})$ y un límite de detección $LD = 11.2 \text{ mg/dL}$. En la Figura 4.8(c) se muestra la curva de transferencia, en la cual se observa la corriente I_{DS} como función del voltaje V_{REF} , para los diferentes valores G y un voltaje $V_{DS} = 1.5 \text{ V}$. En dicha curva es posible observar un desplazamiento hacia la izquierda en función del incremento de G . Adicionalmente, para caracterizar el sensor de G se fijó un valor de corriente $I_{DS} = 1.5 \text{ mA}$, indicado con un línea horizontal punteada. La curva de calibración, de la Figura 4.8(d), muestra un decremento en el voltaje V_{REF} conforme G aumenta. Los datos experimentales se ajustaron a un modelo lineal, con un coeficiente r^2 mayor a 98 %, una $\mathcal{S} = 0.34 \text{ mV}/(\text{mg/dL})$ y un $LD = 20.1 \text{ mg/dL}$.

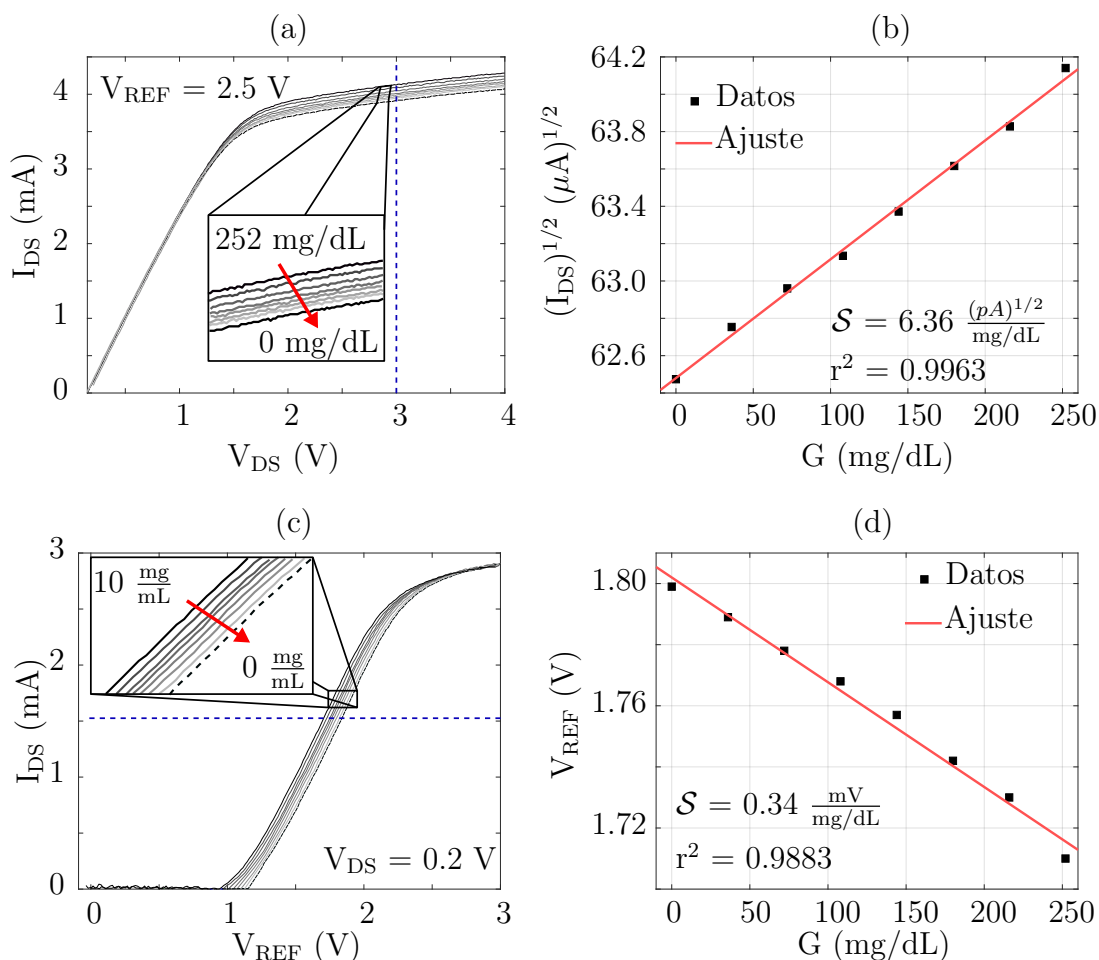


Figura 4.8: Resultados experimentales para la caracterización del Bio-FET de G . (a) Curva salida I_{DS} en función del voltaje V_{DS} , para los diferentes valores de G y un valor fijo de V_{REF} . (b) Curva de calibración de la corriente I_{DS} en función de G . (c) Curva de transferencia I_{DS} en función del voltaje V_{REF} para los diferentes valores de G y un valor fijo de V_{DS} . (d) Curva de calibración para el voltaje V_{REF} en función de G .

La técnica analítica típicamente empleada para medir concentración de G, con un circuito potenciostato, es la cronoamperometría (CA: chronoamperometry) [75]. Las mediciones de CA se realizaron con un voltaje constante (V_{dc}), en un intervalo total de tiempo ($t_{interval}$), en donde, se tomaban muestras cada tiempo de medición (t_{run}), con los valores que se muestran en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8: Parámetros de la cronoamperometría para medición de concentración de G.

Parámetro	Valor
V_{dc}	0.5 V
$t_{interval}$	10.0 s
t_{run}	0.1 s

La Figura 4.9(a) muestra el voltagrama obtenido, para la corriente I en función del tiempo (t) para cada solución durante un intervalo de 10 segundos. En donde se observa un incremento en la amplitud de I en función del aumento de la concentración de G. Una vez realizadas las mediciones, se tomaron los valores de la corriente I en el segundo 5, indicado con una línea vertical punteada. En la curva de calibración para la técnica CA, que se muestra en la Figura 4.9(b), se observa una relación lineal entre la corriente I y el valor de G con un $r^2 = 0.9923$, $S = 11.52 \text{ nA/mM}$ y $LD = 16.2 \text{ mg/dL}$.

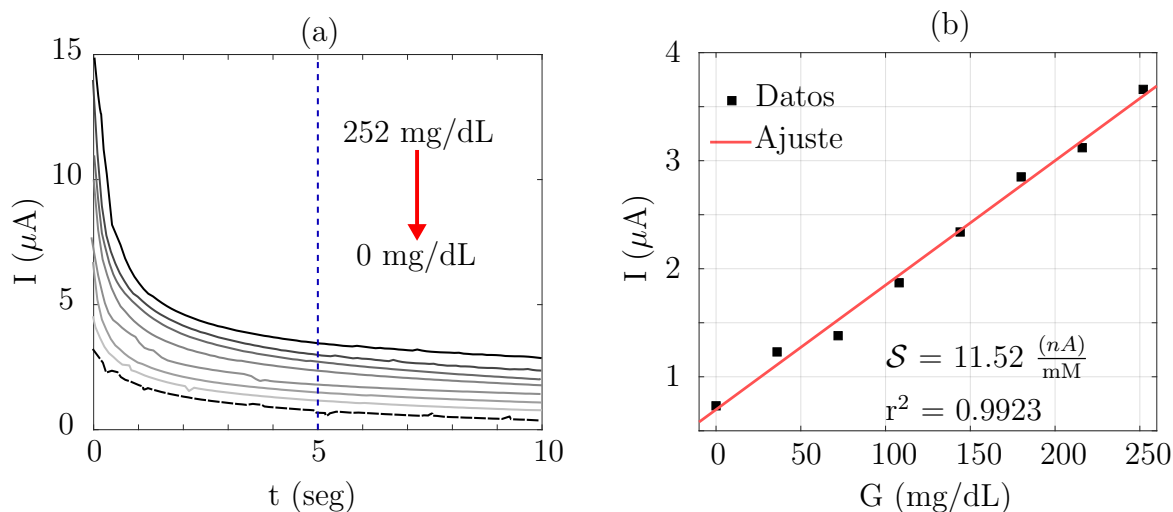


Figura 4.9: Resultados experimentales de mediciones de concentración de glucosa usando CA. (a) Voltagrama para los diferentes valores de G. (b) Curva de calibración de la corriente en función de G.

Los parámetros de caracterización se muestran en la Tabla 4.9 con la técnica CA y del Bio-FET, tanto en corriente (EGFET(I)), como en voltaje (EGFET(V)), permitieron evaluar el desempeño del Bio-FET diseñado. Es importante observar que, por ejemplo, el valor del LD está en el mismo orden de magnitud para los tres tipos de mediciones. Ésto indica que el Bio-FET resulta ser una herramienta adecuada para medición de glucosa, e incluso, presenta una mejora en el LD.

Tabla 4.9: Sensibilidad (\mathcal{S}), coeficiente de determinación (r^2) y límite de detección (LD) de las mediciones de G.

