



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

FACULTAD DE CIENCIAS

**DESARROLLO DE UN BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO
MINIATURIZADO**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES**

PRESENTA

CINDY VIRIDIANA PETO GUTIÉRREZ

Tutor Principal

Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille
Facultad de Ciencias

Comité tutor

Dra. Tatiana Fiordelisis Coll
Facultad de Ciencias

Dr. Julio César Aguilar Cordero
Facultad de Química

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Abril de 2019



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.

La búsqueda de soluciones versátiles, rápidas y de bajo costo para problemas de diagnóstico y terapia es uno de los objetivos del trabajo conjunto entre los laboratorios de investigación y los profesionales de la salud. Desde la invención de las tiras para detección de glucosa, los biosensores electroquímicos, aplicados a la detección de sustancias de interés biomédico, han cobrado gran importancia como herramientas de diagnóstico o monitoreo de afecciones del cuerpo humano. En un biosensor electroquímico el elemento de transducción es un electrodo sobre el que se inmovilizan elementos de bioreconocimiento. Por lo tanto, para construir un biosensor electroquímico, primero se tiene que resolver la fabricación del arreglo de electrodos.

Siguiendo esta idea, en este trabajo se presentan cuatro metodologías de fabricación de arreglos de electrodos, que cumplen con las características siguientes: disposición planar compatible con plataformas microfluidicas; diseños compactos de dos y tres electrodos para aplicar técnicas voltamperométricas; materiales con alta conductividad e inertes; y dimensiones características submilimétricas, cercanas a los 100 μm . Los métodos de fabricación se basan en las técnicas de estructuración de películas delgadas “grabado” y “lift-off”, y de película gruesa “screen-printing”, pero buscan simplificar el modo en que se define la forma de los arreglos.

En el primer método (“*Protocolo 1. Electrodos por grabado de cobre*”) se utiliza un láser Blu-Ray, de un equipo de microfabricación casero, para fotopolimerizar por escritura directa máscaras del adhesivo fotocurable Loctite 2535, sobre una superficie de cobre (PCB). Éstas cumplen la función de proteger del ataque químico a la región con el diseño deseado para los electrodos. De esta forma, se lograron arreglos de tres electrodos de cobre concéntricos, con una resolución máxima de 175 μm en la zona de reacción.

En los métodos 2 a 4, la definición del arreglo se hace a través de máscaras cortadas en materiales adhesivos (cinta invisible o vinilo) con un plotter de corte, las cuales se adhieren a sustratos plásticos (PET o PS); tras depositar el material conductor en el sustrato, simplemente se retira la máscara adhesiva para dejar el arreglo de electrodos. En el segundo (“*Protocolo 2. Electrodos por sputtering o evaporación*”) y el cuarto métodos primero se realiza el recubrimiento de la superficie con una película delgada de algún metal inerte y de alta conductividad, como oro. En el tercer método (“*Protocolo 3. Electrodos por Doctor Blading*”) se rellena el stencil con tintas de grafito o de plata, usando la técnica de Doctor Blading. Aunque la resolución lograda con estos protocolos queda determinada por la resolución del plotter de corte ($\sim 165 \mu\text{m}$), se fabricaron arreglos con electrodos rectangulares de 1mm x 1.4mm, debido a que las estructuras fabricadas presentaron imperfecciones en los bordes de tamaño comparable a tal resolución.

En el cuarto protocolo (“*Protocolo 4. Electrodos de superficie estructurada*”) se aprovecha la reducción térmica que sufren los sustratos de poliestireno (PS) para encoger los electrodos de película delgada de oro depositados en su superficie, generando electrodos con una superficie microestructurada uniforme. El diseño de la máscara debe tener un tamaño de 2.5 veces del tamaño esperado tras el encogimiento. Se lograron arreglos con el mismo tamaño y diseño de electrodos rectangulares mencionado.

Se puso a prueba la funcionalidad de algunos arreglos fabricados como electrodos de celda para aplicar rutinas de cronoamperometría con peróxido de hidrógeno. El arreglo que mostró un comportamiento corriente-contra-tiempo más cercano al ideal fue la combinación electrodo de trabajo de grafito-electrodo de pseudoreferencia de plata. Entonces, el protocolo 3 se sometió a estandarización. Se mejoró la definición de los bordes de las pistas y se disminuyó la rugosidad de las superficies de grafito y plata. Varios arreglos resultantes se caracterizaron por perfilometría y por espectroscopía de impedancia. De la perfilometría resultó que la fabricación de los electrodos de plata (espesor promedio: 18.9 μm , desviación estándar: 2.47%) es más reproducible que la de los electrodos de grafito (espesor promedio: 41.3 μm , desv.est.: 19.18%). Finalmente, se aplicaron estos arreglos en otras pruebas electroquímicas. Se comprobó la funcionalidad de un celda de tres electrodos de grafito para aplicar la técnica de voltametría cíclica con sulfato de cobre. Finalmente, se logró inmovilizar glucosa oxidasa en los electrodos de grafito y se probó su viabilidad para la detección de glucosa por cronoamperometría a una solución de 200 mg/dL.

Índice general

PARTE A INTRODUCCIÓN AL PROYECTO

| | |
|---|-----------|
| Capítulo 1. Antecedentes del proyecto: Soluciones para Diagnóstico y Terapia | 6 |
| 1.1 Soluciones accesibles y de bajo costo | 6 |
| 1.1.1 Dispositivos Lab-on-a-Chip | 7 |
| 1.1.2 Uso de técnicas de fabricación no convencionales | 10 |
| 1.2 Biosensores | 11 |
| 1.3 Introducción al proyecto | 12 |
| Capítulo 2. Biosensores electroquímicos miniaturizados. | 14 |
| 2.1 Introducción a los biosensores electroquímicos | 14 |
| 2.2 Métodos electroquímicos de transducción | 16 |
| 2.2.1 Introducción a la transducción electroquímica | 16 |
| 2.2.2 Clasificación de los métodos electroanalíticos | 17 |
| 2.2.3 Métodos voltamperométricos | 18 |
| 2.2.3.1 Celda electroquímica e instrumentación | 19 |
| 2.2.3.2 Voltamogramas | 21 |
| 2.2.3.3 Tipos de métodos voltamperométricos | 25 |
| 2.3 Fabricación de biosensores electroquímicos | 27 |
| 2.3.1 Materiales de fabricación | 28 |
| 2.3.2 Métodos de fabricación de electrodos | 29 |
| 2.3.2.1 Métodos de fabricación con técnicas tradicionales | 30 |
| 2.3.2.2 Métodos de fabricación con técnicas no convencionales | 32 |
| 2.3.3 Métodos de sensibilización | 35 |
| 2.3.4 Miniaturización de los electrodos | 35 |
| 2.3.4.1 Ventajas de los microelectrodos | 35 |
| 2.3.4.2 Electrodos de pseudo-referencia | 37 |

PARTE B. METODOLOGÍA Y RESULTADOS

| | |
|---|-----------|
| Definición del proyecto | 39 |
| Capítulo 3. Selección de materiales, diseños y técnicas de fabricación | 41 |
| 3.1 Materiales y diseños generales | 41 |
| 3.2 Técnicas de microfabricación disponibles | 43 |
| 3.2.1 Micromaquinado CNC | 43 |
| 3.2.2 Microfabricación láser | 45 |
| 3.2.3 Plotter de corte | 46 |
| 3.2.4 Depósito de metales por sputtering | 46 |
| 3.2.5 Evaporación de metales por efecto Joule | 47 |
| 3.2.6 Doctor blading | 48 |
| 3.3 Materiales seleccionados para los arreglos de electrodos | 48 |
| 3.4 Materiales seleccionados para los sustratos | 48 |

| | |
|---|------------|
| Capítulo 4. Protocolos de fabricación de electrodos | 50 |
| 4.1 Protocolo 1. Grabado de cobre mediante la protección con máscaras fotopolimerizadas por Blu-Ray | 51 |
| 4.1.1 Descripción del protocolo 1. | 51 |
| 4.2 Protocolo 2. Electrodos mediante el depósito de metales por sputtering o evaporación | 57 |
| 4.2.1 Descripción del protocolo 2 | 57 |
| 4.3 Protocolo 3. Electrodos de tintas conductivas fabricados mediante doctor blading | 61 |
| 4.3.1 Descripción del protocolo 3 | 61 |
| 4.3.2 Análisis por perfilometría de los arreglos grafito-plata | 65 |
| 4.4 Protocolo 4. Electrodos de superficie metálica estructurada | 68 |
| 4.4.1 Descripción del protocolo 4. | 68 |
| Capítulo 5. Caracterización eléctrica | 74 |
| 5.1 Fundamentos de la caracterización de impedancias | 74 |
| 5.2 Metodología de medición de impedancias | 75 |
| 5.3 Resultados de la caracterización de impedancias | 76 |
| Capítulo 6. Validación de la funcionalidad de los arreglos fabricados | 80 |
| 6.1 Pruebas de validación de aplicabilidad en electroquímica | 80 |
| 6.1.1 Pruebas de cronoamperometría | 81 |
| 6.1.2 Pruebas de voltametría cíclica | 85 |
| 6.2 Pruebas de sensibilización y validación con sustancias de interés: glucosa | 87 |
| 6.2.1 Cronoamperometría a solución de glucosa | 87 |
| Capítulo 7. Conclusiones y trabajo a futuro | 89 |
| Anexos | 92 |
| A1 Métodos potenciométricos, conductimétricos y otros | 92 |
| A2 Anexo a Protocolo 3. Estudio de la influencia de un post-tratamiento de los electrodos (Aplicación de Presión y Temperatura) | 94 |
| A3 Inmovilización de cloruro de plata sobre electrodos de plata | 97 |
| A4 Delimitando la zona de reacción | 98 |
| A5 Calibración usando electrodos comerciales y aplicación de un circuito potenciostato casero. | 99 |
| Bibliografía | 102 |

PARTE A

INTRODUCCIÓN AL PROYECTO

Capítulo 1. Antecedentes del proyecto: Soluciones para Diagnóstico y Terapia



En años recientes se han incrementado los esfuerzos en torno al desarrollo de dispositivos de diagnóstico y terapia personalizados o “Point-of-Care” que sean asequibles, portátiles, de alta sensibilidad y menos invasivos. Para lograr esto, la investigación en torno al tema ha cambiado los métodos de fabricación tradicionales por otras opciones más versátiles, rápidas, de bajo costo y en muchas casos, opciones que imiten la naturaleza.

Por otro lado, el camino correcto para tener éxito en este campo es realizar un trabajo conjunto entre los laboratorios de investigación y los profesionales de la salud. Esto, para tener mayor claridad acerca de las necesidades de los pacientes. Siguiendo esta filosofía y la necesidad latente de crear instrumental médico de monitoreo y tratamiento que funcione bajo un modelo acorde a la población mexicana, se creó el Laboratorio Nacional CONACyT “Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia” o LaNSBioDyT, entre la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER) y el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

El trabajo aquí descrito se desarrolló en el Laboratorio de Micro-Nanotecnología (μ NTec) de la Facultad de Ciencias, el cual forma parte del Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia (LaNSBioDyT), siguiendo la misión del laboratorio, de desarrollar nuevos materiales y dispositivos de inspiración biológica para resolver problemas médicos y traducir las tecnologías transformativas en productos con impacto social.

1.1 Soluciones accesibles y de bajo costo

En la práctica clínica actual, los exámenes de diagnóstico se llevan a cabo en laboratorios centralizados. A pesar de la confiabilidad de estas pruebas, se presentan varias limitaciones que pueden generar un escenario adverso para el paciente, como son el tiempo de entrega de resultados, el costo de las pruebas, y el requerimiento de personal con habilidades especializadas [1]. En particular, existen enfermedades que

requieren de un diagnóstico oportuno, de la predicción precisa de riesgos y un monitoreo constante, tales como las enfermedades crónicas [2].

Para superar estas limitaciones, se ha impulsado el desarrollo de dispositivos de diagnóstico en el punto de atención o “PoC” (por sus significado en inglés “Point-of-Care”). Idealmente, un dispositivo PoC debe cumplir con los criterios ASSURED, publicados por la Organización Mundial de la Salud, esto es, que sea: asequible, sensible, específico, fácil de usar, rápido y robusto, sin equipos y entregable a los usuarios finales [2,3]. A la fecha, no se cuenta con muchos dispositivos PoC que cumplan con todos estos requisitos, siendo el principal inconveniente la baja precisión y costos aún muy elevados para usarse en regiones de escasos recursos, por lo que la búsqueda de herramientas y medios de diagnóstico nuevos, rápidos, confiables y rentables sigue vigente y es un tema de investigación muy importante [4].

1.1.1 Dispositivos Lab-on-a-Chip

Desde la concepción de los dispositivos de medición de glucosa portátiles, científicos e ingenieros han desarrollado gran interés en los dispositivos de tipo “Lab en un Chip” (o LoC por sus nombre en inglés “Lab on a Chip”) como soluciones accesibles de bajo costo para problemas de diagnóstico y medicina personalizada.



Figura 1. Esquema “Del Laboratorio al Lab en un Chip”. Tomado de [5]

Los dispositivos Lab-on-a-Chip son plataformas que integran funciones y procesos llevados comúnmente a cabo en un laboratorio de análisis químico y bioquímico, en un formato miniaturizado (de unos cuantos centímetros cuadrados[6]), para generar así dispositivos portátiles (figura 1).[7] El surgimiento de este concepto se puede remontar a la primer propuesta por A. Manz en 1990 [8] de miniaturizar los sistemas de análisis total (microTAS por su nombre en inglés *micro-Total Analysis Systems*), por las mejoras que esto presenta en el desempeño analítico, y para satisfacer la necesidad de monitorear continuamente parámetros químicos como la concentración de las especies químicas mediante técnicas como cromatografía o electroforesis. Actualmente, la tecnología LoC permite no solo el análisis sino también la manipulación y procesamiento de varios tipos de muestras en dispositivos del tamaño de un portaobjetos o una tarjeta de crédito.