Metodo	\mathcal{S}	r^2	LD
EGFET (I)	$6.36 \text{ (pA)}^{1/2}/(\text{mg/mL})$	0.9963	11.2 mg/mL
EGFET (V)	$0.34 \text{ mV}/(\text{mg/mL})$	0.9883	20.1 mg/dL
CA	$11.52 \text{ nA}/(\text{mg/dL})$	0.9923	16.2 mg/dL

Por último, se realizó una medición de la corriente I_{DS} en función del tiempo para las distintas soluciones de G, como se observa en la Figura 4.10. Con este experimento se evaluó la rapidez de respuesta y estabilidad del sensor de G. Dicha medición con voltajes $V_{DS} = 3.0 \text{ V}$ y $V_{REF} = 2.5 \text{ V}$, durante un intervalo de 1 minuto, para cada solución. En donde se puede apreciar que la rapidez de respuesta es casi instantánea, y las mediciones presentan una mínima variación, de aproximadamente $37 \mu\text{A}$, en el valor de la corriente I_{DS} . Con ésto, se pudo verificar la estabilidad de las mediciones con el Bio-FET para mediciones de concentración de G.

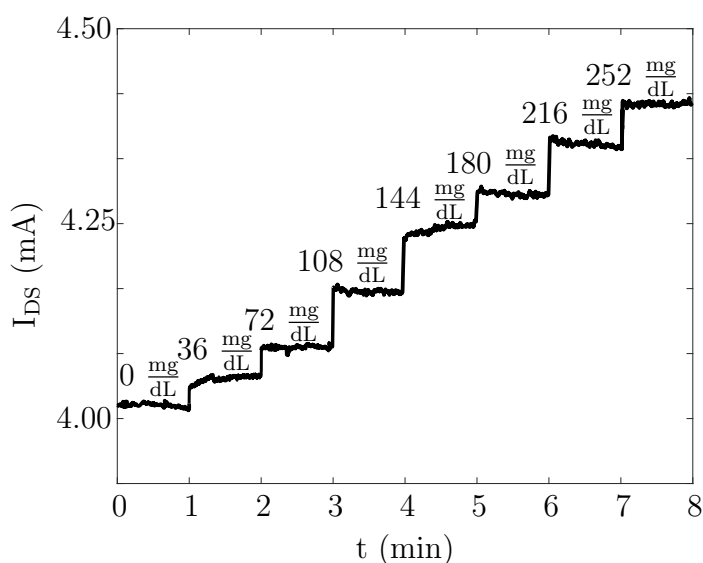


Figura 4.10: Medición de concentración de G en tiempo para evaluar la estabilidad del Bio-FET diseñado.

4.5. Medición de ferricianuro de potasio

El ferricianuro de potasio (KF) es una sal, soluble en agua, que funciona como catalizador para acelerar la transferencia de electrones en diferentes tipos de biosensores con el fin de aumentar la velocidad de reacción o generar una reacción tipo RedOx [76, 77].

El KF es usado como molécula RedOx en diferentes aplicaciones biológicas como detección de bacterias [78], virus [79], iones específicos [80], por mencionar las más conocidas. Por ello, y debido a su importancia en estas aplicaciones se realizó este experimento.

Para caracterizar, cualitativa y cuantitativamente, al Bio-FET como sensor de KF, se utilizaron seis soluciones a diferente concentración, mostradas en la Tabla 4.10. Las cuales fueron preparadas diluyendo KF en un electrolito soporte de cloruro de potasio (KCl) a 1 M.

Tabla 4.10: Soluciones preparadas para la caracterización del Bio-FET de KF.

Solución	KF (mM)
S1	0
S2	0.1
S3	0.5
S4	1.0
S5	5.0
S6	10.0

Experimentalmente, se utilizó un sistema de electrodos, formados por un electrodo de referencia de plata con aleación de cloruro de plata (Ag/AgCl) y un electrodo de trabajo de carbón (C). En donde, se colocó una muestra de 50 μL de cada disolución, cubriendo ambos electrodos, y después de cada medición se enjuagaron con agua destilada.

En la Figura 4.11(a) se muestra la curva de salida, en donde se tiene la corriente I_{DS} como función del voltaje V_{DS} , con un voltaje de referencia fijo en $V_{\text{REF}} = 2.5 \text{ V}$. En dicha curva, se observa una relación directa entre la corriente I_{DS} y el valor de concentración de KF, ya que la amplitud de la corriente I_{DS} aumenta al incrementar el valor de KF. Además, con una línea punteada se indica el valor de $V_{\text{DS}} = 3.0 \text{ V}$, en donde se toman los valores de I_{DS} para hacer la caracterización del Bio-FET de KF.

La Figura 4.11(b) muestra la curva de calibración del Bio-FET de KF, en donde se muestra como aumenta el valor de la raíz cuadrada de la corriente I_{DS} al aumentar el valor de KF, que se presenta en una escala logarítmica $\log_{10}(\text{KF})$, mostrando una relación directa entre ambos. Con la escala logarítmica no se puede considerar la solución de 0 mM, lo cual perjudica en el límite de detección (LD), pero beneficia en poder ajustar los datos experimentales a un modelo lineal. Dicho modelo se obtuvo con un coeficiente de determinación r^2 mayor de 98 %, lo que indica un comportamiento altamente lineal, una sensibilidad $\mathcal{S} = 1.25 (\mu\text{A})^{1/2}/\text{mM}$ y un LD = 0.1 mM. En la Figura 4.11(c) se muestra la curva de transferencia, en la cual se observa a la corriente I_{DS} como función del voltaje V_{REF} , para las diferentes soluciones de KF y con un voltaje fijo $V_{\text{DS}} = 1.5 \text{ V}$. Dicha curva muestra un desplazamiento hacia la izquierda en función del incremento de KF, lo que indica una relación inversa entre ellos. Para poder caracterizar el Bio-FET como sensor de KF se fijó un valor de corriente $I_{\text{DS}} = 1.5 \text{ mA}$, señalado con una línea punteada horizontal. Con ello, se obtuvo la curva de calibración, mostrada en la Figura 4.11, en donde se puede observar un decremento de V_{REF} conforme el valor de $\log_{10}(\text{KF})$ aumenta. Con los datos experimentales se obtuvo un modelo lineal con un $r^2 = 0.9714$, $\mathcal{S} = 64.6 \text{ mV/mM}$ y LD = 0.2 mM.

La técnica electroanalítica más usada para medir concentración de KF es la voltamperometría cíclica (CV: *cyclic voltammetry*) [77]. Por ello, usando un circuito potenciostato, se realizaron mediciones de CV, para cada solución, con los parámetros de voltaje inicial

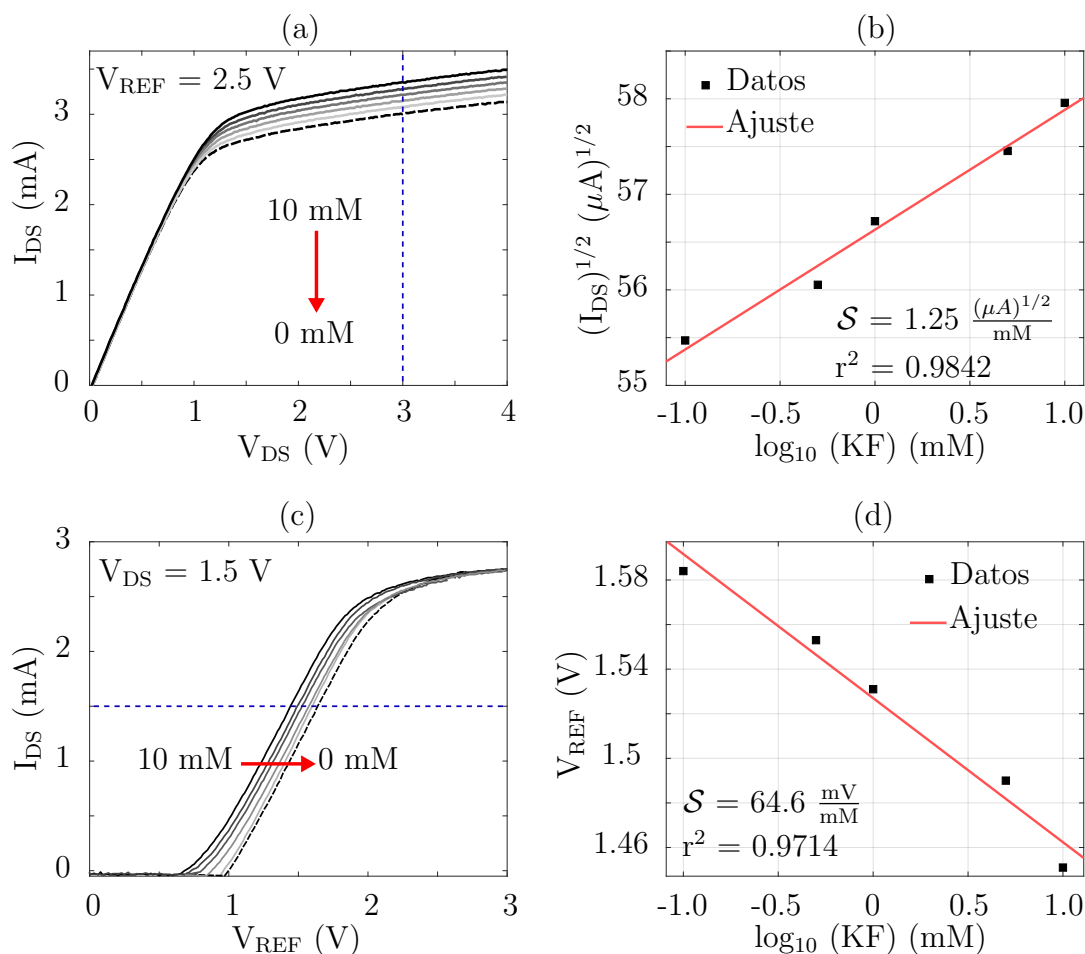


Figura 4.11: Resultados experimentales para la caracterización del Bio-FET de KF. (a) Curva de salida I_{DS} en función del voltaje V_{DS} , para los diferentes valores de KF y un valor fijo de V_{REF} . (b) Curva de calibración de la corriente I_{DS} en función de KF. (c) Curva de transferencia I_{DS} en función del voltaje V_{REF} para los diferentes valores de KF y un valor fijo de V_{DS} . (d) Curva de calibración para el voltaje V_{REF} en función de KF.

(V_{begin}), voltajes de vértice para el barrido directo (V_{V1}) e inverso (V_{V2}), incremento en el voltaje de barrido (V_{step}) y el tiempo con que ocurre el V_{step} conocido como *scan rate* (SR), todos estos mostrados en la Tabla 4.11.

En la Figura 4.12(a) se muestra el voltograma obtenido de la corriente I en función del potencial generado en el electrodo de referencia, de Ag/AgCl, para cada solución. En dicho voltograma se observa que existe un aumento en la amplitud de la corriente I en función del incremento de KF. En cada medición, se tomaron los valores de la corriente anódica (I_p), indicada con una marca cuadrada, con las cuales se obtuvo la curva de calibración. La Figura 4.12(b) muestra la curva de calibración, dicha curva muestra una relación directa y lineal entre el valor de I_p y el valor de KF, en escala logarítmica $\log_{10}(\text{KF})$, con un $r^2 = 0.9651$, $S = 4.02 \mu A/\text{mM}$ y un $LD = 0.2$ mM.

Con los parámetros obtenidos del Bio-FET diseñado en corriente (EGFET(I)), en voltaje

Tabla 4.11: Parámetros de la voltamperometría cíclica para medición de concentración de KF.

Parámetro	Valor
V_{begin}	0.1 V
V_{V1}	-0.4 V
V_{V2}	1.0 V
V_{step}	50.0 mV
SR	50.0 mV/s

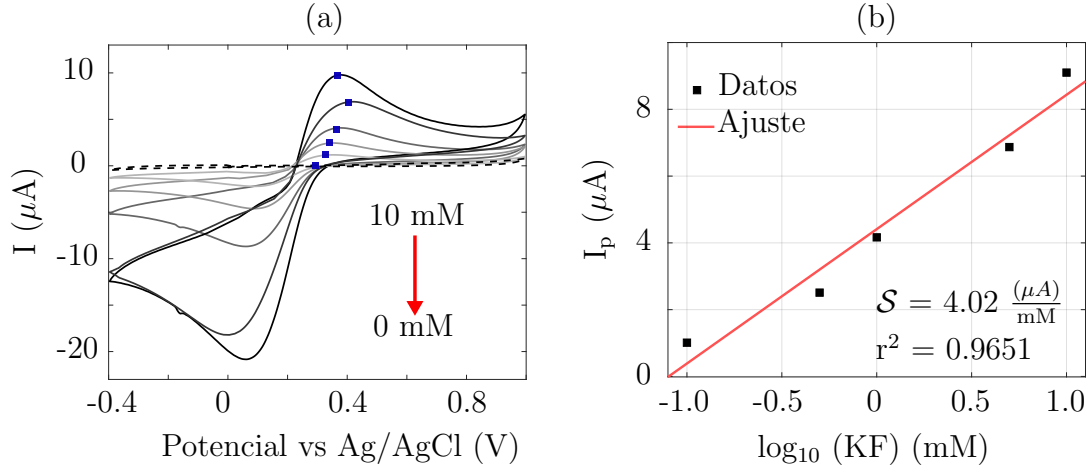


Figura 4.12: Resultados experimentales de mediciones de concentración de glucosa usando CV. (a) Voltagrama para los diferentes valores de KF. (b) Curva de calibración de la corriente pico en función de KF.

(EGFET(V)) y con la técnica de CV, mostrados en la Tabla 4.12, se pudo analizar y corroborar el desempeño del Bio-FET. Principalmente, se observa que el límite de detección (LD) se ve afectado por usar una escala logarítmica, la cual fue necesaria, debido a los valores de concentración de KF, para obtener un modelo lineal. El modelo lineal para las tres técnicas presentó un coeficiente de determinación mayor a 95 %, lo que indica un comportamiento altamente lineal para cuantificación de KF.

Tabla 4.12: Sensibilidad (\mathcal{S}), coeficiente de determinación (r^2) y límite de detección (LD) de las mediciones de KF.

Metodo	\mathcal{S}	r^2	LD
EGFET (I)	$1.25 (\mu\text{A})^{1/2}/\text{mM}$	0.9842	0.1 mM
EGFET (V)	64.6 mV/mM	0.9714	0.2 mM
CV	4.02 $\mu\text{A}/\text{mM}$	0.9651	0.2 mM

Finalmente, en la Figura 4.13, se muestra la medición de corriente I_{DS} para las distintas soluciones de KF en función del tiempo. Este experimento permitió evaluar la rapidez de respuesta y estabilidad del Bio-FET diseñado. La medición se realizó fijando los voltajes V_{DS}

= 3.0 V y $V_{\text{REF}} = 2.5$ V, para cada solución, durante 1 minuto cada una. Se puede observar, que la rapidez de respuesta es casi instantánea, y que las mediciones muestran una mínima varianza, de aproximadamente $10 \mu\text{A}$, en el valor de la corriente. Con ello, se pudo verificar la estabilidad de las mediciones del Bio-FET como sensor de KF.

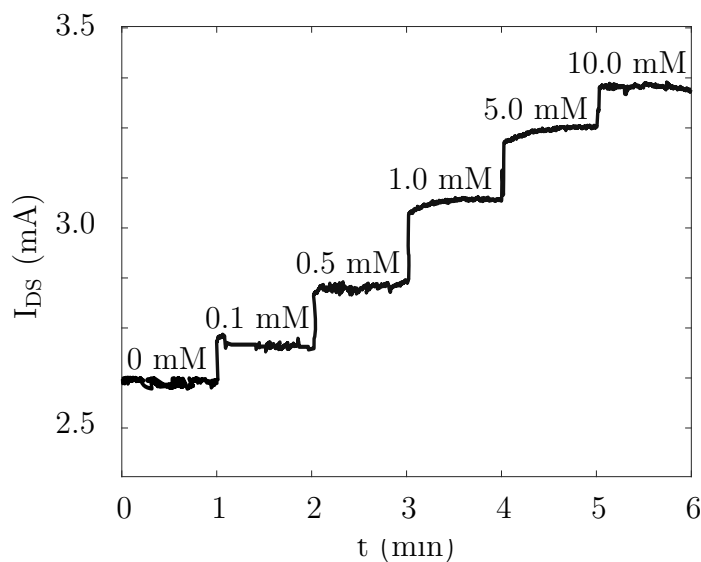


Figura 4.13: Medición de concentración de KF en tiempo para evaluar la estabilidad del Bio-FET diseñado.

4.6. Medición de azul de metileno

El azul de metileno (MB) es un colorante orgánico, que se utiliza para teñir cultivos u organismos biológicos, o como un agente catalizador. El MB, usado como molécula RedOx, se considera un catalizador catiónico; es decir, el MB cede electrones al promover una reacción RedOx [81]. El uso del MB como catalizador en aplicaciones biológicas fue la motivación de realizar este experimento. Por ejemplo, detección y cuantificación de nucleótidos [82], bacterias [83], virus [84], entre otros.

Para la caracterización del Bio-FET como sensor de MB, se usaron seis soluciones a diferente concentración, como se muestra en la Tabla 4.13. Dichas soluciones se prepararon diluyendo MB en *buffer* fosfato salino (PBS: *phosphate buffered saline*) al 0.1 M, usado como electrolito soporte.

Físicamente, las mediciones se hicieron con un sistema de electrodos, formado por un electrodo de referencia de plata con aleación de cloruro de plata (Ag/AgCl) y un electrodo de trabajo de carbón (C). En los cuales, se colocó una muestra de $50 \mu\text{L}$ de cada solución, sobre ambos electrodos, y posterior a cada medición se enjuagaron con agua destilada.

En la Figura 4.14(a) se observa la curva de salida, dicha curva muestra la corriente I_{DS} como función del voltaje V_{DS} , para un valor fijo de $V_{\text{REF}} = 2.5$ V. En dicha curva, se muestra una relación inversa entre la corriente I_{DS} y el valor de la concentración de MB, ya que la amplitud de la corriente I_{DS} disminuye al incrementar el valor de MB. Adicionalmente, para

Tabla 4.13: Soluciones preparadas para la caracterización del Bio-FET de MB.

Solución	MB (mM)
S1	0
S2	0.05
S3	0.10
S4	0.25
S5	0.50
S6	1.00

poder caracterizar al Bio-FET como sensor de MB, se fijó un valor de voltaje $V_{DS} = 2.5$ V indicado con una línea vertical punteada. En la Figura 4.14(b) se muestra la curva de calibración para el Bio-FET de MB, en donde se observa como disminuye el valor de la raíz cuadrada de la corriente I_{DS} en función del incremento de MB, lo que sigue una relación inversa. Los datos experimentales se ajustaron a un modelo lineal, con el que se obtuvo un coeficiente de determinación, r^2 , mayor a 96 %, lo cual indica un comportamiento lineal del sensor. Además, se obtuvo una sensibilidad de $\mathcal{S} = 1.45 (\mu A)^{1/2}/mM$ y un límite de detección $LD = 0.10$ mM.