En los dispositivos LoC se pueden distinguir tres tipos principales de componentes: las plataformas y componentes microfluídicos (micromezcladores, filtros, etc.), los actuadores (microválvulas, microbombas) y los sensores. La historia de los dispositivos LoC está íntimamente ligada al desarrollo de componentes microfluídicos, que a su vez están vinculados a los avances en microtecnología de semiconductores. Los componentes microfluídicos permiten manipular pequeñas cantidades de líquidos o gases, reduciendo así la cantidad de analito y el tiempo de transporte de éste.[8] Las dimensiones características de tales componentes (e.g. el diámetro de un conducto o microcanal) oscilan entre los 10 y los 300 μm . En la actualidad, la cantidad de componentes microfluídicos que se pueden integrar es amplia, y permiten que el dispositivo desempeñe funciones de manipulación de la muestra líquida como extracción, mezclado, filtrado, separación, etc.[9]

Los componentes llamados actuadores se refieren a elementos controlados de forma externa que producen una estimulación o cambio en la especie de estudio, pueden ser, por ejemplo, válvulas y bombas para controlar el flujo, o elementos para deformar mecánicamente un sustrato. Finalmente, los sensores son elementos que permiten monitorear parámetros físicos y químicos de la especie bajo análisis. Una de las mayores ventajas de las tecnologías LoC es la facilidad de integración de distintos tipos de sensores (eléctricos, ópticos, magnéticos, acústicos, etc.) en una misma plataforma. En la figura 2 se muestran ejemplos de los componentes mencionados antes, este ejemplo en particular se refiere a la aplicación de tales componentes en dispositivos para el estudio de células progenitoras. [10]

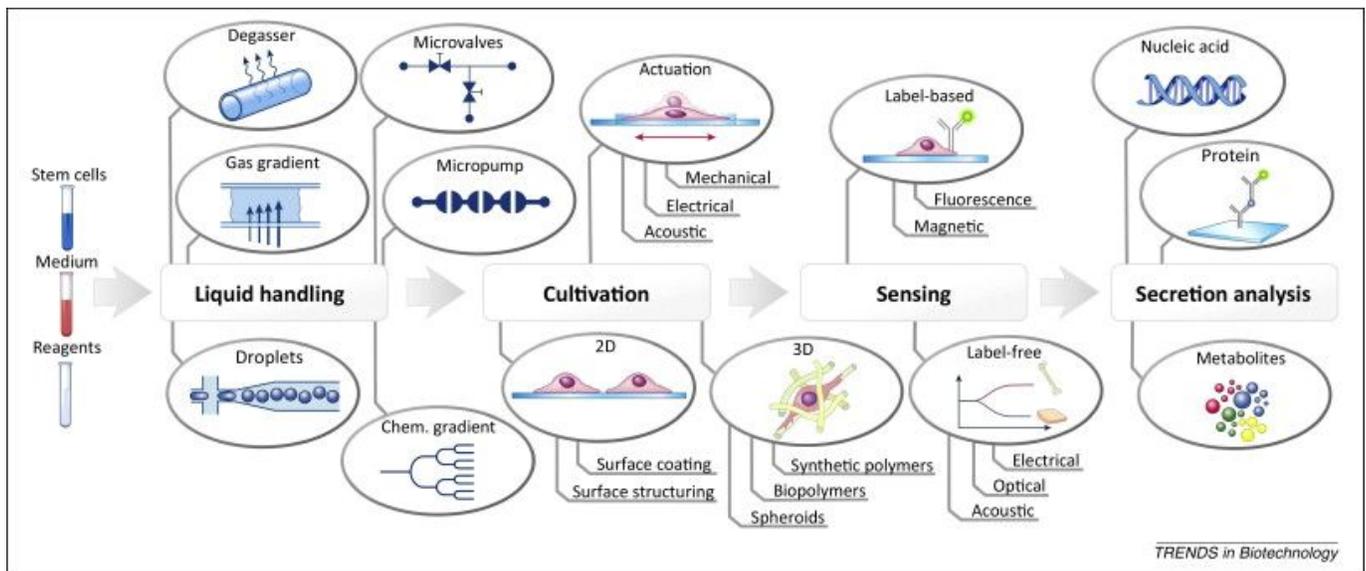


Figura 2. Ilustración esquemática de componentes y sistemas usados en chips para análisis de células progenitoras. Tomado de [10].

Es importante revisar los mecanismos de transporte microfluídico puesto que, generalmente, son los que determinan el material de construcción de la plataforma. Para el caso del transporte por flujo capilar, se usa celulosa o sus derivados como acetato o nitrato de celulosa. Las plataformas de electromojado ocupan sustratos rígidos con recubrimientos de dieléctricos hidrofóbicos, como compuestos fluorinados. Las plataformas de transporte por fuerzas centrífugas se basan en materiales transparentes (en especial si funcionan en combinación con lectores ópticos) y rígidos, como es el caso de los polímeros termoplásticos. En el caso de los dispositivos que tienen control mediante bombas de presión, se tiene mayor versatilidad en la selección de materiales, la cual queda definida principalmente por la técnica de manufactura; se ha usado

silicio, vidrio, termoplásticos o materiales flexibles como el PDMS. Dada su facilidad de uso, las plataformas capilares son las más populares actualmente en cuanto a su comercialización.[11]

Como se puede observar, se ha popularizado la manufactura de los dispositivos LoC a base de polímeros. Éstos sustituyeron al vidrio y al silicio como sustratos de construcción porque resulta más simple desarrollar componentes como válvulas o bombas en un material elástico que en uno frágil. Además, el vidrio y el silicio no presentan permeabilidad ante gases, lo que resulta inapropiado para algunas aplicaciones, como las que involucran muestras biológicas, las cuales requieren del intercambio de oxígeno y dióxido de carbono con el ambiente.[12] Por otro lado, el uso de plásticos presenta ventajas comerciales como la reducción de costos y la escalabilidad industrial puesto que no se requieren instalaciones de “cuarto limpio” ni instrumentos complicados. La fabricación con tales materiales se basa en general en técnicas como estampado (hot-embossing), termoformado, moldeo por inyección, o litografía suave. Algunos plásticos que han adquirido mayor popularidad son polimetilmetacrilato (PMMA), poliestireno (PS), polipropileno (PP), copolímeros de olefinas cíclicas (COC), polímeros fluorinados y polidimetilsiloxano (PDMS). Este último se convirtió en un material muy popular entre la comunidad científica interesada más en la aplicación de las plataformas que en su construcción, desde su introducción por el grupo Whitesides en 1998. [13]

Finalmente, para revisar los diferentes tipos de sensores utilizados en los dispositivos LoC, se enumeran en la tabla 1 según el mecanismo de detección, es decir, el principio físico o químico que rige la transducción de la señal.

Tabla 1. Algunos ejemplos de sensores implementados en dispositivos LoC. Adaptado de [11]

| Mecanismo de detección | | Mecanismo de transducción | Ejemplo de sustancia o variable que se ha medido con el mecanismo |
|------------------------|-----------------------------------|---|--|
| <u>Gravimétrico</u> | SAW (Surface Acoustic Wave) | Medición de un cambio en la frecuencia (velocidad acústica) como indicador de la absorción de masa en la superficie del sensor. | Factor de crecimiento de hepatocitos en medio de cultivo, agentes químicos, penicilina G, concentración de albúmina. |
| | QCM (Quartz Crystal Microbalance) | | |
| <u>Óptico</u> | Fluorescencia | Medición de la intensidad de fluorescencia | Concentración de oxígeno, concentración de algas (contaminación del agua) |
| | Absorbancia | Medición de la absorbancia como función de la longitud de onda | Concentración de ácido úrico, cafeína, paracetamol, ketoprofeno, ácido ascórbico |
| | Luminiscencia | Intensidad de luminiscencia | Concentración de peróxido de hidrógeno, detección de ATP |
| | Interferometría | Medición de cambio de fase debido a un cambio de índice de refracción | Virus HSV-1 en suero, estreptavidina |
| | Colorimetría | Análisis digital del color | Determinación de pH, |

| | | | |
|-----------------------|----------------|---|--|
| | | | HSA, concentración de glucosa. |
| <u>Eléctrico</u> | Resistencia | Medición del cambio en la resistencia | Temperatura, presión, velocidad de flujo. |
| | Capacitancia | Medición del cambio en la capacitancia | Posición y volumen de gotas, detección de vapores orgánicos |
| | Inductancia | Medición del cambio en la reactancia inductiva | Detección de moléculas blanco atrapadas por cadenas de ADN; detección de escombros metálicos en aceites lubricantes |
| <u>Electroquímico</u> | Amperometría | Medición de la corriente generada en procesos de reducción u oxidación | Detección de patógenos, actividad respiratoria de una biocapa, concentración de glucosa sanguínea |
| | Impedancia | Medición de la impedancia de un sistema como función de la frecuencia de excitación | Caracterización dieléctrica de un cultivo celular, detección de la presencia de bacterias en la superficie de electrodos |
| | Potenciometría | Medición de los cambios en el potencial o voltaje | Cantidad de moléculas de ADN en un sensor, medición del pH |
| | Voltametría | Medición de la corriente en función del potencial | Detección de E.coli, identificación de genotipos, concentración de dNTPs. |

Como puede observarse, el desarrollo de sensores adaptables a los sistemas LoC es actualmente un trabajo inter y multidisciplinario que ha cobrado gran importancia en el campo de las aplicaciones médicas y de la biología molecular, como son el diagnóstico de enfermedades, el transporte controlado de fármacos, y los modelos de órganos en un chip. Las mayores ventajas de los dispositivos LoC en comparación con los métodos de análisis convencionales incluyen: uso de menor volumen de fluidos, lo que implica menos gasto de reactivos y de materiales; tiempo de análisis menor debido al aumento de la razón superficie-volumen y a un mejor control del transporte del analito; mayor compacidad y alto rendimiento debido a la integración de los componentes necesarios en una misma plataforma. [14] Estas características hacen de los dispositivos LoC una tecnología muy atractiva para su uso en el diagnóstico PoC, y además, se perfilan como soluciones ideales para su implementación en países en vías de desarrollo.

1.1.2 Uso de técnicas de fabricación no convencionales

Para dar soluciones de tipo PoC de bajo costo, accesibles y rápidas, es necesario reducir la inversión monetaria en el proceso de fabricación. Ante esto, el desarrollo de dispositivos LoC y de biosensores se ha

inclinado hacia el uso de nuevas técnicas de fabricación no tan especializadas como aquellas heredadas de las tecnologías de semiconductores [14]. En estas nuevas técnicas se aprovecha, por ejemplo, el uso de sustratos de bajo costo, como los polímeros, y las nuevas formas de crear arreglos de estructuras o compuestos biológicos funcionales, como el estampado por micro-contacto (microcontact printing) o la ablación con láseres de baja potencia. Recientemente, otras técnicas de fabricación usadas en áreas no científicas también se han implementado, como son la xerografía, lift-off de máscaras adhesivas, polímeros con memoria de forma, impresión de tintas mezcladas con materiales especializados, screen-printing, etc. Estas nuevas técnicas no sólo se aprovechan para el desarrollo de sistemas PoC que cumplan con los lineamientos *ASSURED*, también sirven en el ámbito académico y de enseñanza para la concepción de ensayos químicos o biológicos personalizados de prototipado rápido.

Si bien la resolución es un tema en el que todavía se debe trabajar, este nuevo enfoque ofrece mayor flexibilidad en el diseño de las plataformas LoC y de biosensores electroquímicos, y en los materiales que se pueden utilizar, además de que se pueden desarrollar en laboratorios no especializados.

1.2 Biosensores

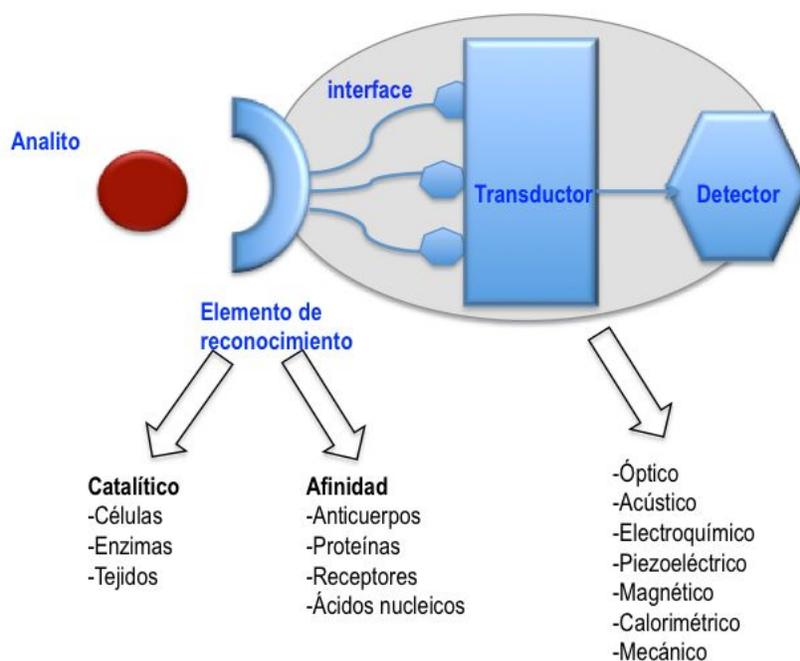


Figura 3. Esquema del funcionamiento general de un biosensor. Tomada de [15]

Un biosensor se puede definir como un dispositivo analítico que convierte una respuesta biológica en una señal procesable [16]. Un biosensor consiste, en la mayoría de los casos, de sistemas de bioreconocimiento (enzimas, ADN, proteínas, células, etc.) inmovilizados en la superficie de un elemento transductor (electroquímico, óptico, eléctrico, etc., ver figura 3). Las interacciones específicas entre el analito y el elemento de bioreconocimiento producen un cambio fisicoquímico que es medido y transmitido por el transductor. A continuación, en el resto del dispositivo de biosensado, la señal es traducida a una señal electrónica, es amplificada y enviada para su procesamiento a un software que convierte las características de la señal en los parámetros que describen el proceso investigado. Los biosensores se aplican a la

caracterización de una amplia variedad de muestras como son los fluidos corporales, muestras de alimentos, cultivos celulares o muestras ambientales. En la tabla 1 se muestran más ejemplos de mecanismos de transducción utilizados también por los biosensores, esto es, en combinación con algún elemento de bioreconocimiento.

Según Grieshaber [17], la investigación alrededor de los biosensores empezó con la primera generación de biosensores de glucosa oxidasa (GOx) en 1962, el cual, aunado a sus múltiples mejoras, es el más usado hasta la fecha. En el año 2000, Zhang reportaba que las aplicaciones clínicas de los biosensores eran pocas debido a su reducida biocompatibilidad, y que no se había dado la explosión comercial predicha diez años atrás, debido a que la especialización e instalaciones necesarias para su fabricación y aplicación eran caras y sofisticadas. En la actualidad existen varias empresas que ya comercializan dispositivos de diagnóstico clínico. Una de las más importantes es “i-STAT Corporation”, que utiliza biochips que permiten detectar pH, pCO₂, pO₂; electrolitos como Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻, Mg²⁺; metabolitos como glucosa, urea y lactato. [18]

Como lo demuestra la popularidad del biosensor de glucosa, los biosensores electroquímicos presentan ciertas ventajas que los hacen preferibles ante otros tipos de biosensores. Se habla de biosensores electroquímicos cuando un electrodo constituye el elemento transductor. Los biosensores electroquímicos tienen ciertas ventajas sobre otro tipo de sensores, como los basados en fluorescencia. Una es que el principio de transducción es fácil de miniaturizar; otra es que las señales eléctricas generadas pueden ser procesadas de forma barata y rápida usando electrónica convencional, para lo cual ya existen formas rentables de producción. Sumado a lo anterior, la detección por medios electroquímicos se puede hacer selectiva y por lo tanto alcanzar alta resolución. Por otro lado, la facilidad de miniaturización y de fabricación con diferentes formas geométricas, hace a los biosensores electroquímicos compatibles y fácilmente integrables con las tecnologías Lab-on-a-Chip. El movimiento hidrodinámico que permite la microfluídica mejora el transporte de masa hacia la superficie del detector, lo que implica un aumento en la corriente eléctrica y por lo tanto en la sensibilidad en comparación con los modos estáticos de detección.