En la Figura 4.14(c) se muestra la curva de transferencia, de la corriente I_{DS} como función del voltaje V_{REF} , con un voltaje $V_{DS} = 1.5$ V. La curva de transferencia presenta un desplazamiento hacia la derecha en función del incremento de MB. Para obtener la curva de calibración del Bio-FET de MB, se fijó un valor de corriente $I_{DS} = 1.0$ mA como se señala con la línea punteada. En la curva de calibración, de la Figura 4.14(d), se observa un decremento en el valor del voltaje V_{REF} en función del incremento de MB. Los datos experimentales se ajustaron a un modelo lineal con un $r^2 = 0.9648$, $\mathcal{S} = 82.7$ mV/mM y $LD = 0.10$ mM.

Dentro de las técnicas electroanalíticas, para reacciones tipo RedOx, la voltamperometría de onda cuadrada (SWV: *square wave voltammetry*) es una de las más utilizadas para medir concentración de MB [85]. Por ello, mediante un circuito potenciostato, se realizaron mediciones de SWV para cada solución de MB, con parámetros de voltaje de inicio (V_{begin}), voltaje final (V_{end}), incremento de voltaje de barrido (V_{step}), amplitud de la señal cuadrada (Amp) y frecuencia (f), con los valores mostrados en la Tabla 4.14.

Tabla 4.14: Parámetros de la voltamperometría de onda cuadrada para medición de concentración de MB.

Parámetro	Valor
V_{begin}	0 V
V_{end}	-0.5 V
V_{step}	5.0 mV
Amp	5.0 mV
f	5.0 Hz

El voltagrama obtenido, mostrado en la Figura 4.15(a), muestra la corriente I en función del potencial generado en el electrodo de referencia, de Ag/AgCl, para cada solución de MB.

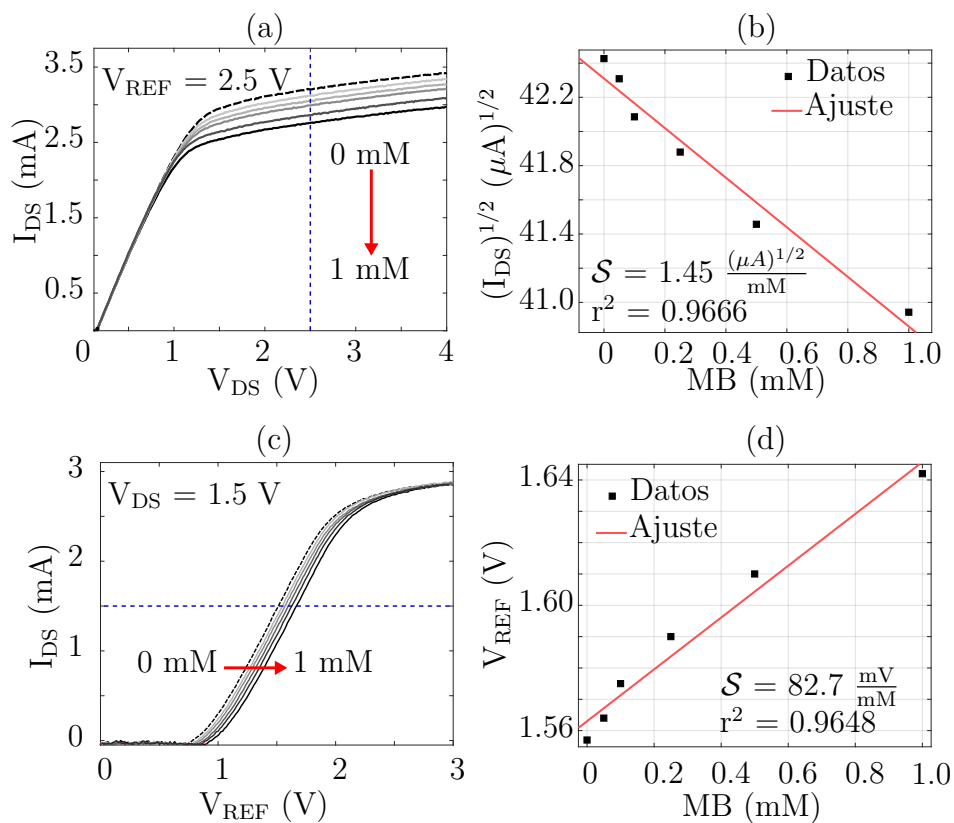


Figura 4.14: Resultados experimentales para la caracterización del Bio-FET de MB. (a) Curva de salida I_{DS} en función del voltaje V_{DS} , para los diferentes valores de MB y un valor fijo de V_{REF} . (b) Curva de calibración de la corriente I_{DS} en función de MB. (c) Curva de transferencia I_{DS} en función del voltaje V_{REF} para los diferentes valores de MB y un valor fijo de V_{DS} . (d) Curva de calibración para el voltaje V_{REF} en función de MB.

Se puede observar que existe un aumento en la amplitud de la corriente I en función del aumento del valor de MB. En cada medición, se tomó el valor de la corriente anódica (I_p), señalada con una marca cuadrada, para obtener la curva de calibración de la Figura 4.15(b). En dicha curva se puede observar que la corriente I aumenta linealmente en función del incremento de MB, con un r^2 muy cercano a 100%, $S = 0.49 \mu A/mM$ y $LD = 0.06$ mM.

En la Tabla 4.15, se muestran los parámetros de caracterización del Bio-FET en corriente (EGFET(I)), en voltaje (EGFET(V)) y con SWV, que permiten analizar y corroborar el desempeño del Bio-FET diseñado. En donde, se puede observar que el LD para el Bio-FET, en corriente y voltaje, es mayor al de SWV; sin embargo, no afecta a la medición debido a que el mínimo valor de concentración de las soluciones es 0.10 mM, mismo valor obtenido del LD para el Bio-FET diseñado.

Por último, en la Figura 4.16, se muestra la medición de corriente I_{DS} en función del tiempo para las distintas soluciones de MB. Dicho experimento permitió evaluar la rapidez de respuesta y estabilidad del Bio-FET de MB. Esta medición se realizó para cada solución, con voltajes fijos de $V_{DS} = 3.0$ V y $V_{REF} = 2.5$ V, durante un intervalo de 1 minuto. En donde se puede observar que la rapidez de respuesta es casi instantánea, y las mediciones

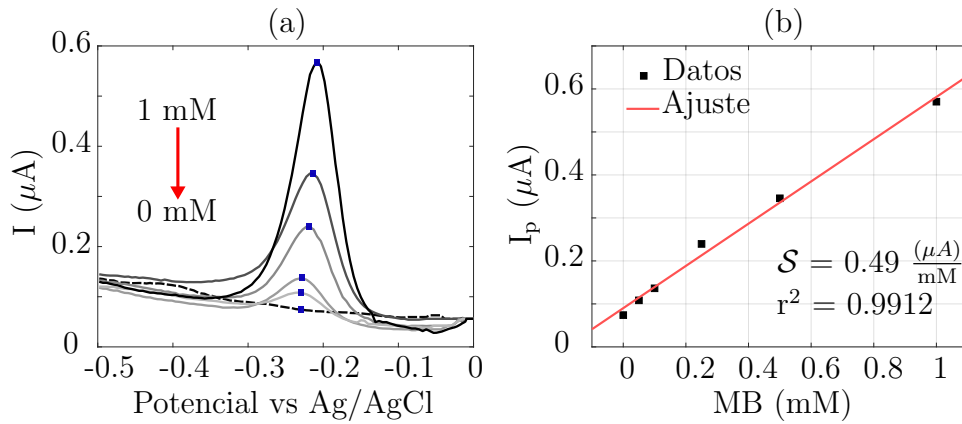


Figura 4.15: Resultados experimentales de mediciones de concentración de glucosa usando SWV. (a) Voltagrama para los diferentes valores de MB. (b) Curva de calibración de la corriente pico en función de MB.

Tabla 4.15: Sensibilidad (\mathcal{S}), coeficiente de determinación (r^2) y límite de detección (LD) de las mediciones de MB.

Metodo	\mathcal{S}	r^2	LD
EGFET (I)	$1.45 (\mu\text{A})^{1/2}/\text{mM}$	0.9666	0.10 mM
EGFET (V)	82.7 mV/mM	0.9648	0.10 mM
SWV	$0.49 \mu\text{A}/\text{mM}$	0.9912	0.06 mM

presentan una mínima varianza, de aproximadamente $24 \mu\text{A}$, en el valor de I_{DS} . Con ello, se pudo verificar que las mediciones con el Bio-FET de MB tienen estabilidad.

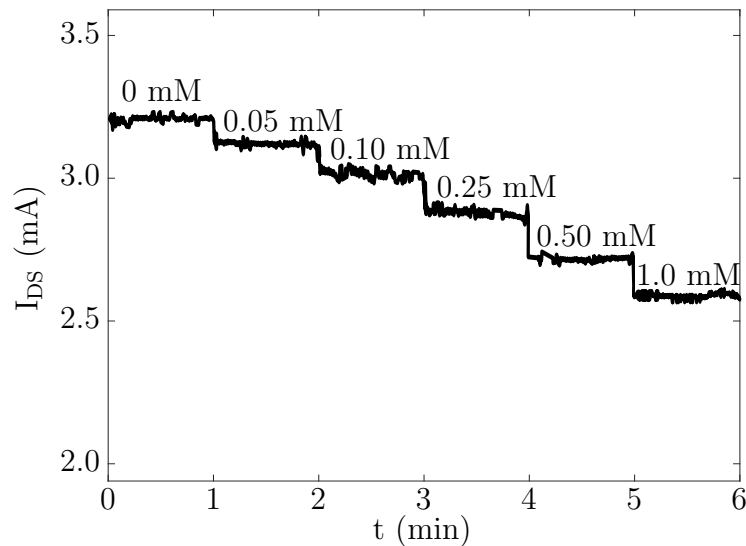


Figura 4.16: Medición de concentración de MB en tiempo para evaluar la estabilidad del Bio-FET diseñado.