En el siguiente capítulo se ahondará más en el tema de los biosensores electroquímicos, se hablará de sus características principales, de las capacidades que ofrecen, algunos de sus principios de funcionamiento, y se dará un breve panorama de las técnicas tradicionales y no convencionales para su fabricación.

1.3 Introducción al proyecto

Habiendo revisado lo anterior, y tomando en cuenta que entre los proyectos desarrollados en el laboratorio nacional existe la necesidad de tener acceso a biosensores que permitan detectar y cuantificar moléculas de interés químico-clínico, en este trabajo se buscó establecer un protocolo de fabricación de biosensores electroquímicos, siguiendo la filosofía de usar técnicas de fabricación de bajo costo y de generar arreglos (en tamaño y forma) integrables a las plataformas microfluídicas ya desarrolladas en el laboratorio. Esto último puesto que sigue la línea de trabajo hacia el desarrollo de dispositivos “Lab-on-a-Chip”. Como ya se revisó, esto no es sólo una necesidad local, sino que contribuye a la búsqueda actual de soluciones de diagnóstico accesibles, rápidas y fáciles de usar.

Además, junto con otros colaboradores del LaNSBioDyt, se identificó la necesidad de contar con dispositivos de sensado electroquímico puesto que muchas de las sustancias indicadoras en los procesos

químicos o biológicos estudiados son especies electroquímicamente activas. Por ejemplo, se nos ha indicado que cuantificar la liberación y consumo de neurotransmisores en estudios in vivo o in vitro, al mismo tiempo que se producen excitaciones mediante otras técnicas tendría gran impacto en el entendimiento del cerebro y de muchas funciones fisiológicas. Por otro lado, nos es necesario contar con un método propio de detección de glucosa para poder integrarlo en un proyecto de chip de detección dual glucosa - insulina. En el siguiente capítulo se revisará el estado del arte y el marco teórico necesario para establecer los requisitos que debe cumplir un biosensor electroquímico.

Capítulo 2. Biosensores electroquímicos miniaturizados.

2.1 Introducción a los biosensores electroquímicos

La electroquímica es una de las ramas más antiguas de la química, el establecimiento de su estudio se remonta al siglo XVIII con la definición por Luca Galvani de la “sustancia nervio-eléctrica”, refiriéndose a la actividad eléctrica que poseen los seres vivos. En general este campo se ocupa del estudio de los cambios químicos causados por el paso de una corriente eléctrica y la producción de energía eléctrica por reacciones químicas.[19] Históricamente, esta ciencia se ha aplicado en las ramas de la metalurgia, al estudio de los fenómenos de corrosión, semiconductores, celdas de combustible, recubrimientos, etc.[20] La implementación de la electroquímica al sensado de sustancias se puede trazar desde el inicio del uso de los medidores de pH hace más de cien años, con el trabajo de Kohlrausch [21].

Desde la invención del sensor de glucosa, los sensores electroquímicos han tenido gran impacto en la detección de sustancias de interés biológico y bioquímico, conformando el campo de los biosensores electroquímicos. Recordando la conformación de un biosensor, descrita antes (figura 3): “Un biosensor consiste de sistemas de bioreconocimiento inmovilizados en la superficie de un elemento transductor, de tal forma que las interacciones específicas entre el analito y el elemento de bioreconocimiento producen un cambio fisicoquímico que es medido y transmitido por el transductor”[22], se puede decir que un biosensor electroquímico es aquél en el que el elemento transductor es un electrodo o arreglo de electrodos (figura 4), y la propiedad fisicoquímica que cambia puede ser la intensidad de corriente, la diferencia de potencial, la impedancia característica del electrodo o un cambio en la conductancia de la solución.



Figura 4. Esquema: Descripción de los elementos de un biosensor electroquímico (Modificado de [17])

En el artículo “*On Electrical Decomposition*” Faraday y William Whewell acuñaron la palabra *electrodo* a partir de dos palabras griegas: *elektron* (ámbar) y *hodos* (camino), para referirse a “*la sustancia o más bien superficie, ya fuese aire, agua, metal o cualquier otro cuerpo, a través de la cual la corriente eléctrica entra hacia o sale de un cuerpo en descomposición eléctrica*”.[23] En los sistemas electroquímicos, se concibe como electrodo a una superficie conductora, generalmente metales inertes, a través de la cual entran o salen los electrones que interactúan con el electrolito (e.g. induciendo algún estímulo eléctrico o midiendo alguna propiedad eléctrica), que posteriormente son transportados como una señal eléctrica al circuito procesador.[19][24]

La IUPAC propone dos categorías de clasificación de los biosensores electroquímicos, de acuerdo al modo de transducción de la señal (figura 4) o de acuerdo al mecanismo que le confiere la especificidad biológica, notando que ningún método de sensibilización es específico de algún método de transducción. [22]. Los métodos de transducción quedan definidos por el método electroanalítico que se implemente, que a su vez define el diseño del elemento de transducción. Los principales métodos electroanalíticos de transducción se clasifican en potenciométricos, conductimétricos y amperométricos. En las secciones siguientes se desarrollarán algunos de estos.

Dada la cantidad de combinaciones posibles de métodos electroanalíticos y elementos de bioreconocimiento, hay un gran número de analitos detectables mediante biosensores electroquímicos. Antes de la popularización de las técnicas de inmovilización de moléculas de bioreconocimiento, las sustancias que se podían detectar eran sólo aquellas que fueran electroactivas, es decir, aquellas que 1) generan una diferencia de potencial al acumularse a ambos lados de una interfase (como los iones H^+) o 2) sufren una reacción electroquímica al entrar en contacto con la superficie del electrodo polarizada a un cierto potencial, generando una corriente medible. En este grupo se incluyen los electrolitos (como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , Mg^{2+}) y algunos neurotransmisores (dopamina, ácido ascórbico, GnRH, etc.).

Posteriormente, a partir de la invención del primer biosensor con enzimas inmovilizadas, por Clark y Lyons et al. en 1962, la cantidad de sustancias detectables por métodos electroquímicos vio un crecimiento inmediato. Los biosensores que incorporan enzimas se han usado para medir concentraciones de carbohidratos (glucosa, galactosa, fructosa), proteínas (colesterol, creatinina), aminoácidos (glutamato) y otros metabolitos (como lactato y urea)[25]. En la categoría de gases sanguíneos, se usan para medir la presión de oxígeno, de dióxido de carbono, y de óxido nítrico, en la región transeutánea o intravascular. [26] También se tienen los inmunosensores, los cuales son ensayos que usan antígenos o anticuerpos inmovilizados, y que se pueden usar con prácticamente todos los métodos electroanalíticos.

En la figura 5 se muestra un esquema en el que se relacionan cinco tipos de analitos comunes en procedimientos de análisis clínico con el tipo de biosensores electroquímicos más usados en cada caso. Como se puede observar, la amperometría es uno de los métodos electroanalíticos más usados en combinación con diferentes sustratos de detección. Esto es porque el método ha demostrado una alta capacidad de resolución, y en ciertos modos se puede relacionar directamente la corriente medida con la concentración de bulto del analito. [17].

| ANALITOS | SUSTRATOS DE DETECCIÓN | MÉTODO DE DETECCIÓN |
|-----------------------|--|--|
| Gases sanguíneos | Membrana semipermeable | Potenciometría / Amperometría |
| Electrolitos | Electrodos / Sustancias transportadoras de iones | Amperometría /Potenciometría |
| Metabolitos | Enzimas | Amperometría |
| ADN | ADN monocatenario | Amperometría / Impedancia |
| Antígeno / Anticuerpo | Anticuerpo / Antígeno | Potenciometría / Amperometría / Impedancia |

Figura 5. Métodos electroquímicos aplicados a la detección de analitos en procedimientos de análisis clínicos. Adaptado de [26]

Ya se mencionaron algunas ventajas de los biosensores electroquímicos, una de las más importantes es la capacidad de miniaturización de los elementos de transducción y el circuito de procesamiento, lo que confiere la posibilidad de efectuar análisis altamente selectivos *in situ*, portabilidad e integración a los sistemas microfluídicos. Se puede hablar de electrodos de dimensiones características de unos cuantos milímetros, hasta objetos de dimensiones nanométricas (e.g. los nanoalambres), comparables a las de las biomoléculas de interés.[17] Otras ventajas son su bajo costo debido a su relación con los ya rentables sistemas microelectrónicos; su versatilidad de biofuncionalización, lo que los hace selectivos y puede aumentar su sensibilidad; y finalmente, la rapidez de su respuesta y del análisis de los datos. Sin embargo, todavía hay algunas desventajas por superar en la implementación de estos dispositivos. Por ejemplo, se debe tener control de la presencia de otras sustancias electroquímicamente activas que pudieran generar una señal parásita; los equilibrios electroquímicos pueden verse afectados por las fluctuaciones de pH o de temperatura, los cuáles no son fácilmente controlables por ejemplo en muestras biológicas; además, dada la dependencia de su funcionamiento con el estado de la superficie de los electrodos, los biosensores electroquímicos tienden a tener poca estabilidad a largo plazo, impidiendo su uso múltiple. [17]

En este capítulo se van a revisar los diferentes métodos electroanalíticos de transducción en que se basan los biosensores electroquímicos, en cambio, los mecanismos de bioreconocimiento no se revisarán a profundidad puesto que están fuera del alcance de este trabajo. Por otro lado, dadas las ventajas ya mencionadas y que se desarrollarán más adelante, los métodos amperométricos son de mayor interés para este trabajo que el resto de los métodos, por lo que se hará un desarrollo de los principios y modelos de operación de éstos. En la última sección se dará un breve panorama de los materiales y las técnicas tradicionales y no convencionales de fabricación de los componentes de un biosensor electroquímico, haciendo énfasis también en los biosensores voltamperométricos.

2.2 Métodos electroquímicos de transducción

2.2.1 Introducción a la transducción electroquímica

A diferencia de muchos otros tipos de sensores, en los que los cambios químicos ocurren en una solución homogénea en bulto, los cambios electroquímicos tienen lugar en una interfase electrodo-solución (figura 6). El cambio provocado en la solución puede ser una reacción electroquímica del analito, debido a que dona o

acepta electrones del elemento transductor; una acumulación del analito a ambos lados de una membrana selectiva; una reacción de bioreconocimiento que haga que se acumulen o se desprendan elementos de la superficie del elemento transductor. Lo anterior genera respectivamente directa o indirectamente una de las siguientes respuestas fisicoquímicas: una corriente medible (amperometría), una acumulación de carga que implica un cambio de potencial medible (potenciometría), una alteración en las propiedades conductivas de los electrodos (impedancia). Para relacionar estos cambios con las propiedades fisicoquímicas del analito, uno de los principios usados es que el potencial de una celda electroquímica está directamente relacionado con las actividades de los reactivos y productos de la reacción en la celda (ecuación de Nernst). La actividad a_x de la especie X viene dada por $a_x = \gamma_x [X]$ donde γ_x es el coeficiente de actividad y $[X]$ es la concentración molar de X. Con frecuencia se hace la aproximación de que estas actividades son iguales a las concentraciones molares.

Además de la definición del analito que se desea detectar, la selección del método electroanalítico con el que el biosensor va a operar es un paso crucial para determinar el diseño y construcción de éste, en particular de los elementos de transducción.

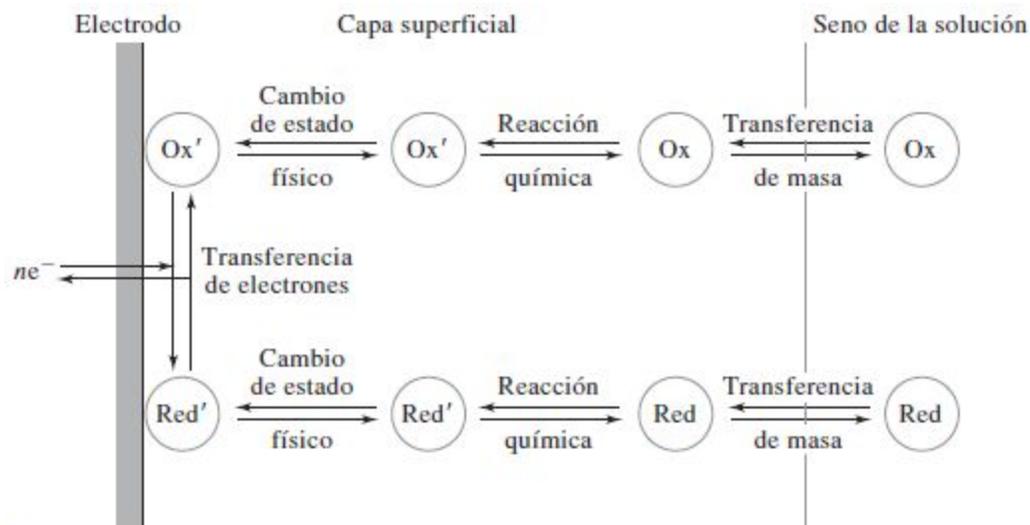


Figura 6. Esquema de reacción en la interfase electrodo-solución. Tomado de [27]

La mayoría de los métodos electroanalíticos funcionan usando una celda de tres electrodos inmersos en una solución que contiene al analito. El primero es un electrodo de trabajo o indicador, el cual constituye el ya mencionado *elemento transductor*. En la superficie o vecindad de éste ocurre la interacción con el analito. El segundo es un electrodo de referencia respecto al cual se establece el potencial del primer electrodo. El tercer electrodo se requiere para cerrar el circuito de corriente de electrólisis; se le llama electrodo auxiliar o contraelectrodo. [28] Más adelante, se tratarán las funciones y propiedades que debe tener cada electrodo para el caso de los sensores voltamperométricos.

2.2.2 Clasificación de los métodos electroanalíticos

Establecer el método electroanalítico a usarse en un biosensor significa definir el tipo de señal con la que se polarizarán los electrodos de la celda, con la que se excitará a la solución, y la respuesta fisicoquímica que se va a medir.

En la figura 7 se muestra un mapa conceptual en el que se clasifican los métodos electroanalíticos más comunes. Se dividen en métodos interfaciales y métodos del seno de la solución, siendo los primeros los más utilizados. Los métodos interfaciales se pueden clasificar a su vez en dos categorías, dinámicos o estáticos, en función de si hay o no corriente fluyendo en las celdas electroquímicas, respectivamente. Los métodos estáticos implican medidas potenciométricas y presentan ventajas como rapidez y selectividad. Los métodos dinámicos se pueden clasificar a su vez en dos tipos. En el primer tipo, se controla el potencial, mientras se llevan a cabo las mediciones de otras variables. En el segundo tipo, la corriente es controlada, generalmente a un valor constante, y se determina el potencial como función del tiempo.[19] Estos métodos suelen tener intervalos de detección amplios (10^{-3} a 10^{-8} M), y pueden llevarse a cabo con volúmenes de muestra de microlitros o de hasta nanolitros.[27]

En las secciones siguientes se van a revisar algunos de los métodos electroanalíticos del esquema, en particular los que se clasifican como métodos voltamétricos. En el anexo A1 se describen brevemente otros métodos electroanalíticos que también son ampliamente usados como métodos de transducción pero que no se implementan en este trabajo.

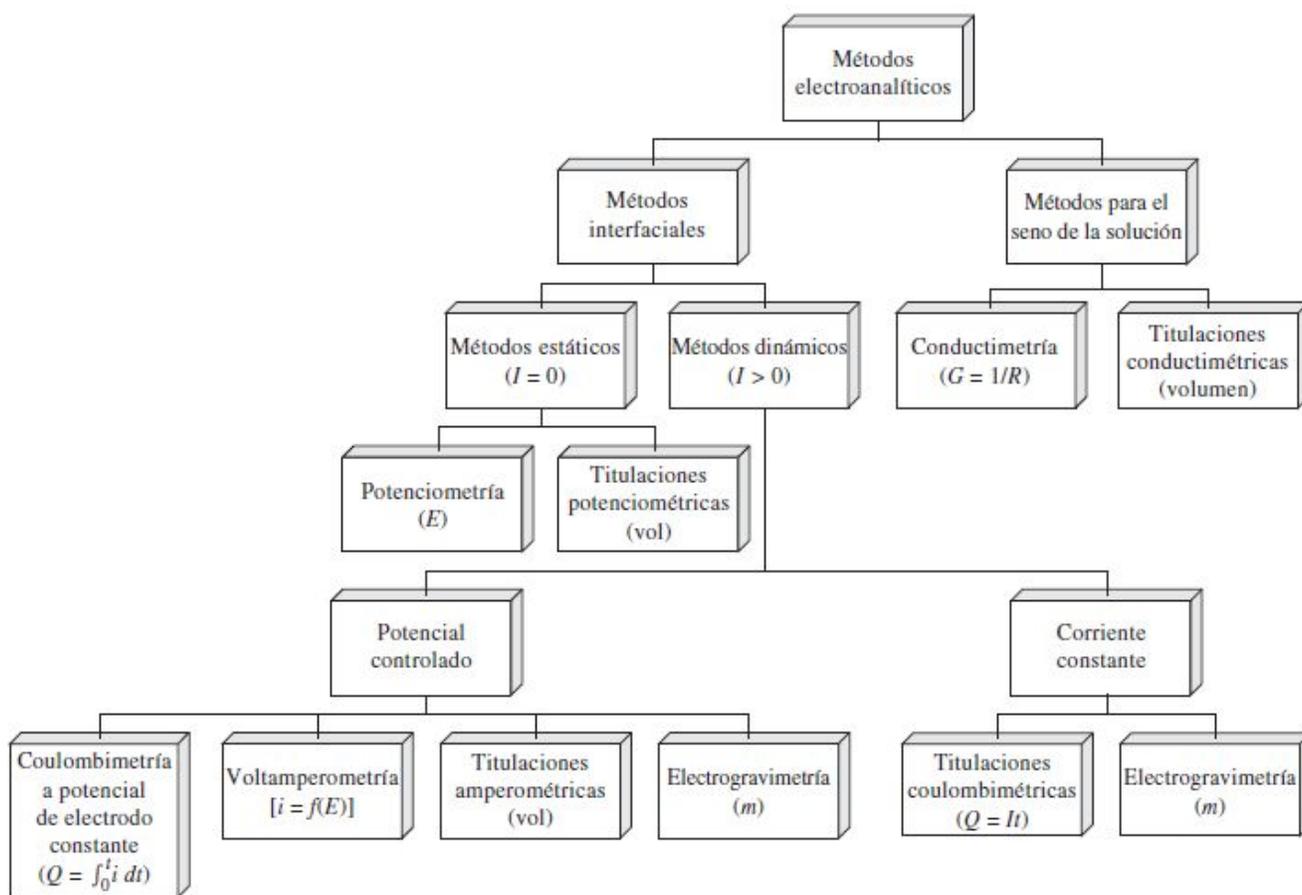


Figura 7. Mapa conceptual de la clasificación de los métodos electroanalíticos. Tomado de [27]

2.2.3 Métodos voltamperométricos

Los métodos voltamperométricos son ampliamente usados en los biosensores electroquímicos dado que presentan alta sensibilidad para identificar y cuantificar sustancias electroactivas (10^{-3} a 10^{-8} M). [20]. Se basan en la medición de la corriente que se produce en una celda electroquímica en condiciones de

polarización de concentración, es decir, cuando se aplica un potencial a la celda, para que tenga lugar una reacción de reducción u oxidación a una velocidad apreciable. El rango de potencial usado depende de los valores de potencial de reducción del analito (o del intermediario) a estudiar. Algunos ejemplos de barridos de potencial implementados se representan en la figura 15. Un análisis de las características de la señal de corriente resultante respecto al potencial aplicado arroja información directa o indirecta del analito, como su concentración o constantes cinéticas. [17]

2.2.3.1 Celda electroquímica e instrumentación

La celda electroanalítica en estos métodos consiste de tres electrodos inmersos en una solución que contiene al analito. Los electrodos y sus funciones son: (1) un electrodo de trabajo (WE) al que se le aplica una señal de potencial constante o variable, lo que provoca que ocurra la reacción redox de interés en su vecindad generándose una corriente medible; (2) un contraelectrodo (CE) o electrodo auxiliar que sirve para llevar la corriente de polarización al electrodo de trabajo desde el potencióstato, a través del electrolito; y (3) un electrodo de referencia (RE) respecto a cuyo valor de potencial se calibra el potencial del WE (figura 8). [20]

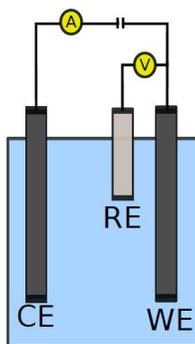


Figura 8. Celda electroquímica de tres electrodos.

Para entender mejor el funcionamiento de esta celda, es útil analizar el circuito de control y medición. La señal de excitación tiene como fuente un generador de voltaje de barrido lineal. Ésta se alimenta a un circuito potencióstático como el que se muestra en la figura 9. El circuito B cumple dos funciones principales. La primera función es establecer en el electrodo de referencia un valor de resistencia eléctrica de entrada muy grande ($> 10^{11} \Omega$), evitando así que la corriente eléctrica circule por éste, y en consecuencia, el potencial de éste se mantiene constante. La segunda función es informar sobre la diferencia de potencial entre el electrodo de referencia y la tierra común; como el electrodo de trabajo también está conectado a la tierra común, el resultado es que el circuito B informa de la diferencia de potencial entre éste y el electrodo de referencia. El circuito amplificador A recoge esta información y la compara con el voltaje de la señal de entrada; para eliminar las diferencias, impulsa una corriente hacia la celda, a través del contraelectrodo. Así, se consigue que la diferencia de potencial entre WE y RE sea igual a la deseada. [29]

La corriente generada en el electrodo de trabajo se convierte en un voltaje con un circuito de transimpedancia. A continuación el sistema de adquisición registra los valores de voltaje (corriente) en función del tiempo, los cuales se presentan en un gráfico *Corriente vs Potencial*, conocido como voltamograma.

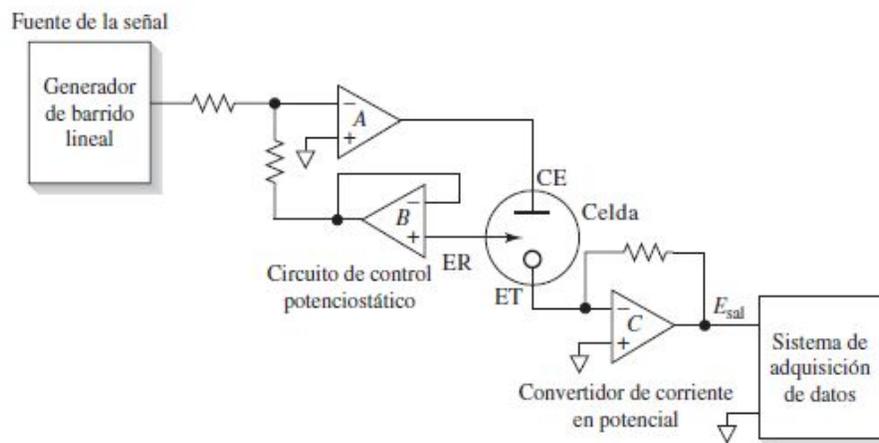


Figura 9. Circuito de potencioestato basado en amplificadores operacionales. Tomado de [27]

Propiedades de los electrodos de celda

Para cumplir su función, cada electrodo debe tener ciertas propiedades características. El electrodo de trabajo debe ser de un material conductor susceptible de polarización (para lo cual se implementan también dimensiones reducidas) pero no debe sufrir cambios químicos en el rango de voltajes de polarización. En la figura 10 se muestran los intervalos de potencial posibles para tres tipos de electrodos de trabajo en diversos electrolitos de soporte en soluciones acuosas. Los valores límite de potencial pueden deberse al electrodo, pero generalmente son consecuencia de los procesos de reducción u oxidación que sufre el agua. Respecto al contraelectrodo, además de ser de un material conductor e inerte, se busca que sea de un tamaño tal que la electricidad viaje eficientemente desde la fuente de la señal, a través de la solución, hasta el electrodo de trabajo.

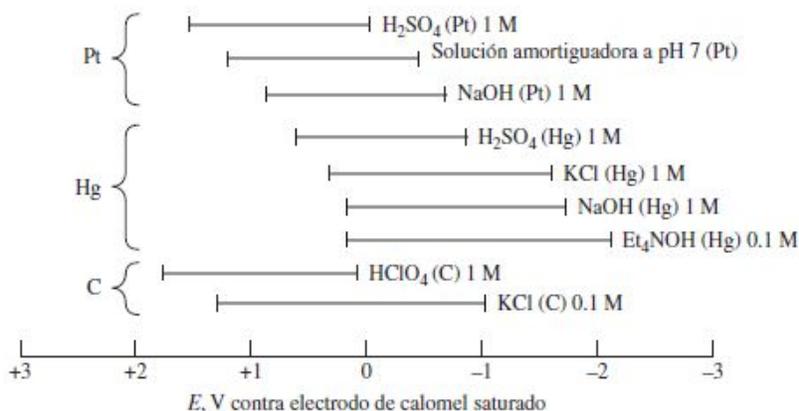


Figura 10. Intervalos de potencial para electrodos de Pt, Hg y C en diferentes electrolitos de soporte.

El electrodo de referencia es una de las partes más importantes de un sensor electroquímico, y la precisión de las mediciones depende fuertemente de la calidad de este electrodo. Éste debe satisfacer tres requisitos principales: (1) debe tener un potencial estable, es decir, no debe depender de la composición ni de los cambios de la solución en la que esté inmerso; (2) el potencial se debe regresar rápidamente a su valor de equilibrio después de una pequeña perturbación; (3) el potencial debe ser reproducible. Para ello, además de su construcción especial, debe estar conectado a un circuito eléctrico de retroalimentación para impedir el paso de la corriente. Más adelante, en la sección 2.3.1, se va a hacer una revisión de los materiales más

usados para fabricar los electrodos de trabajo, auxiliar y de referencia, esto es, aquellos que siguen los lineamientos mencionados arriba.

En algunas aplicaciones se puede prescindir del uso de un electrodo y trabajar con un sistema de dos electrodos. En este caso, las salidas del circuito de potenciostato A y B en la figura 9 se ponen en contacto con un solo electrodo (figura 11), que entonces debe cumplir la función de contraelectrodo como de electrodo de referencia. Como la corriente debe circular por tal electrodo, el potencial de referencia esperado puede variar, por lo que se prefiere el término de *electrodo de pseudoreferencia (P-RE* en la figura 11). Esta configuración se usa generalmente cuando se tienen microelectrodos, en los que la corriente que fluye es muy pequeña y por lo tanto la polarización del segundo electrodo es baja.

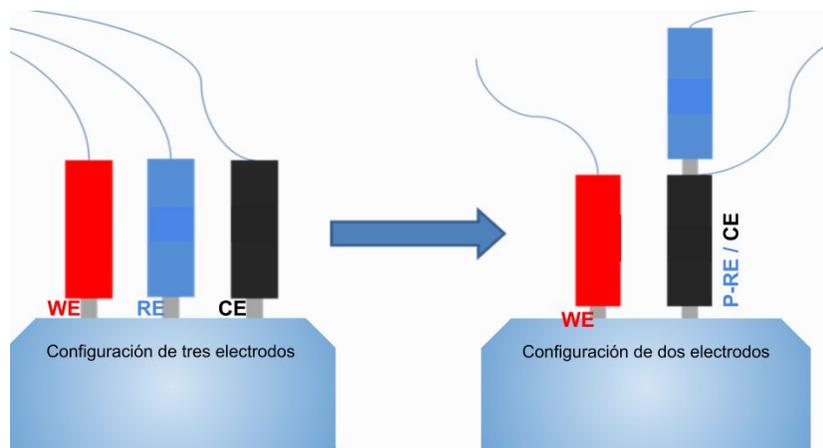


Figura 11. Conversión de un sistema de tres electrodos a uno de dos electrodos. Modificado de [30]

2.2.3.2 Voltamogramas

En la figura 12 se muestra la apariencia de un voltamograma en el que la señal de excitación ha sido un barrido lineal, y en el que hay una reducción de la especie A para dar un producto P:



En este caso se muestra la convención de que las corrientes catódicas (barridos hacia valores más negativos) son positivas. Los voltamogramas de barrido lineal adquieren la forma de una curva sigmoidea, por lo que se denominan *ondas voltamétricas*. Al valor de la corriente en la meseta superior de la curva se le llama *corriente de difusión limitada o corriente limitante* i_L . El potencial al cual la corriente es igual a la mitad de la corriente límite se llama *potencial de semionda* $E_{1/2}$. La corriente llega a una meseta porque el consumo de analito se ve limitado por la velocidad a la cual el reactivo puede llegar a la superficie. En algunos casos, se puede relacionar de forma proporcional el valor de la corriente limitante con el de la concentración de bulto del analito, como en la ecuación 2, donde c_A es la concentración del analito y k_L es una constante de proporcionalidad.

$$i_L = k_L c_A \quad \dots \text{Ec. 2}$$

Se puede considerar el siguiente análisis para modelar el proceso de limitación de la corriente debido a la difusión, revisando el caso más sencillo de excitación con un potencial escalonado. Se toma la reacción general en la ecuación 1, se supone que la concentración inicial de A es c_A y la del producto P es cero, y que la reacción de reducción es rápida y reversible. Las concentraciones de A y P en la capa adyacente al

electrodo (c_A^0 y c_P^0 respectivamente) se pueden expresar en cada momento mediante la ecuación de Nernst (ecuación 3).