En este capítulo se presentaron los resultados experimentales de este trabajo, en donde se caracterizó al Bio-FET como sensor con el fin de medir concentración de iones hidrógeno, ácido ascórbico, glucosa, ferricianuro de potasio y azul de metileno. Además, para cada aplicación, se muestra una medición con la técnica electroanalítica más adecuada, que sirvió para comparar y evaluar el desempeño del Bio-FET diseñado. Esto permitió observar que el Bio-FET, como sensor, tiene un comportamiento altamente lineal, alta sensibilidad, y límite de detección en el mismo orden de magnitud al de las técnicas convencionales. Además, el Bio-FET presentó, para todas las aplicaciones, alta rapidez de respuesta y estabilidad en las mediciones. Por ello, el Bio-FET como sensor de concentración es una herramienta robusta, confiable y modular, que usa la misma técnica para cuantificar concentración de diferentes analitos.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se abordó el diseño de un biosensor electroquímico con base en un transistor de efecto de campo (Bio-FET), integrando un transistor convencional con un sistema de electrodos serigrafados, de geometría plana, para medición de concentración en muestras microvolumétricas. La estructura del Bio-FET permitió intercambiar los electrodos de forma modular para medir diferentes analitos sin necesidad de modificaciones. Además, se desarrolló un novedoso, accesible y compacto sistema de instrumentación capaz de caracterizar un Bio-FET. El usar un Bio-FET como sensor de concentración, permitió demostrar la capacidad de éste ante las técnicas electroanalíticas convencionales, ya que el Bio-FET funciona bajo la misma técnica y puede caracterizar, cuantitativa y cualitativamente, distintos procesos electroquímicos en un analito. Para evaluar el comportamiento y desempeño del Bio-FET, debido a que no existe un Bio-FET semejante disponible comercialmente, se comparó con mediciones electroanalíticas convencionales mediante un circuito potenciostato comercial; aunque ambos utilizan la transducción electroquímica no es posible compararlos directamente. Por ello, la comparación se hizo mediante el límite de detección de las mediciones electroquímicas y del Bio-FET. Finalmente, se demostró, experimentalmente, la capacidad del Bio-FET como sensor de concentración en catalizadores usados en aplicaciones biológicas. Experimentalmente, fue posible cuantificar concentración de iones hidrógeno (pH), ácido ascórbico, glucosa, ferricianuro de potasio y azul de metileno.

En cuanto al sistema de instrumentación, se logró implementar un diseño portable, accesible y funcional, que permitió generar, adquirir y procesar las señales necesarias para caracterizar al Bio-FET como sensor de concentración. Dicho sistema resultó novedoso ante la instrumentación convencional, debido a que se usó como elemento central de procesamiento un dispositivo *Programmable System-On-Chip* que permitió la configuración e implementación de *hardware* mediante *software*, en un mismo chip. Esto permite proporcionar un sistema de instrumentación con la robustez necesaria para caracterizar un Bio-FET, buscando un enfoque de implementación sencillo y accesible.

En la medición de concentración de iones hidrógeno se utilizaron cinco soluciones *buffer*, con un rango de valor de pH de 2 a 9. Dichas soluciones fueron caracterizadas con un

sistema de electrodos formados por un electrodo de referencia de plata con una aleación de cloruro de plata (Ag/AgCl) y un electrodo de trabajo de ITO (*Indium Tin Oxide*). Sobre los electrodos se colocó una muestra de 50 μL de cada *buffer*. Posteriormente se obtuvieron las curvas de salida y transferencia del Bio-FET, para obtener sus curvas de calibración tanto en corriente como en voltaje. Los datos obtenidos con el Bio-FET como sensor de pH, en corriente, se ajustaron a un modelo lineal con un coeficiente de determinación mayor al 99 %, una sensibilidad de $1.16 (\mu\text{A})^{1/2}/\text{pH}$ y un límite de detección de 0.8. Por otro lado, en la curva de calibración de voltaje, se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.9883, sensibilidad de $53.2 \text{ mV}/\text{pH}$ y un límite de detección de 1.1. Posteriormente, con la finalidad de evaluar el desempeño del sensor, se usó la técnica de potenciometría de circuito abierto (OCP) con la que se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.9307, sensibilidad de $21.8 \text{ mV}/\text{pH}$ y límite de detección de 2.8; con esto se observó que en este caso el Bio-FET es una mejor herramienta para cuantificar pH. Finalmente, se realizó una medición de corriente en función del tiempo para los distintos valores de pH, para evaluar la rapidez de respuesta y estabilidad del Bio-FET diseñado. Esta medición se hizo durante un minuto, para cada *buffer*, y se obtuvo una respuesta casi instantánea con una mínima varianza en el valor de la corriente medida, de aproximadamente $5.6 \mu\text{A}$. Lo que indica que el Bio-FET como sensor de pH posee estabilidad en las mediciones.

Para la medición de ácido ascórbico (AA) se prepararon 6 soluciones de AA a diferente concentración, entre 0 y 10 mM, diluyendo en un electrolito soporte de cloruro de potasio (KCl). En este experimento se usó un sistema de electrodos formados por un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo de trabajo de carbón (C). En el sistema de electrodos se colocó una muestra de 50 μL , de cada solución, para hacer las mediciones. Se obtuvieron las curvas características del Bio-FET, con las que fue posible realizar las curvas de calibración. La curva de calibración del Bio-FET como sensor de AA, en mediciones de corriente, presentó un coeficiente de determinación cercano al 100 %, una sensibilidad de $0.53 (\mu\text{A})^{1/2}/\text{mM}$ y un límite de detección de 0.9 mM. Mientras que en mediciones de voltaje, se obtuvo un coeficiente de determinación mayor a 99 %, una sensibilidad de $20.5 \text{ mV}/\text{mM}$ y un límite de detección de 0.6 mM. Adicionalmente, para analizar y evaluar el comportamiento del Bio-FET como sensor de AA, se realizó la caracterización usando la técnica de voltamperometría cíclica (CV) con la que se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.9832, sensibilidad de $3.68 \mu\text{A}/\text{mM}$ y límite de detección de 1.1 mM. Esta comparación indica, que para mediciones de concentración de AA, a pesar del comportamiento altamente lineal de los tres métodos, el Bio-FET ofrece mediciones de concentraciones menores en comparación con la CV, lo que se observa en el valor del límite de detección. Por último, para evaluar la rapidez de respuesta y estabilidad de las mediciones del Bio-FET, se hizo una medición de corriente en el tiempo para las distintas soluciones. Cada solución se midió por un intervalo de un minuto; con ello, se pudo apreciar una respuesta cuasi-instantánea y una variación mínima de $\sim 20 \mu\text{A}$, en el valor de la corriente. Con ello, se puede verificar la estabilidad de las mediciones con el Bio-FET para cuantificación de AA.

Por su parte, la medición de glucosa (G) se llevo a cabo preparando 8 soluciones a diferente concentración, entre 0 y 252 mg/dL, diluyendo G sobre un electrolito soporte de cloruro de sodio (NaCl). Para este experimento se utilizaron tiras reactivas comerciales, One Touch Ultra Blue, que estan formadas por un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo

de trabajo de C con glucosa oxidasa (GOx), inmovilizada sobre su superficie. Experimentalmente, se colocaron 50 μL sobre la tira reactiva, de cada solución. Se obtuvieron las curvas de salida y transferencia del Bio-FET, para obtener las curvas de calibración que los describen como sensor de G. La curva de calibración, de corriente, para el Bio-FET describe un comportamiento lineal con un coeficiente de determinación de 0.9963, una sensibilidad de 6.36 (pA)^{1/2}/(mg/dL) y límite de detección de 11.2 mg/dL. Por otro lado, para mediciones de voltaje, los datos se ajustaron a un modelo lineal con un coeficiente de determinación mayor al 98 %, una sensibilidad de 0.34 mV/(mg/dL) y un límite de detección de 20.1 mg/dL. Posteriormente, se realizaron mediciones usando la técnica electroanalítica llamada cronamperometría (CA), que permitió evaluar el desempeño y comportamiento del Bio-FET como sensor de G. Con CA se obtuvo un modelo lineal con coeficiente de determinación cercano al 100 %, sensibilidad de 11.52 nA/(mg/dL) y límite de detección de 16.2 mg/dL. Esto indica que el valor del límite de detección, en los tres métodos, está en el mismo orden de magnitud, incluso, es menor para el caso del Bio-FET, lo que indica que éste es una herramienta adecuada para cuantificación de G en soluciones muy diluidas. Finalmente, se realizó una medición de corriente en función del tiempo para las distintas soluciones de G, durante un minuto cada una. En dicho experimento, se observó una respuesta instantánea y una varianza mínima en el valor de la corriente de $\sim 37 \mu\text{A}$; con esto, se puede verificar la estabilidad de las mediciones con el Bio-FET como sensor de concentración de G.