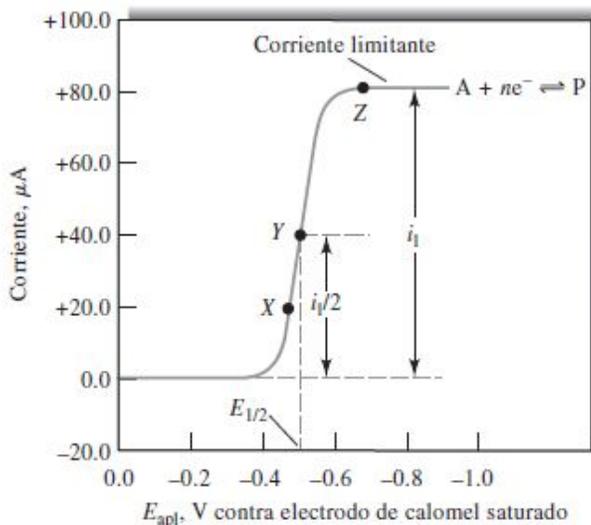


Figura 12. Voltamograma de barrido lineal típico. Adaptado de [27]

$$E_{apl} = E_A^0 - \frac{0.0592}{n} \log \frac{c_P^0}{c_A^0} - E_{ref} \quad \dots \text{Ec. 3}$$

...Ec. 3

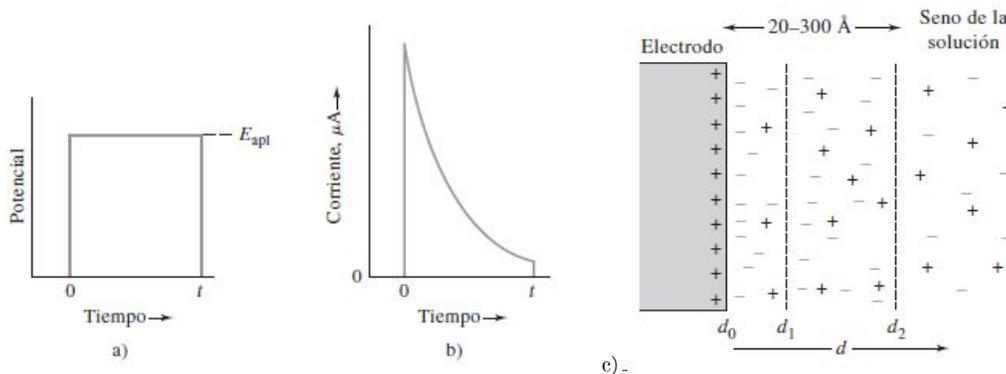


Figura 13. Respuesta de la corriente ante un potencial escalonado que se aplica a un electrodo plano en una solución sin agitar. a) Potencial de excitación. b) Respuesta de corriente. c) Esquema de la capa adyacente al electrodo. Adaptado de [27]

Cuando se alcanza el potencial de reducción del analito, la corriente aumenta rápidamente y la concentración del analito cae a cero localmente en la superficie del electrodo. En el seno de la solución se mantiene una concentración máxima c_A . A continuación, el analito se mueve del seno de la solución hacia la doble capa eléctrica por alguno (o varios) de los métodos de transferencia de masa: (1) difusión, que es el movimiento debido a la presencia de un gradiente de concentración; (2) migración, que es el movimiento bajo la influencia de un gradiente de potencial; (3) convección, que se refiere al movimiento provocado por alguna fuerza mecánica, como agitación o hidrodinámica. Sin embargo, la corriente disminuye con rapidez en el tiempo (figura 13 b) porque A debe recorrer cada vez mayores distancias para alcanzar la capa superficial. Además, el gradiente de concentración, fuerza motriz del movimiento del analito, también va disminuyendo al pasar el tiempo. La disminución de la corriente es proporcional a la disminución de tal gradiente de concentración $\frac{\partial c_A}{\partial x}$ (pendiente de las curvas en la figura 14 b, ecuación 4. A esta corriente se le nombra *corriente de estado estable o corriente faradaica*.

$$i = nFAD_A \left(\frac{\partial c_A}{\partial x} \right) \quad \dots \text{Ec. 4}$$

Analizando la dependencia del gradiente de concentración con el tiempo, se puede llegar a la ecuación de Cottrell [17] [27] :

$$i(t) = nFAc_A \sqrt{\frac{D_A}{\pi t}} \quad \dots \text{Ec. 5}$$

En la ecuación 4 y la ecuación 5 i es la *corriente de estado estable* medida en amperes, n es el número de moles de electrones por mol de analito, F es la constante de Faraday, A es el área superficial del electrodo, D_A es el coeficiente de difusión para A, t es el tiempo después que se aplica la señal de excitación, c_A es la concentración original del analito A. Es importante hacer notar la *dependencia de la corriente de estado estable con la función inversa de $t^{1/2}$* que es característica de los procesos en los que la velocidad de electrólisis está controlada por efectos difusivos.

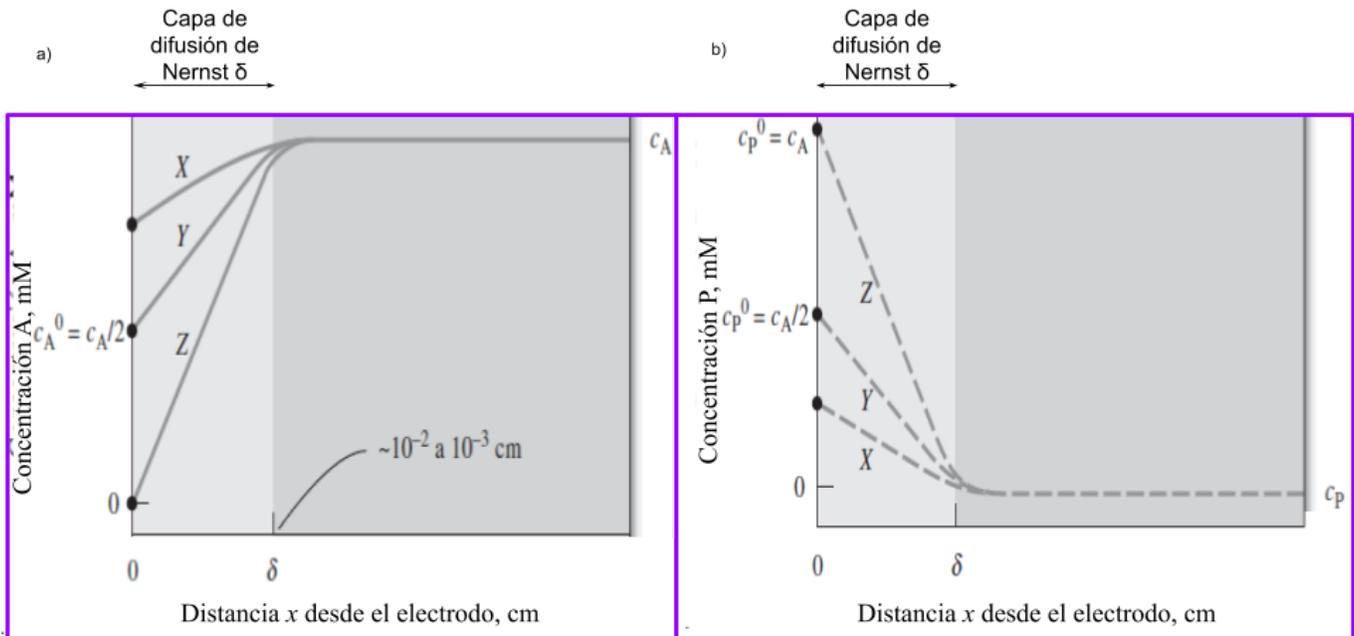


Figura 14. Perfiles de concentración en función de la distancia durante la reducción ($A + ne^- \leftrightarrow P$) en un electrodo plano para los tres puntos (potenciales) indicados en la figura 12 . Adaptado de [27]

Con la finalidad de obtener una ecuación para la curva sigmoidea del voltamograma en la figura 12, se busca poner a c_A^0 y c_P^0 en función de la corriente ($c_X^0 = f(i)$), para después sustituir estas relaciones en la ecuación 3 ($E_{apl} = f(c_A^0(i), c_P^0(i))$), y así derivar una relación de la forma $i = f(E_{apl})$. Primero, se simplifica el modelo de la corriente en función del gradiente, considerando electrodos de dimensiones reducidas. Se asume que debido a la mínima área de reacción, la electrólisis no altera de manera apreciable la concentración inicial de A y P en el seno de la solución. Con esto el gradiente de concentración y la corriente se reescriben como en la ecuación 6, donde δ es el espesor de la capa de difusión de Nernst y k_A es una constante.

$$i = nFAD_A \left(\frac{\partial c_A}{\partial x} \right) = nFAD_A \left(\frac{c_A - c_A^0}{\delta} \right) = k_A (c_A - c_A^0) \quad \dots \text{Ec. 6}$$

A continuación, se sustituye la ecuación 2 (de la corriente limitante $c_A = i_L/k_L$) en la ecuación 6. Reordenando los términos se obtiene:

$$c_A^0 = (i_L - i)/k \quad \dots \text{Ec. 7}$$

Seguidamente, para establecer una relación para c_P^0 en función de i se supone que la concentración de P cumple una relación con la corriente similar a la ecuación 6, y se asume que la concentración de P se aproxima a cero en el seno de la solución ($c_P = 0$). El signo menos en la ecuación 8 se debe a la pendiente negativa del perfil de concentración de P.

$$i = -nFAD_P \left(\frac{c_P - c_P^0}{\delta} \right) = -nFAD_P \left(\frac{-c_P^0}{\delta} \right) = k_P c_P^0 \quad \dots \text{Ec. 8}$$

Entonces se tiene que:

$$c_P^0 = i/k_P \quad \dots \text{Ec. 9}$$

Sustituyendo la ecuación 7 y la ecuación 9 en la ecuación de Nernst (ecuación 3) se obtiene, después de algunos arreglos:

$$E_{apl} = E_A^0 - \frac{0.0592}{n} \log \frac{k_A}{k_P} - \frac{0.0592}{n} \log \frac{i}{i_L - i} - E_{ref} \quad \dots \text{Ec. 10}$$

Sustituyendo el punto de media onda (i, E_{apl}) = ($i_L/2, E_{1/2}$), en la ecuación 10 se tiene que:

$$E_{apl} = E_{1/2} = E_A^0 - \frac{0.0592}{n} \log \frac{k_A}{k_P} - E_{ref} \quad \dots \text{Ec. 11}$$

Al sustituir esta expresión en la ecuación 10, se define una expresión para la curva sigmoidea del voltamograma en la figura 12:

$$E_{apl} = E_{1/2} - \frac{0.0592}{n} \log \frac{i}{i_L - i} \quad \dots \text{Ec. 12}$$

Finalmente, de la ecuación 11, cuando k_A/k_P se aproxima a uno, se puede establecer una relación entre el potencial de media onda y el potencial de reducción estándar del analito A.

$$E_{1/2} = E_A^0 - E_{ref} \quad \dots \text{Ec. 13}$$

Los modelos aquí estudiados son clave para extraer información del voltamograma que arroje el proceso de electrólisis. Por ejemplo, los valores de potencial de media onda permiten estimar los valores de potencial estándar de reducción para cada componente (ecuación 13), y conjeturar acerca de las sustancias presentes en la muestra. Por otra parte, dada la relación de proporcionalidad entre la corriente limitante i_L y la concentración de bulto del analito, se puede calcular la concentración de un analito siempre y cuando se tenga una calibración previa que permita calcular el valor de la constante de proporcionalidad. Además de proporcionar información acerca de la muestra, conocer el comportamiento esperado de la corriente en función del tiempo o el potencial, puede servir de referencia para estudiar los criterios de desempeño del sensor. Por ejemplo, se suelen hacer electrólisis a sustancias cuyo voltamograma es bien conocido (e.g. ácido ascórbico o al ión ferricianuro), para que de la comparación con el gráfico resultante se obtenga información acerca de la estabilidad del potencial del electrodo de referencia, la uniformidad de la superficie del electrodo de trabajo, la sensibilidad entre un arreglo y otro, la naturaleza de los pasos que limitan la cinética del proceso, y la tan importante reproducibilidad. [22]. Este tipo de análisis es el que más interesa en esta etapa del proyecto.

2.2.3.3 Tipos de métodos voltamperométricos

Los métodos voltamperométricos se subclasifican según la señal de excitación que es utilizada. Algunos tipos de señales se muestran en la figura 15. Muchas veces estas señales son una combinación del barrido lineal de potencial y del pulso onda cuadrada, por lo que los modelos descritos antes también se aplican a éstas. A continuación se describen las técnicas cronoamperometría y voltametría cíclica, puesto que son las que interesan en esta etapa del proyecto por su facilidad de implementación, y se mencionan algunas de sus aplicaciones en biosensores electroquímicos.

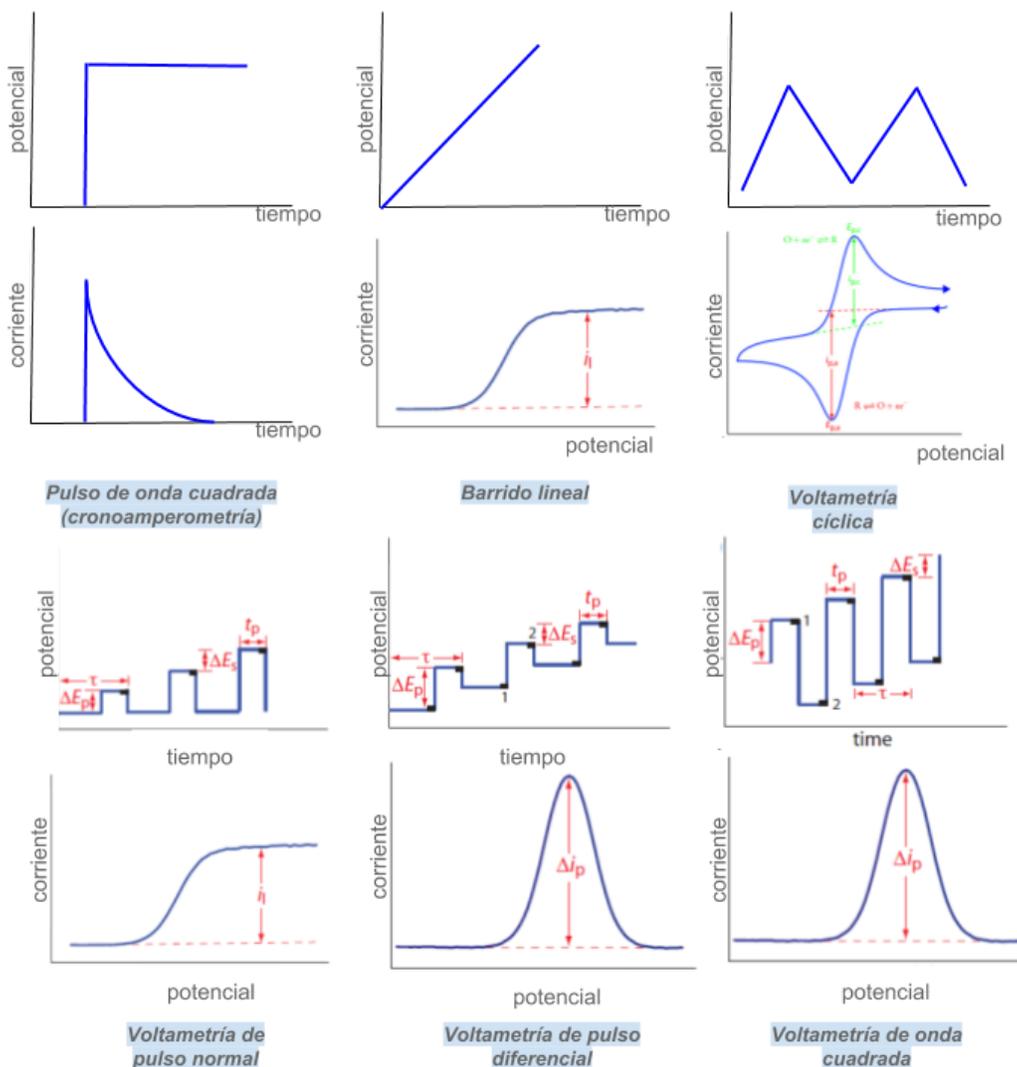


Figura 15. Señales de voltaje de excitación en el tiempo, que se utilizan en voltametría. Tomado de [31].

Cronoamperometría

En este método un potencial de onda cuadrada es aplicado al electrodo de trabajo, y se mide la corriente como función del tiempo. Se puede relacionar la carga transportada por el electrodo con la concentración de bulto. Para ello, se llevan a cabo calibraciones en las que se registra la corriente generada en función del tiempo para diferentes concentraciones conocidas de analito, a continuación se integra el área de cada curva $I(t)$, como la mostrada en la figura 13 b para obtener la carga para cada concentración. Si el proceso de transducción funciona como se espera, la gráfica carga vs concentración debe ser una recta. Esta recta sirve

posteriormente para interpolar valores de concentración desconocidos a partir del cálculo de la carga detectada correspondiente.

El ejemplo más común de un dispositivo trabajando con cronoamperometría es el sensor de glucosa, que se basa en la detección amperométrica de peróxido de hidrógeno. Muchas otras aplicaciones se dan cuando se combinan con moléculas de bio-reconocimiento, como se mencionó antes. Una aplicación tangible de esto es la medición de β -HCG (hormona gonadotropina coriónica) en pruebas de embarazo avanzado. Kueng et al. han implementado la amperometría para detectar ATP con un límite de detección de 10 nmol/L. Michael et al. la han usado para monitorear en tiempo real la liberación de neurotransmisores. [17]

Voltametría cíclica

La voltametría cíclica forma parte de los métodos de barrido lineal y es una de las técnicas más usadas en la implementación de los biosensores electroquímicos. El voltaje se barre entre dos valores V_1 y V_2 a una velocidad fija, en ambas direcciones de escaneo, y el ciclo se puede repetir cuantas veces sea necesario. En una dirección del barrido se induce la reducción del analito, y en el barrido en dirección inversa, se induce la reoxidación del producto de la reacción inicial. La velocidad de escaneo $(V_1 - V_2)/(t_2 - t_1)$ es un factor crítico, dado que la duración del potencial en el valor al que ocurre una reacción redox debe ser suficiente para permitir que la cinética de la reacción se cumpla. Este método es útil para obtener información acerca del potencial redox, las velocidades de reacción del analito y la reversibilidad de una reacción. También a partir del voltamograma generado con este método, se puede determinar la concentración del analito e identificar cualitativamente los solutos presentes. [32]

Este método, a velocidades rápidas de barrido (FSCV, por sus siglas en inglés “fast-scan cyclic voltammetry”) es común en la cuantificación in vivo de neurotransmisores. Se ha usado además en biosensores de colesterol, basados en el atrapamiento de la enzima colesterol oxidasa. El método se ha usado en combinación con membranas lipídicas inmovilizadas en la superficie del electrodo, cuyo funcionamiento consiste en que mediante voltametría cíclica, se mida la superficie electroactiva libre del electrodo, la cual está relacionada con la cantidad de membrana lipídica destruida, y a su vez, con la concentración del analito, que destruye la membrana en cuestión. [17] Esta técnica sirve también para caracterizar el funcionamiento y las propiedades de los electrodos. Por ejemplo, se usa para medir indirectamente la superficie electroquímicamente activa de éstos. [17]

Transducción con elementos de bioreconocimiento

Además del intercambio directo de electrones entre analitos electroquímicamente activos y el electrodo, la transferencia de electrones se puede dar a través de elementos catalíticos u otras moléculas conocidas como mediadores. A estos procesos se les clasifica como “transducción electrónica indirecta o directa”, dependiendo de si el transporte de electrones necesita de una especie mediadora o no (figura 16). En la transducción electrónica directa, la enzima inmovilizada en la superficie cataliza selectivamente la transformación del analito, y ya sea una especie electroactiva generada en este proceso (por ejemplo, H₂O₂ generado en la reacción catalítica de la glucosa), o los electrones resultantes de la reacción, son transferidos directamente de la superficie del electrodo. [20] En la transducción electrónica indirecta, la molécula mediadora transporta los electrones entre el centro activo de la enzima y los electrodos. Los mediadores son moléculas pequeñas que pueden reaccionar rápidamente con una enzima, debido a que tienen bajos

potenciales de oxidación. Son oxidadas en el electrodo o reducidas en el sitio de reacción de la enzima, o viceversa, por lo tanto, deben exhibir una cinética reversible e independiente de parámetros como el pH o la concentración de oxígeno. Los mediadores más usados son: ferrocenos y sus derivados, ferrocianuro, azul de metileno, benzoquinona y N-metil fenazina. [33].

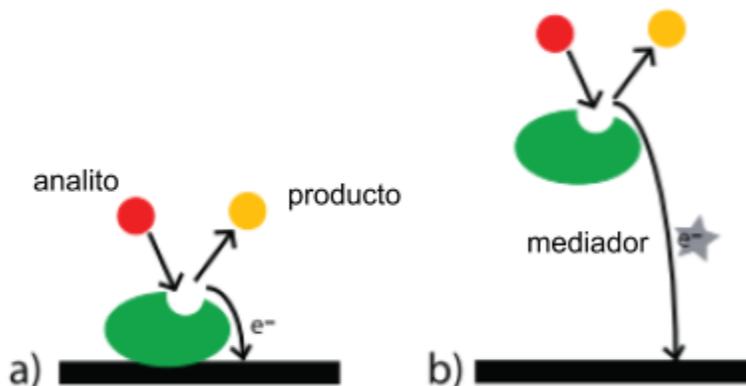


Figura 16. Esquema de la transducción directa o indirecta. a) Transducción directa: los electrones generan una corriente que es detectable sólo si la reacción tiene lugar cerca de la superficie del electrodo. b) Transducción indirecta: con la ayuda de un mediador se transportan los electrones entre el sitio de reacción y la superficie del electrodo.

La elección de la técnica voltamperométrica a utilizar dependerá de las características de la muestra, incluida la concentración de analito esperada. Por ejemplo, la cronoamperometría es ideal para análisis rápidos con un sensor selectivo, o en sistemas de flujo. La voltametría cíclica se puede usar para estudiar el comportamiento electroquímico y cinético de las especies generadas en el electrodo, y también para determinar la concentración del analito, aunque otras técnicas como la voltametría de pulso diferencial (figura 15 b) son más adecuadas para el análisis cuantitativo. [31]

2.3 Fabricación de biosensores electroquímicos

Dado que las reacciones en un biosensor electroquímico son detectadas en la vecindad de la superficie de los electrodos, éstos juegan un papel crucial en el desempeño de tales dispositivos. La selección del material del electrodo, la modificación de su superficie y sus dimensiones tienen gran influencia en su habilidad de detección. El camino a tomar para el diseño y construcción de un biosensor electroquímico depende en gran medida del principio de transducción, los parámetros que van a ser detectados y el medio en que se va a utilizar. Es por ello que en la actualidad el desarrollo de biosensores electroquímicos es una tarea interdisciplinaria que involucra la implementación de nuevas técnicas y nuevos materiales, por ejemplo, para resolver el problema de la biocompatibilidad. Como ya se mencionó, uno de los requisitos que deben cumplir los dispositivos previstos para el diagnóstico PoC es la portabilidad. Es por ello que es necesario resolver también problemas de miniaturización y de disminución del tiempo de medición y análisis.

Los materiales usados en los biosensores electroquímicos se pueden distribuir en cuatro categorías: (1) materiales para los electrodos, (2) materiales para el sustrato de soporte, (3) elementos de funcionalización como enzimas, anticuerpos, antígenos, mediadores y cofactores y (4) materiales para la inmovilización de estos últimos en la superficie de los electrodos. [25] En las secciones siguientes se revisarán los materiales y métodos reportados para la fabricación de los biosensores electroquímicos, haciendo un enfoque principalmente en la fabricación de los arreglos de electrodos.

2.3.1 Materiales de fabricación

Ya se mencionó que un electrodo de trabajo debe estar fabricado de un material que sea buen conductor, inerte, es decir que no participe en la reacción, y que permita un amplio rango de potenciales de trabajo. Hay electrodos de metales como oro, níquel, platino, acero inoxidable, usados debido a sus excelentes propiedades eléctricas y mecánicas. También se usan materiales a base de carbono, como grafito, fibra y pastas de carbono, carbono vítreo y recientemente, materiales novedosos como grafeno y nanotubos de carbono. Estos últimos presentan ventajas como el aumento de la razón superficie-volumen y alta resistencia mecánica.[25] Estos mismos materiales son comunes para la fabricación del contraelectrodo. Otro tipo de materiales implementados son los polímeros conductores como polianilina, polipirrol y poliestireno, los cuales se usan en forma de recubrimientos.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-----------------------------------|---------------------|-----------------------------------|--------------------|--------------------|------------------|----|
| Li 1.07 9.32 | Be 3.08 3.25 | | | | | | | | | | | B 3.65 2.74 | C | N | O | F | Ne |
| Na 2.11 4.75 | Mg 2.33 4.30 | | | | | | | | | | | Al 3.65 2.74 | Si | P | S | Cl | Ar |
| K 1.39 7.19 | Ca 2.78 3.6 | Sc 0.21 46.8 | Ti 0.23 43.1 | V 0.50 19.9 | Cr 0.78 12.9 | Mn 0.072 139 | Fe 1.02 9.8 | Co 1.72 5.8 | Ni 1.43 7.0 | Cu 5.88 1.70 | Zn 1.69 5.92 | Ga 0.67 14.85 | Ge | As | Se | Br | Kr |
| Rb 0.80 12.5 | Sr 0.47 21.5 | Y 0.17 58.5 | Zr 0.24 42.4 | Nb 0.69 14.4 | Mo 1.89 5.3 | Tc 0.7 14 | Ru 1.35 7.4 | Rh 2.08 4.8 | Pd 0.95 10.5 | Ag 6.21 1.61 | Cd 1.38 7.27 | In 1.14 8.75 | Sn _(w) 0.91 11.0 | Sb 0.24 41.3 | Te | I | Xe |
| Cs 0.50 20.0 | Ba 0.26 39 | La 0.13 79 | Hf 0.33 30.6 | Ta 0.76 13.1 | W 1.89 5.3 | Re 0.54 18.6 | Os 1.10 9.1 | Ir 1.96 5.1 | Pt 0.96 10.4 | Au 4.55 2.20 | Hg _{liq} 0.10 95.9 | Tl 0.61 16.4 | Pb 0.48 21.0 | Bi 0.086 116 | Po 0.22 46 | At | Rn |
| Fr | Ra | Ac | Ce 0.12 81 | Pr 0.15 67 | Nd 0.17 59 | Pm | Sm 0.10 99 | Eu 0.11 89 | Gd 0.070 134 | Tb 0.090 111 | Dy 0.11 90.0 | Ho 0.13 77.7 | Er 0.12 81 | Tm 0.16 62 | Yb 0.38 26.4 | Lu 0.19 53 | |
| | | | Th 0.66 15.2 | Pa | U 0.39 25.7 | Np 0.085 118 | Pu 0.070 143 | Am | Cm | Bk | Cf | Es | Fm | Md | No | Lr | |

Figura 17. Conductividad eléctrica (primer valor) y resistividad eléctrica(segundo valor) de los metales a 295 K. La conductividad está en unidades de 10^5 (ohm cm)⁻¹ y la resistividad está en unidades de 10^4 ohm cm. Tomada de [34]

Ya se mencionaron los requisitos de estabilidad que debe cumplir un electrodo de referencia. Los más antiguos y para los que existen tablas de valores de referencia son el electrodo de gas hidrógeno y el electrodo de calomel. El más común entre los sensores electroquímicos es el electrodo de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl) (figura 18). Para fabricar un electrodo de Ag/AgCl, se usa un alambre de plata o una película de plata depositada por diferentes técnicas de depósito de metales en un sustratos. Después, una sección de la superficie se modifica química o electroquímicamente para formar una capa delgada de cloruro de plata. En el caso de los electrodos de alambre, éste se sumerge en una solución saturada de cloruros (como KCl 3M), generalmente dentro de un capilar de vidrio, y el contacto con la solución del analito se permite a través de una membrana o región porosa. Cuando no se sumerge en la solución de cloruros, lo que se obtiene son electrodos de pseudoreferencia, los cuales se tratarán más adelante. Éstos se pueden fabricar por la técnica de screen printing, usando directamente una tinta de plata/cloruro de plata. Asimismo se han

usado materiales como oro, platino o hasta formas de carbono, dependiendo de la naturaleza del analito, y de las veces que se pretende reutilizar el sistema.