En cuanto a la medición de ferricianuro de potasio (KF), para caracterizar al Bio-FET como sensor de KF, se prepararon seis soluciones a diferente concentración, entre 0 y 10 mM, que se fueron preparadas con un electrolito soporte de KCl. Experimentalmente, se utilizó un sistema de electrodos, formados por un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo de trabajo de C. En donde, se colocó una muestra de 50 μL de cada solución, cubriendo ambos electrodos. Se obtuvieron las curvas características del Bio-FET, y las curvas de calibración tanto en corriente como en voltaje. Para ambas curvas, por los valores de concentración usados, fue necesario usar una escala logarítmica en el eje de la concentración, lo que afectó directamente al límite de detección, pero ayudó a ajustar los datos experimentales a un modelo lineal. La curva de calibración de corriente presentó un coeficiente de determinación de 0.9842, una sensibilidad de 1.25 (μA)^{1/2}/mM y un límite de detección de 0.1 mM. Y en voltaje, se obtuvo un modelo lineal con coeficiente de determinación de 0.9714, sensibilidad de 64.6 mV/mM y límite de detección de 0.2 mM. Adicionalmente, con la finalidad de evaluar y analizar el desempeño del Bio-FET como sensor de KF, mediante un circuito potenciostato se hicieron mediciones de CV para las diferentes soluciones. En donde, los datos experimentales se ajustaron a un modelo lineal con coeficiente de determinación mayor al 96 %, sensibilidad de 4.02 μA /mM y límite de detección de 0.2 mM. Esto permitió observar que para las tres técnicas el límite de detección es del mismo orden de magnitud, y que usar la escala logarítmica de concentración permitió un comportamiento altamente lineal. Por último, se realizó una medición de corriente para las distintas soluciones de KF en función del tiempo. Con la finalidad de evaluar la rapidez de respuesta y estabilidad del Bio-FET diseñado. Dicha medición se hizo durante un minuto, para cada solución. Y se puede observar una respuesta cuasi-instantánea y una variación mínima en el valor de la corriente de $\sim 10 \mu\text{A}$. Con base en ello, se demostró la estabilidad de las mediciones hechas con el Bio-FET para cuantificar concentración de KF.

Como último experimento, se midió concentración de azul de metileno (MB), preparando seis soluciones a diferente concentración, entre 0 y 1 mM, usando un *buffer* fosfato salino (PBS) como electrolito soporte. La caracterización del Bio-FET como sensor de MB, se hizo con un sistema de electrodos compuestos por un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo de trabajo de C. En los cuales, se depositó una muestra de 50 μL que cubriera ambos electrodos para hacer las mediciones y obtener las curvas de salida y transferencia del Bio-FET. Con dichas curvas, se obtuvieron las curvas de calibración con mediciones en corriente y voltaje. En corriente, los datos experimentales se ajustaron a un modelo lineal con un coeficiente de determinación de 0.9666, una sensibilidad de $1.45 (\mu\text{A})^{1/2}$ y un límite de detección de 0.10 mM. Por otro lado, en la curva de calibración de voltaje se obtuvo un valor de 0.9648 para el coeficiente de determinación, una sensibilidad de 82.7 mV/mM y un límite de detección de 0.10 mM. Posteriormente, se realizaron mediciones de voltamperometría de onda cuadrada (SWV) para evaluar el comportamiento y desempeño del Bio-FET para cuantificar concentración de MB. Con las mediciones de SWV se obtuvo una curva de calibración lineal con un coeficiente de determinación mayor al 99%, sensibilidad de $0.49 \mu\text{A}/\text{mM}$ y límite de detección, menor al del Bio-FET, de 0.06 mM. Con base en ello, se puede observar que para esta aplicación la técnica SWV es una mejor herramienta para medir concentraciones bajas por tener un valor menor de límite de detección. Finalmente, con el fin de evaluar y analizar el comportamiento del Bio-FET como sensor de MB, se realizó una medición de corriente en función de tiempo, con intervalos de un minuto para cada solución; en donde, se pudo observar una respuesta casi instantánea y una varianza mínima de aproximadamente $24 \mu\text{A}$, en el valor de corriente. Por ello, se pudo verificar que las mediciones de concentración de MB con el Bio-FET diseñado presentan estabilidad.

El presente trabajo de investigación ha dado pauta para seguir explorando el desarrollo de biosensores FET, mencionando que es un trabajo novedoso y original del que no se tiene conocimiento que existan algo similar en la universidad, y que pretende ser la base de futuros trabajos de investigación. Además, por ser un tema que engloba muchas áreas de conocimiento, tiene la potencialidad de generar recursos y aplicaciones multidisciplinarias que contribuyan a la generación de conocimiento y productos para el beneficio de la sociedad.

En el caso del biosensor, es posible mejorarlo en términos de tamaño, con el fin de obtener electrodos y transistores de dimensiones menores que permitan mediciones de concentración en muestras micro y/o nanovolumétricas, lo que permitirá disminuir el límite de detección y medir concentraciones en el orden de 10^{-6} a 10^{-9} M. Por otro lado, el sistema de medición, es posible mejorarlo en términos de tamaño, con el fin de generar un dispositivo bioelectrónico en donde el biosensor este embebido con su sistema de instrumentación, lo que mejoraría la sensibilidad, estabilidad y repetibilidad de las mediciones. Respecto a la técnica de medición, es posible aplicar novedosas y robustas técnicas que incrementen las prestaciones de los Bio-FET, por ejemplo, integrar el Bio-FET en circuitos osciladores que permitirán convertir la señal de corriente en una de frecuencia, aumentando la sensibilidad, resolución y rango de operación en las mediciones; o el implementar análisis de impedancia usando el Bio-FET como elemento transductor, para estudiar fenómenos electroquímicos del analito, que sólo se presentan en señales de corriente alterna en un rango de frecuencia de 10^{-1} a 10^5 Hz.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] N. J. Ronkainen, H. B. Halsall y W. R. Heineman, “Electrochemical biosensors,” *Chemical Society Reviews*, vol. 39, n.º 5, págs. 1747-1763, 2010.
- [2] J. Kim, A. S. Campbell, B. E.-F. de Ávila y J. Wang, “Wearable biosensors for health-care monitoring,” *Nature biotechnology*, vol. 37, n.º 4, págs. 389-406, 2019.
- [3] X. Zhang, H. Ju y J. Wang, *Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications*. Academic Press, 2011.
- [4] R. Ding, Y. H. Cheong, A. Ahamed y G. Lisak, *Heavy metals detection with paper-based electrochemical sensors*, 2021.
- [5] D. Kleimaier, V. Schepkin, C. Nies, E. Gottwald y L. R. Schad, “Intracellular Sodium Changes in Cancer Cells Using a Microcavity Array-Based Bioreactor System and Sodium Triple-Quantum MR Signal,” *Processes*, vol. 8, n.º 10, pág. 1267, 2020.
- [6] P. Pirovano, M. Dorrian, A. Shinde, A. Donohoe, A. J. Brady, N. M. Moyna, G. Wallace, D. Diamond y M. McCaul, “A wearable sensor for the detection of sodium and potassium in human sweat during exercise,” *Talanta*, vol. 219, pág. 121 145, 2020.
- [7] A. Ebrahimi, J. Scott y K. Ghorbani, “Microwave reflective biosensor for glucose level detection in aqueous solutions,” *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 301, pág. 111 662, 2020.
- [8] S. Han, W. Liu, M. Zheng y R. Wang, “Label-free and ultrasensitive electrochemical DNA biosensor based on urchinlike carbon nanotube-gold nanoparticle nanoclusters,” *Analytical chemistry*, vol. 92, n.º 7, págs. 4780-4787, 2020.
- [9] D. Rodrigues, A. I. Barbosa, R. Rebelo, I. K. Kwon, R. L. Reis y V. M. Correlo, “Skin-integrated wearable systems and implantable biosensors: A comprehensive review,” *Biosensors*, vol. 10, n.º 7, pág. 79, 2020.
- [10] P. Mehrotra, B. Chatterjee y S. Sen, “EM-wave biosensors: A review of RF, microwave, mm-wave and optical sensing,” *Sensors*, vol. 19, n.º 5, pág. 1013, 2019.
- [11] C. Chen, Y. Guo, P. Chen y H. Peng, “Recent advances of tissue-interfaced chemical biosensors,” *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 8, n.º 16, págs. 3371-3381, 2020.