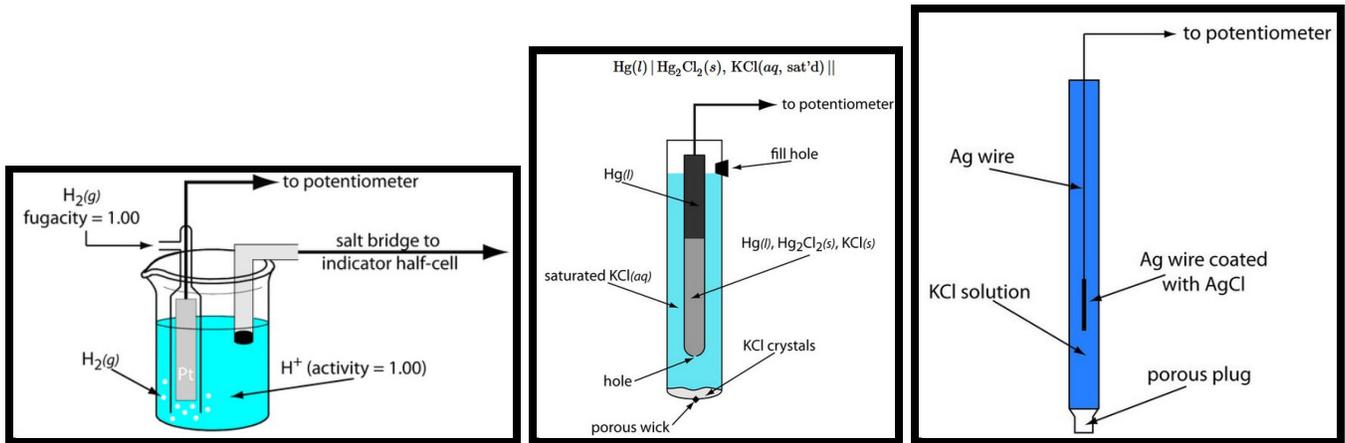


Figura 18. Esquema de los electrodos de referencia más conocidos: 1) Electrodo de hidrógeno estándar 2) Electrodo de calomel saturado 3) Electrodo de plata/cloruro de plata insaturado. Tomado de [35]

Ya en la sección 1.1.1, se habló de la popularización del uso de plásticos como materiales de construcción de los dispositivos LoC. En la búsqueda de integrar arreglos de electrodos a estos dispositivos, también se ha popularizado el uso de plásticos y de vidrio como materiales para el sustrato de estos arreglos. Se comercializan además, sensores electroquímicos en sustratos cerámicos, y recientemente, con el desarrollo de la tecnología de impresión de tintas conductoras, se pueden encontrar sustratos de papel.

2.3.2 Métodos de fabricación de electrodos

Además del material de construcción de los electrodos, la forma y el tamaño deseados del arreglo, determinan la técnica de fabricación a utilizarse. Algunos ejemplos de arreglos de electrodos se muestran en la figura 19.

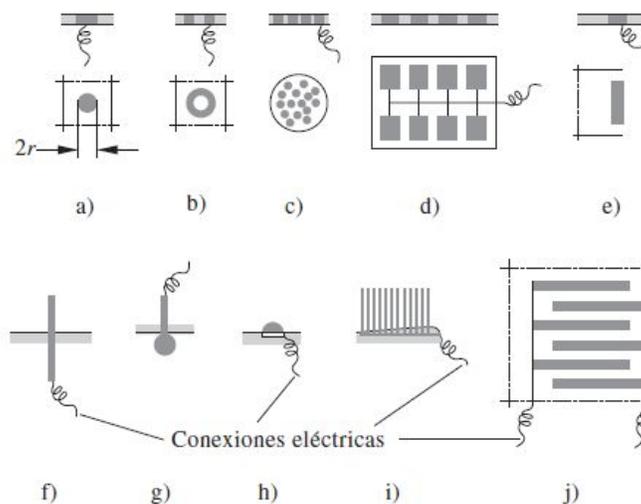


Figura 19. Principales formas de microelectrodos y sus configuraciones: a) microdisco; b) microanillo; c) electrodo compuesto; d), e) microbanda; f) fibra sencilla; g) microesfera; h) microhemisferio; i) configuración de fibras; j) interdigitados.

En las secciones siguientes se van a describir algunos métodos comunes de fabricación de electrodos para sensores electroquímicos. Se clasificarán en aquellos que usan “técnicas de fabricación tradicionales” y “técnicas no convencionales”.

En las primeras se consideran las técnicas de fabricación de electrodos que se han usado desde los inicios de la electroquímica, y por otro lado, las técnicas que se derivan de la industria de MEMS y semiconductores. Ejemplos de estas últimas son los procesos fotolitográficos, las técnicas de alta precisión de depósito de películas delgadas, y los procesos controlados de ataque físico y químico. Estas técnicas son muy efectivas para generar estructuras de alta resolución a micro y nanoescala, sin embargo, requieren de instrumentación costosa, acceso a instalaciones de cuarto limpio, y generalmente se limitan a sustratos rígidos y no transparentes.

En contraste, se nombran “técnicas de fabricación no convencionales” a aquellas que, generalmente con un bajo costo y con mayor accesibilidad, permiten obtener dispositivos de prototipado rápido y mayor escalabilidad comercial, aunque con menor resolución. Estas técnicas dan mayor flexibilidad en cuanto a los materiales que se pueden usar; por ejemplo, se ha logrado incluir el uso de nuevos sustratos como plásticos flexibles o papel, y materiales conductores como pastas de grafito, de plata, o polímeros conductores. Ejemplos de estas técnicas son la litografía suave, corte de máscaras adhesivas, moldeado por temperatura, uso de polímeros con memoria de forma, screen-printing, inkjet printing, etc.

2.3.2.1 Métodos de fabricación con técnicas tradicionales

Electrodos en forma de barras, alambres o fibras.

Desde los inicios de la electroquímica, se usan barras o alambres metálicos para formar los electrodos de la celda. Otras configuraciones alternativas muy usadas son el electrodo de gota de mercurio y los electrodos en forma de disco o anillo en conexión con un alambre (figura 20). Los alambres y los electrodos de disco o anillo se suelen fabricar de metales nobles como oro o platino, mientras que los alambres de conexión pueden ser incluso de cobre.

A partir de la implementación de las mediciones potenciométricas en el campo de la electrofisiología, se popularizó también el uso de fibras de carbono. Generalmente, sólo la sección transversal del alambre o fibra queda expuesta, y el resto se protege mediante un capilar amoldado a su superficie o sellado con adhesivo epóxico. De esta forma, se conoce el área de electrodo que está en contacto en la reacción.

Una manera de modificar la superficie de este tipo de electrodos es mediante la técnica de electrodeposición. Éste es un tratamiento electroquímico, en el que la sustancia con que se desea recubrir está en forma de cationes disueltos en una solución acuosa. Tras la aplicación de una corriente eléctrica, se provoca la reducción de los cationes en la superficie de la pieza a recubrir, creando una película delgada en toda la superficie de la pieza. Este método se ha utilizado para recubrir electrodos con materiales que tengan propiedades diferentes, como resistencia a la corrosión, propiedades catalíticas como TiO₂, polímeros conductores, etc.

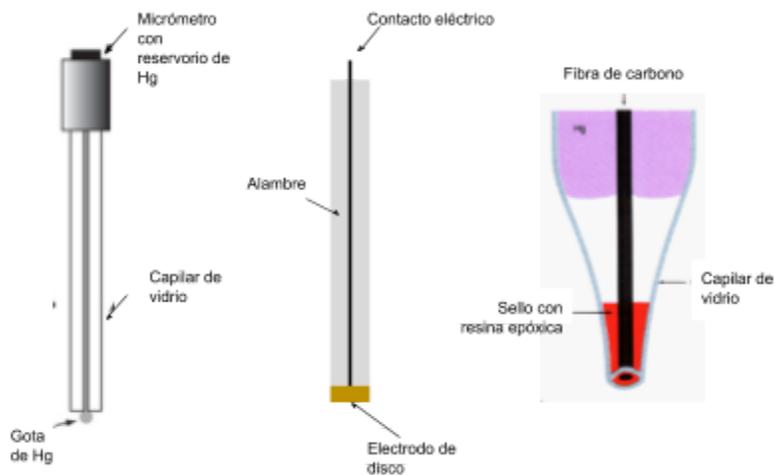


Figura 20. Ejemplos de esquemas de electrodos de trabajo.

Electrodos planares de película delgada

Los depósitos de película delgada se caracterizan por ser muy pequeños en una dimensión, en comparación con las otras dos dimensiones. No existe un límite superior bien definido en cuanto a lo que se considera película delgada, pero se usan desde varios micrómetros hasta unas cuantas capas de átomos. [36] Los electrodos de películas delgadas son los más utilizados para aplicaciones de Lab on Chip debido a que su disposición planar y espesor permiten su integración y sellado con elementos microfluídicos. Las técnicas de depósito de películas delgadas se desarrollaron primero para la fabricación de circuitos integrados y *sistemas microelectromecánicos* (MEMS). Los dos tipos más comunes son: sputtering y evaporación (por métodos físicos o químicos).

En el caso de la evaporación, se aumenta la temperatura del material a ser depositado, para que se formen partículas de vapor de éste, en condiciones de vacío. El aumento de energía cinética se logra al hacer incidir un haz de electrones (e-beam) o por entrar en contacto con un filamento caliente (PVD). Cuando el vapor del material entra en contacto con un sustrato, los átomos o moléculas se condensan, y se agrupan formando una capa delgada, uniforme, sólida. Este proceso es anisotrópico, es decir, las partículas de vapor viajan en todas direcciones desde la fuente. La temperatura que se alcanza puede llegar a ser tan alta, que los sustratos que se pueden utilizar son limitados, por ejemplo, no se pueden utilizar sustratos poliméricos con temperatura de transición vítrea baja.

La técnica de sputtering consiste en atacar el blanco del material que se desea depositar con partículas de gas ionizado, como iones argón. Cuando el blanco es conductor, una fuente de corriente directa polariza la cámara de tal forma que el blanco se convierte en un cátodo, y por lo tanto atrae los iones positivos hacia él. Los iones colisionan con el blanco, y por intercambio de momento los átomos del blanco salen desprendidos hacia el sustrato. Dado que las temperaturas de trabajo son menores que en la técnica de evaporación, los sustratos que se pueden usar son más diversos.

Para definir la estructura de los electrodos metálicos se utilizan los procesos de “lift-off” o de grabado. En ambos casos, es común definir el patrón mediante un proceso de fotolitografía (figura 21). Una resina *positiva* o *negativa* se deposita mediante *spin-coating* sobre un sustrato. En el proceso de grabado, el sustrato es la capa delgada del metal, y en el proceso de lift-off es el sustrato del dispositivo (plásticos,

vidrio, silicio, etc.). La resina se expone a luz UV a través de una máscara con zonas claras y opacas, según el patrón que se desee definir y el tipo de resina. Se revela el patrón en un solvente. En el caso del grabado se desea tener un patrón de resina que proteja la zona metálica que va a permanecer, es decir, con la forma de los electrodos; la zona metálica no protegida se retira mediante un proceso químico o “mojado”, o mediante un proceso físico o “en seco”. En el caso del lift-off, se forma un patrón que deje descubierta la zona del sustrato sobre la que se va a depositar el metal, con la forma de los electrodos; el depósito se realiza con las técnicas descritas antes. Finalmente, se libera la estructura metálica disolviendo o “levantando” la resina. [11]

El silicio y el dióxido de silicio son los sustratos más comunes en los procesos de fotolitografía. Además de los metales de construcción de los electrodos, que generalmente son de metales nobles, se agregan películas metálicas intermedias como de cromo o titanio para promover la adhesión a los sustratos, debido a la incapacidad de los metales nobles de formar enlaces metal-óxido.

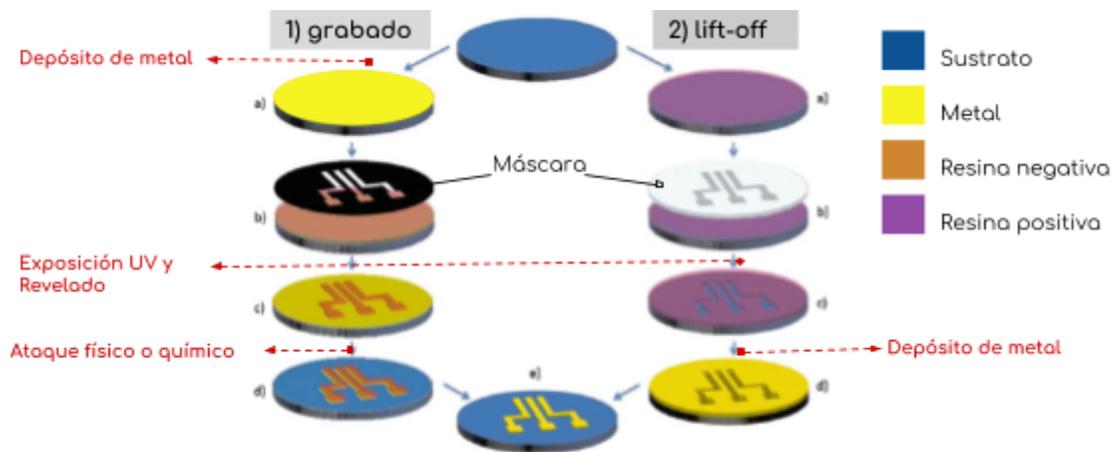


Figura 21. Fabricación de electrodos de película delgada a través de los procesos de 1) grabado o 2) lift-off. Adaptado de [11]

Actualmente la empresa “i-STAT Corporation” ha comercializado un dispositivo para diagnóstico PoC cuyos sensores son desarrollados mediante estos procesos de fabricación de electrodos de película delgada. [17] Aunque con estas técnicas se logran estructuras de alta resolución, su implementación se ve limitada por requerirse equipos e instalaciones especializados y caros.

2.3.2.2 Métodos de fabricación con técnicas no convencionales

Inkjet printing

La tecnología de impresión por inyección de tintas es una técnica de escritura directa que se presenta como un buen candidato para producir electrónica flexible y de bajo costo. Tiene ventajas como simplicidad de uso, alta resolución, rapidez, reproducibilidad, flexibilidad y generación de pocos residuos. Además, permite el uso de una gran variedad de sustratos, como vidrio, plásticos, cerámicos y papel. Se pueden depositar diferentes tipos de tintas, las cuales son soluciones de nanopartículas metálicas (plata, cobre, oro) o soluciones a base de carbono (nanotubos de carbono, grafeno, PEDOT). En la figura 22 se resume su funcionamiento: una gota de tinta es inyectada desde una boquilla con una abertura pequeña por un efecto térmico o piezoeléctrico, hacia el sustrato; el sustrato se mueve utilizando motores operados por CNC (control numérico computarizado), lo que permite crear cualquier diseño en 2D. Dependiendo de la

interacción tinta/sustrato, se pueden lograr líneas con anchos de entre 10 a 100 μm , y un espesor de cientos de nanómetros.