- [12] C. Chen y J. Wang, "Optical biosensors: An exhaustive and comprehensive review," *Analyst*, vol. 145, n.º 5, págs. 1605-1628, 2020.
- [13] C. Jang, H.-J. Lee y J.-G. Yook, "Radio-Frequency Biosensors for Real-Time and Continuous Glucose Detection," *Sensors*, vol. 21, n.º 5, pág. 1843, 2021.
- [14] I. Piekarz, S. Górska, S. Odrobina, M. Drab, K. Wincza, A. Gamian y S. Gruszczynski, "A microwave matrix sensor for multipoint label-free *Escherichia coli* detection," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 147, pág. 111 784, 2020.
- [15] C. Zhang, L. Huang, H. Pu y D.-W. Sun, "Magnetic surface-enhanced Raman scattering (MagSERS) biosensors for microbial food safety: Fundamentals and applications," *Trends in Food Science & Technology*, 2021.
- [16] E. Cesewski y B. N. Johnson, "Electrochemical biosensors for pathogen detection," *Biosensors and Bioelectronics*, pág. 112 214, 2020.
- [17] M. J. Russo, M. Han, P. E. Desroches, C. S. Manasa, J. Dennaoui, A. F. Quigley, R. M. Kapsa, S. E. Moulton, R. M. Guijt, G. W. Greene y col., "Antifouling Strategies for Electrochemical Biosensing: Mechanisms and Performance toward Point of Care Based Diagnostic Applications," *ACS sensors*, vol. 6, n.º 4, págs. 1482-1507, 2021.
- [18] M. Kaisti, "Detection principles of biological and chemical FET sensors," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 98, págs. 437-448, 2017.
- [19] S. A. Pullano, N. T. Tasneem, I. Mahbub, S. Shamsir, M. Greco, S. K. Islam y A. S. Fiorillo, "Deep submicron EGFET based on transistor association technique for chemical sensing," *Sensors*, vol. 19, n.º 5, pág. 1063, 2019.
- [20] A. M. Khalifa, S. Abdulateef, E. Kabaa, N. M. Ahmed y F. A. Sabah, "Study of acidosis, neutral and alkalosis media effects on the behaviour of activated carbon threads decorated by zinc oxide using extended gate FET for glucose sensor application," *Materials Science in Semiconductor Processing*, vol. 108, pág. 104 911, 2020.
- [21] S. Wang, M. Z. Hossain, K. Shinozuka, N. Shimizu, S. Kitada, T. Suzuki, R. Ichige, A. Kuwana y H. Kobayashi, "Graphene field-effect transistor biosensor for detection of biotin with ultrahigh sensitivity and specificity," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 165, pág. 112 363, 2020.
- [22] Y. Xia, Y. Sun, H. Li, S. Chen, T. Zhu, G. Wang, B. Man, J. Pan y C. Yang, "Plasma treated graphene FET sensor for the DNA hybridization detection," *Talanta*, vol. 223, pág. 121 766, 2021.
- [23] G. Seo, G. Lee, M. J. Kim, S.-H. Baek, M. Choi, K. B. Ku, C.-S. Lee, S. Jun, D. Park, H. G. Kim y col., "Rapid detection of COVID-19 causative virus (SARS-CoV-2) in human nasopharyngeal swab specimens using field-effect transistor-based biosensor," *ACS nano*, vol. 14, n.º 4, págs. 5135-5142, 2020.
- [24] S. Hong, M. Wu, Y. Hong, Y. Jeong, G. Jung, W. Shin, J. Park, D. Kim, D. Jang y J.-H. Lee, "FET-type gas sensors: a review," *Sensors and Actuators B: Chemical*, pág. 129 240, 2020.

-
- [25] P. Sharma, S. Gupta, R. Singh, K. Ray, S. Kothari, S. Sinha, R. Sharma, R. Mukhiya, K. Awasthi y M. Kumar, "Hydrogen ion sensing characteristics of Na₃BiO₄-Bi₂O₃ mixed oxide nanostructures based EGFET pH sensor," *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 45, n.º 37, págs. 18 743-18 751, 2020.
- [26] N. Mandal, V. Pakira, N. Samanta, N. Das, S. Chakraborty, B. Pramanick y C. Roy-Chaudhuri, "PSA detection using label free graphene FET with coplanar electrodes based microfluidic point of care diagnostic device," *Talanta*, vol. 222, pág. 121 581, 2021.
- [27] Y. Xu, H. Tavakkoli, J. Xu e Y.-K. Lee, "A Low-drift Extended-Gate Field Effect Transistor (EGFET) with Differential Amplifier for Cordyceps Sinensis DNA Detection Optimized by g m/I D Theory," en *2020 IEEE 15th International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular System (NEMS)*, IEEE, 2020, págs. 398-401.
- [28] W.-S. Kao, Y.-W. Hung y C.-H. Lin, "Solid-State Sensor Chip Produced with Single Laser Engraving for Urine Acidity and Total Dissolved Ion Detections," *ECS Journal of Solid State Science and Technology*, vol. 9, n.º 11, pág. 115 016, 2020.
- [29] L.-C. Chen, E. Wang, C.-S. Tai, Y.-C. Chiu, C.-W. Li, Y.-R. Lin, T.-H. Lee, C.-W. Huang, J.-C. Chen y W. L. Chen, "Improving the reproducibility, accuracy, and stability of an electrochemical biosensor platform for point-of-care use," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 155, pág. 112 111, 2020.
- [30] P. R. Coulet y L. J. Blum, *Biosensor principles and applications*. CRC Press, 2019.
- [31] J. B. Allen y R. F. Larry, *Electrochemical methods fundamentals and applications*. John Wiley & Sons, 2001.
- [32] D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös y E. Reimhult, "Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures," *Sensors*, vol. 8, n.º 3, págs. 1400-1458, 2008.
- [33] E Lojou y P Bianco, "Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices," *Journal of Electroceramics*, vol. 16, n.º 1, págs. 79-91, 2006.
- [34] M. Pohanka y P. Skládal, "Electrochemical biosensors-principles and applications.," *Journal of applied biomedicine*, vol. 6, n.º 2, 2008.
- [35] Y. Shao, Y. Ying y J. Ping, "Recent advances in solid-contact ion-selective electrodes: functional materials, transduction mechanisms, and development trends," *Chemical Society Reviews*, vol. 49, n.º 13, págs. 4405-4465, 2020.
- [36] V. Naresh y N. Lee, "A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors," *Sensors*, vol. 21, n.º 4, pág. 1109, 2021.
- [37] W. Zhang, R. Wang, F. Luo, P. Wang y Z. Lin, "Miniaturized electrochemical sensors and their point-of-care applications," *Chinese Chemical Letters*, vol. 31, n.º 3, págs. 589-600, 2020.
- [38] F. Allard, G. Soucy y L. Rivoaland, "Formation of deposits on the cathode surface of aluminum electrolysis cells," *Metallurgical and Materials Transactions B*, vol. 45, n.º 6, págs. 2475-2485, 2014.
-

- [39] P Irving, R Cecil y M. Yates, “MYSTAT: A compact potentiostat/galvanostat for general electrochemistry measurements,” *HardwareX*, vol. 9, e00163, 2021.
- [40] O. S. Hoilett, J. F. Walker, B. M. Balash, N. J. Jaras, S. Boppana y J. C. Linnes, “KickStat: A coin-sized potentiostat for high-resolution electrochemical analysis,” *Sensors*, vol. 20, n.º 8, pág. 2407, 2020.
- [41] N. P. Shetti, S. J. Malode, S. Roy, P. Chandra, K. R. Reddy y S. Chatterjee, “Electro-analytical techniques for investigating biofilms: Applications in biosensing and biomolecular interfacing,” en *Nanomaterials in Diagnostic Tools and Devices*, Elsevier, 2020, págs. 293-329.
- [42] C.-A. Vu y W.-Y. Chen, “Field-effect transistor biosensors for biomedical applications: recent advances and future prospects,” *Sensors*, vol. 19, n.º 19, pág. 4214, 2019.
- [43] P. R. Gray, R. G. Meyer y col., *Analysis and design of analog integrated circuits*. Wiley New York, 1984, vol. 4.
- [44] S. A. Pullano, C. D. Critello, I. Mahbub, N. T. Tasneem, S. Shamsir, S. K. Islam, M. Greco y A. S. Fiorillo, “EGFET-based sensors for bioanalytical applications: A review,” *Sensors*, vol. 18, n.º 11, pág. 4042, 2018.
- [45] T. Wadhwa, D. Kakkar, G. Wadhwa y B. Raj, “Recent advances and progress in development of the field effect transistor biosensor: A review,” *Journal of Electronic Materials*, vol. 48, n.º 12, págs. 7635-7646, 2019.
- [46] C. Martínez-Domingo, S. Conti, A. De La Escosura-Muñiz, L. Terés, A. Merkoçi y E. Ramon, “Organic-based field effect transistors for protein detection fabricated by inkjet-printing,” *Organic Electronics*, vol. 84, pág. 105 794, 2020.
- [47] N. Shafi, J. S. Parmaar, A. Porwal, A. M. Bhat, C. Sahu, C Periasamy y S. Majumdar, “Back Gate Tunable Thin Film a-Si Nanowire BioFET for pH Detection By Compatible CMOS Fabrication Process,” en *2020 4th IEEE Electron Devices Technology & Manufacturing Conference (EDTM)*, IEEE, 2020, págs. 1-4.
- [48] S. Papamatthaiou, P. Estrela y D. Moschou, “Printable graphene BioFETs for DNA quantification in Lab-on-PCB microsystems,” *Scientific reports*, vol. 11, n.º 1, págs. 1-9, 2021.
- [49] J.-S. Benas, L. Veeramuthu, Y.-Y. Chuang, S.-Y. Chuang, F.-C. Liang, C.-J. Cho, W.-Y. Lee, Y. Yan, Y. Zhou y C.-C. Kuo, “Eco-friendly collagen-based bio-organic field effect transistor with improved memory characteristics,” *Organic Electronics*, vol. 86, pág. 105 925, 2020.
- [50] F. Bellando, L. J. Mele, P. Palestri, J. Zhang, A. M. Ionescu y L. Selmi, “Sensitivity, Noise and Resolution in a BEOL-Modified Foundry-Made ISFET with Miniaturized Reference Electrode for Wearable Point-of-Care Applications,” *Sensors*, vol. 21, n.º 5, pág. 1779, 2021.
- [51] G. M. Kuhl, D. T. Seidenkranz, M. D. Pluth, D. W. Johnson y S. A. Fontenot, “Potentiometric measurement of barbituric acid by integration of supramolecular receptors into ChemFETs,” *Sensing and Bio-Sensing Research*, vol. 31, pág. 100 397, 2021.

-
- [52] H. Kim, K.-B. Chung y J.-Y. Kwon, "Enzymatic Metal Oxide Electrolyte-Gated Field-Effect Transistors for Non-Invasive Glucose Biosensor," en *ECS Meeting Abstracts*, IOP Publishing, 2020, pág. 1396.
- [53] D. Sadighbayan, M. Hasanzadeh y E. Ghafar-Zadeh, "Biosensing based on field-effect transistors (FET): Recent progress and challenges," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, pág. 116 067, 2020.
- [54] J. Wang, D. Ye, Q. Meng, C.-a. Di y D. Zhu, "Advances in Organic Transistor-Based Biosensors," *Advanced Materials Technologies*, vol. 5, n.º 7, pág. 2 000 218, 2020.
- [55] M. Kaisti y col., "Field-effect based chemical and biological sensing: theory and implementation," 2017.
- [56] A. Albulbul, "Evaluating major electrode types for idle biological signal measurements for modern medical technology," *Bioengineering*, vol. 3, n.º 3, pág. 20, 2016.
- [57] S. Carrara, *Bio/CMOS interfaces and co-design*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [58] H.-P. Loock y P. D. Wentzell, "Detection limits of chemical sensors: Applications and misapplications," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 173, págs. 157-163, 2012.
- [59] A. Shrivastava, V. B. Gupta y col., "Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods," *Chronicles of young scientists*, vol. 2, n.º 1, págs. 21-25, 2011.
- [60] E. Oleneva, M. Khaydukova, J. Ashina, I. Yaroshenko, I. Jahatspanian, A. Legin y D. Kirsanov, "A simple procedure to assess limit of detection for multisensor systems," *Sensors*, vol. 19, n.º 6, pág. 1359, 2019.
- [61] G. K. Mani, Y. Nimura y K. Tsuchiya, "Advanced Artificial Electronic Skin Based pH Sensing System for Heatstroke Detection," *ACS sensors*, vol. 5, n.º 4, págs. 911-916, 2020.
- [62] X. Chen, L. Yao, Y.-C. Wang, Q. Chen, H. Deng, Z.-Y. Lin y H.-H. Yang, "Novel electrochemical nanoswitch biosensor based on self-assembled pH-sensitive continuous circular DNA," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 131, págs. 274-279, 2019.
- [63] C. Ocaña, S. Brosel-Oliu, N. Abramova y A. Bratov, "Low-cost multichannel system with disposable pH sensors for monitoring bacteria metabolism and the response to antibiotics," *Instrumentation Science & Technology*, págs. 1-16, 2020.
- [64] F Vivaldi, D. Santalucia, N. Poma, A. Bonini, P. Salvo, L. Del Noce, B. Melai, A. Kirhhain, V Kolivoška, R. Sokolova y col., "A voltammetric pH sensor for food and biological matrices," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 322, pág. 128 650, 2020.
- [65] L. Manjakkal, D. Szwagierczak y R. Dahiya, "Metal oxides based electrochemical pH sensors: Current progress and future perspectives," *Progress in Materials Science*, vol. 109, pág. 100 635, 2020.
- [66] S. Dimitrijevic, M. Rajcic-Vujasinović, S. Alagic, V. Grekulovic y V. Trujic, "Formulation and characterization of electrolyte for decorative gold plating based on mercaptotriazole," *Electrochimica acta*, vol. 104, págs. 330-336, 2013.
-

- [67] S. J. Padayatty, A. Katz, Y. Wang, P. Eck, O. Kwon, J.-H. Lee, S. Chen, C. Corpe, A. Dutta, S. K. Dutta y col., "Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention," *Journal of the American college of Nutrition*, vol. 22, n.º 1, págs. 18-35, 2003.
- [68] S. A. Hashemi, S. M. Mousavi, S. Bahrani, S. Ramakrishna, A. Babapoor y W.-H. Chiang, "Coupled graphene oxide with hybrid metallic nanoparticles as potential electrochemical biosensors for precise detection of ascorbic acid within blood," *Analytica chimica acta*, vol. 1107, págs. 183-192, 2020.
- [69] L. V. de Faria, T. P. Lisboa, D. M. de Farias, F. M. Araujo, M. M. Machado, R. A. de Sousa, M. A. C. Matos, R. A. A. Muñoz y R. C. Matos, "Direct analysis of ascorbic acid in food beverage samples by flow injection analysis using reduced graphene oxide sensor," *Food chemistry*, vol. 319, pág. 126 509, 2020.
- [70] F. Bettazzi, C. Ingrosso, P. S. Sfragano, V. Pifferi, L. Falciola, M. L. Curri e I. Palchetti, "Gold nanoparticles modified graphene platforms for highly sensitive electrochemical detection of vitamin C in infant food and formulae," *Food Chemistry*, vol. 344, pág. 128 692, 2021.
- [71] K. P. Aryal y H. K. Jeong, "Electrochemical detection of ascorbic acid with chemically functionalized carbon nanofiber/ β -cyclodextrin composite," *Chemical Physics Letters*, vol. 757, pág. 137 881, 2020.
- [72] A. S. Bolla y R. Priefer, "Blood glucose monitoring-an overview of current and future non-invasive devices," *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, vol. 14, n.º 5, págs. 739-751, 2020.
- [73] M. A. L. Gabbay, M. Rodacki, L. E. Calliari, A. G. D. Vianna, M. Krakauer, M. S. Pinto, J. S. Reis, M. Puñales, L. G. Miranda, A. C. Ramalho y col., "Time in range: a new parameter to evaluate blood glucose control in patients with diabetes," *Diabetology & metabolic syndrome*, vol. 12, n.º 1, págs. 1-8, 2020.
- [74] M. Artigues, J. Abellà y S. Colominas, "Analytical parameters of an amperometric glucose biosensor for fast analysis in food samples," *Sensors*, vol. 17, n.º 11, pág. 2620, 2017.
- [75] G. Dutta, A. Regoutz y D. Moschou, "Enzyme-assisted glucose quantification for a painless Lab-on-PCB patch implementation," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 167, pág. 112 484, 2020.
- [76] J. Zhu, B. Yang, W. Liu, B. Li e Y. Jin, "In-situ generation of potassium ferricyanide for label-free and enzyme-free chemiluminescence detection of telomerase activity," *Analytica Chimica Acta*, vol. 1165, pág. 338 550, 2021.
- [77] C.-C. Tseng, C.-H. Ko, S.-Y. Lu, C.-E. Yang, L.-M. Fu y C.-Y. Li, "Rapid electrochemical-biosensor microchip platform for determination of microalbuminuria in CKD patients," *Analytica Chimica Acta*, vol. 1146, págs. 70-76, 2021.
- [78] Y. Xu, Y. Dai, C. Li, H. Zhang, M. Guo e Y. Yang, "PC software-based portable cyclic voltammetry system with PB-MCNT-GNPs-modified electrodes for E. coli detection," *Review of Scientific Instruments*, vol. 91, n.º 1, pág. 014 103, 2020.

-
- [79] P. Teengam, W. Siangproh, S. Tontisirin, A. Jiraseree-amornkun, N. Chuaypen, P. Tangkijvanich, C. S. Henry, N. Ngamrojanavanich y O. Chailapakul, "NFC-enabling smartphone-based portable amperometric immunosensor for hepatitis B virus detection," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 326, pág. 128 825, 2021.
- [80] W. Ma, Q. Chang, J. Zhao y B.-C. Ye, "Novel electrochemical sensing platform based on ion imprinted polymer with nanoporous gold for ultrasensitive and selective determination of As 3+," *Microchimica Acta*, vol. 187, n.º 10, págs. 1-9, 2020.
- [81] S. Yamaguchi, S. Minbuta y K. Matsui, "Adsorption of the Cationic Dye Methylene Blue on Anodic Porous Alumina in Sodium Dodecyl Sulfate Solutions," *Langmuir*, vol. 36, n.º 17, págs. 4592-4599, 2020.
- [82] J. Chang, W. Lv, Q. Li, H. Li y F. Li, "One-step synthesis of methylene blue-encapsulated zeolitic imidazolate framework for dual-signal fluorescent and homogeneous electrochemical biosensing," *Analytical Chemistry*, vol. 92, n.º 13, págs. 8959-8964, 2020.
- [83] D. Liu, S. Meng, X. Shen, Y. Li, X. Yan y T. You, "Dual-ratiometric aptasensor for streptomycin detection based on the in-situ coupling of photoelectrochemical and electrochemical assay with a bifunctional probe of methylene blue," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 332, pág. 129 529, 2021.
- [84] M. Zamani, J. M. Robson, A. Fan, M. S. Bono Jr, A. L. Furst y C. M. Klapperich, "Electrochemical Strategy for Low-Cost Viral Detection," *ACS Central Science*, 2021.
- [85] N. Y. Jayanath, L. T. Nguyen, T. T. Vu y L. Dai Tran, "Development of a portable electrochemical loop mediated isothermal amplification (LAMP) device for detection of hepatitis B virus," *RSC advances*, vol. 8, n.º 61, págs. 34 954-34 959, 2018.