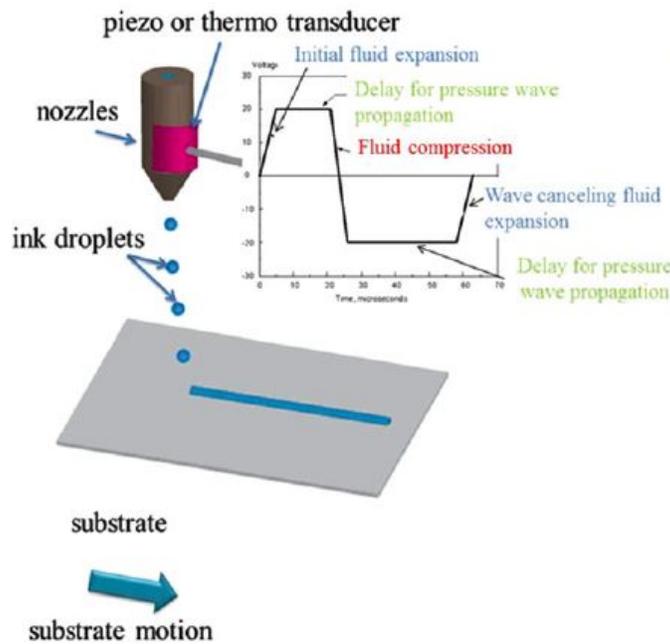


Figura 22. Esquema del funcionamiento de la técnica de impresión por inyección de tintas. Adaptado de [11].

Screen Printing

Este método consiste en definir un diseño (adhiriendo o pintando con una sustancia impermeable) en una malla tensa tejida de poliéster u otro tipo de fibras, a la que se llama pantalla. En un lado de ésta se sujeta el sustrato a recubrir, de plástico, de cerámica o de papel. La tinta conductiva se hace pasar a través del tejido esparciéndose con una pala de goma. Posteriormente se puede dar un tratamiento térmico a las tintas para evaporar los solventes. Se pueden definir varias formas de materiales diferentes, como tintas aislantes, simplemente cambiando la pantalla (figura 23). En la actualidad esta tecnología está bien establecida para la producción en masa de sensores electroquímicos desechables. Es por ello que los biosensores electroquímicos de “bajo costo” están tipificados por el uso de celdas electroquímicas fabricadas mediante esta técnica. [20]

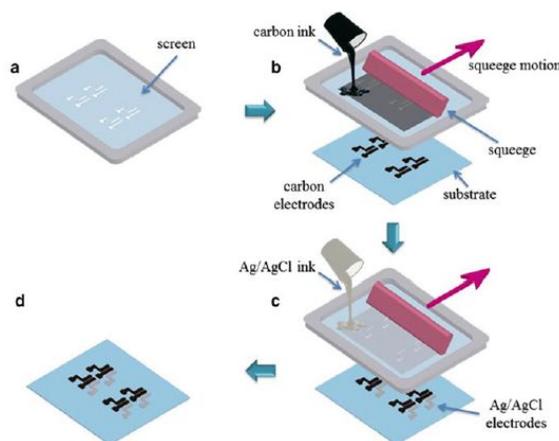


Figura 23. Proceso de *screen printing* de una celda de tres electrodos (a) pantalla con diseños definidos, (b) depósito de la capa de carbono, (c) depósito de la tinta de Ag/AgCl, (d) celda electroquímica final. Adaptado de [11].

Las tintas conductoras son una dispersión de partículas conductoras en un líquido formado generalmente por una matriz polimérica y un solvente adecuado. A veces la matriz conductora se obtiene no directamente de partículas, sino de sales precursoras. Generalmente, después de depositar estas tintas en un sustrato, se deben someter a altas temperaturas (hasta 400°C) para que se de la coalescencia de las partículas conductoras. [37]

Tecnologías de microfabricación láser

La microfabricación láser es otra técnica de escritura directa. Para crear arreglos de electrodos se puede usar de dos formas: (1) haciendo incidir un láser en materiales que al interactuar con la energía del láser cambian sus propiedades, como la conductividad; (2) grabando estructuras en materiales, mediante el fenómeno de ablación láser, la cuales posteriormente pueden ser rellenadas con pastas de materiales conductores (figura 24).

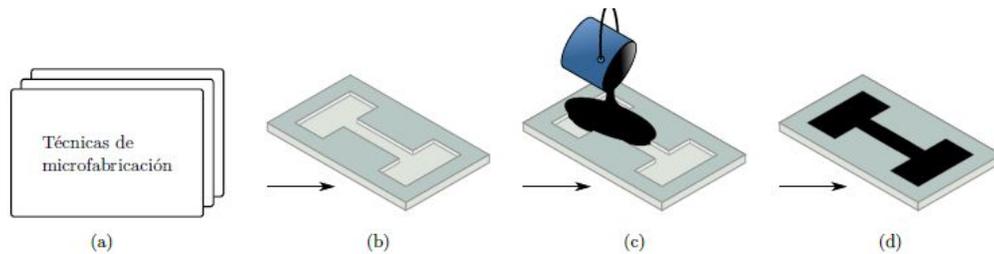


Figura 24. Esquema del método para usar los moldes fabricados por ablación láser en la preparación de electrodos.

Electrodos de superficie estructurada

Recientemente los polímeros con memoria de forma han tomado gran importancia entre los métodos de microfabricación, debido a su capacidad de generar superficies micro/nanoestructuradas en dimensiones 2.5D. Esto se logra depositando una película delgada de materiales como oro, platino, nanotubos de carbono, dióxido de silicio, dióxido de titanio, etc. sobre la superficie de una hoja del polímero pre-estresado, por ejemplo, sobre poliestireno. Calentando por encima de su temperatura de transición vítrea, el plástico sufre un proceso de encogimiento. Entonces, la película sufre una deformación de compresión, lo que resulta en la formación de arrugas de formas irregulares, pero tamaños que dependen del espesor de la película. Se han fabricado electrodos con esta técnica y presentan una mayor sensibilidad por área geométrica, puesto que tienen más superficie electroquímicamente activa por unidad de área. [38]

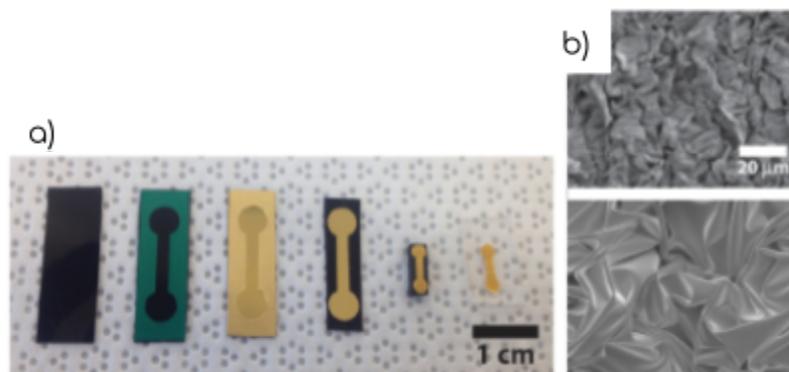


Figura 25. Fabricación de electrodos de superficie estructurada y posterior transferencia a sustratos flexibles de PDMS. a) Proceso de fabricación. b) Imágenes de SEM de las arrugas en la película de oro tras el encogimiento. Adaptada de [38]

2.3.3 Métodos de sensibilización

En el proceso de bioreconocimiento en los biosensores electroquímicos, se han implementado elementos como anticuerpos, antígenos, ácidos nucleicos, células, microorganismos y enzimas, siendo estas últimas las más usadas debido a sus capacidades biocatalíticas y unión específica. La inmovilización se realiza mediante la unión química a la superficie del electrodo, o mediante matrices de atrapamiento como polímeros, hidrogeles, gelatinas, etc. Padeste describió en 1996 la creación de aperturas de tamaños nanométricos en las superficies metálicas para inmovilizar este tipo de elementos. [39]

Otro método para sensibilizar es recubrir la superficie metálica con monocapas auto-ensambladas (SAMs por su nombre en inglés *self-assembly monolayers*) de sulfuros (tioles) y disulfuros. Este tipo de moléculas forman estructuras ordenadas con terminaciones que se pueden funcionalizar con diferentes grupos químicos dependiendo del elemento de reconocimiento que se desea reconocer; por ejemplo, los grupos carboxilo sirven para inmovilizar anticuerpos; por otro lado, a través de grupos éster se pueden formar acoplamiento de aminas, el cual a su vez permite la unión con estreptavidina y con biomoléculas funcionalizadas con biotina.

Las membranas lipídicas de bicapa (BLMs) son otro medio para inmovilizar elementos de bioreconocimiento. Éstas se pueden formar sobre superficies metálicas, polímeros conductores, agar, etc. Para ello, primero se sumerge el sustrato en una solución de lípidos, tal que se forme una monocapa de lípidos. A continuación, se sumerge en una solución electrolítica para que se dé el autoensamblado de la doble capa.

Otro ejemplo es el uso de nanotubos de carbono como medios de inmovilización, ya que es posible atrapar las enzimas en la cavidad interna de éstos.

2.3.4 Miniaturización de los electrodos

Como se ha mencionado anteriormente, la miniaturización de los dispositivos de sensado electroquímico se hace con el objetivo de integrarlos en los dispositivos Lab-on-Chip y de proveer de portabilidad a los dispositivos de diagnóstico de tipo Point-of-Care. Además, gastar menos materiales, junto con el consecuente uso de volúmenes y equipos menos especializados de detección a microescala, reduce el costo de los dispositivos. En esta sección se estudiarán otras ventajas de utilizar electrodos con dimensiones características micrométricas.

2.3.4.1 Ventajas de los microelectrodos

Las interacciones entre los parámetros eléctricos y los fenómenos de transporte en la vecindad de los electrodos son factores decisivos en el buen funcionamiento de un biosensor electroquímico. El tamaño y las propiedades de la superficie del electrodo influyen en gran medida en estas interacciones. Muy a menudo, el término microelectrodo se refiere a estructuras con dimensiones externas en el rango submilimétrico. [40] En la sección 2.3.3.2 en la que se hizo un análisis de las corrientes presentes en un experimento voltamétrico, la ecuación 4 que relaciona la corriente con el gradiente de concentración del analito se simplificó a la ecuación 6:

$$i = nFAD_A \left(\frac{\partial c_A}{\partial x} \right) \quad \gg \quad i = nFAD_A \left(\frac{c_A - c_A^\circ}{\delta} \right) = k_A (c_A - c_A^\circ)$$

Con un tratamiento más elaborado, es posible demostrar que cuanto más pequeño sea un electrodo tanto más rápido se alcanza la corriente de estado estable (ecuación 4), mostrando así la importancia de integrar microelectrodos de tamaño reducido en experimentos de voltametría. Primero se demuestra que el gradiente de concentración cumple las siguientes relaciones:

$$\frac{\partial c_A}{\partial x} = c_A^\circ \left(\frac{1}{\sqrt{\pi D_A t}} + \frac{1}{r} \right) = c_A^\circ \left(\frac{1}{\delta} + \frac{1}{r} \right)$$

...Ec. 14

Y entonces la corriente de estado estable sigue la ecuación:

$$i = nFAD_A \cdot c_A^\circ \left(\frac{1}{\delta} + \frac{1}{r} \right) \quad \text{...Ec. 15}$$

Donde r es la dimensión característica del electrodo, $\delta = \sqrt{\pi D_A t}$ es el espesor de la capa de difusión de Nernst (figura 14), t es el tiempo después de que se aplica el voltaje, D_A es el coeficiente de difusión. Se puede analizar los casos de comparación de r con δ .

- Si $r \gg \delta$, por ejemplo, muy poco después de que se aplica el voltaje, el término $1/\delta$ predomina, y se obtiene la ecuación 4.
- Si $r \ll \delta$, predomina el término $1/r$ en la ecuación 15 y entonces i depende sólo de las dimensiones del electrodo (A y r). Si éstas son pequeñas en comparación con el espesor de la capa de difusión, el estado estable se alcanza con mucha rapidez. Además, como i depende también del área del electrodo, los microelectrodos producen corrientes diminutas.

A partir del modelo anterior, y de otros análisis que se pueden realizar, las ventajas operacionales de los microelectrodos pueden resumirse como sigue:

- El estado estable se alcanza con mucha rapidez, a menudo en microsegundos o milisegundos, lo que permite el estudio de productos intermedios en reacciones electroquímicas rápidas.
- Como la corriente de la carga es proporcional al área del electrodo A y la corriente faradaica es proporcional a A/r , la contribución relativa de la carga a la corriente global disminuye con las dimensiones del microelectrodo.
- Puesto que la corriente de carga es mínima con los microelectrodos, el potencial se puede barrer rápidamente.
- Como las corrientes son tan pequeñas (picoamperes a microamperes), la caída de potencial disminuye con la reducción de las dimensiones del microelectrodo.
- En condiciones de estado estable, la relación señal-ruido en la corriente es mucho más alta que en condiciones dinámicas.
- En un sistema con flujo continuo se reduce al mínimo el espesor de la capa de difusión δ , lo que maximiza la corriente faradaica.
- Las mediciones con microelectrodos se pueden efectuar en volúmenes de solución mínimos.

En el presente desarrollo de biosensores electroquímicos se espera aprovechar estas condiciones mediante la fabricación de arreglos de electrodos miniaturizados.

2.3.4.2 Electrodo de pseudo-referencia

En la sección sobre los materiales de fabricación de electrodos se mencionaron algunas formas en que se fabrican electrodos de plata/cloruro de plata con geometrías planares, y se apuntó que cuando no se sumerge el arreglo a una solución saturada de cloruro, lo que se obtiene es un electrodo de *pseudo-referencia*. El problema principal que presentan los electrodos con esta construcción es la estabilidad de la capa de cloruro de plata, dado que no se puede despreciar la solubilidad del AgCl en soluciones acuosas a tales escalas (como una capa de cientos de nanómetros de espesor), por lo que no se les puede llamar *de referencia*. En muchos casos se usan simplemente alambres de plata o platino. [40]

La principal diferencia entre un verdadero electrodo de referencia y un electrodo de pseudo-referencia es la falta de equilibrio termodinámico en el caso del último, puesto que no existe un componente (anión o catión) en común entre las dos fases del límite electrodo/solución. Esta falta de estabilidad implica que puede haber un cambio en su potencial durante las mediciones puesto que depende de la densidad de corriente aplicada. Encima, suelen trabajar sólo en un rango limitado de condiciones de pH y temperatura. [40]

No obstante, el uso de estos electrodos presenta ventajas como simplicidad de fabricación y uso, reducción del efecto de resistencia óhmica al estar directamente inmersos en el electrolito, omisión del potencial de la unión líquida y de la posibilidad de contaminación de la solución de analito por moléculas o iones de los electrodos de referencia inmersos. En suma, todos los requisitos de un electrodo de referencia no se necesitan cumplir cuando se desarrollan electrodos de bajo costo y desechables (miniaturizados), y se ha encontrado que con las técnicas voltamperométricas el error tolerado en el potencial de referencia es mayor en virtud de que la corriente (a la que la concentración del analito es proporcional) permanece constante en una cierta ventana de potencial.[40]

PARTE B

METODOLOGÍA Y RESULTADOS

Definición del proyecto

Con este trabajo se buscaba contribuir con soluciones accesibles y de bajo costo al desarrollo de biosensores electroquímicos para su aplicación en la detección y cuantificación de sustancias de interés biomédico, es decir, siguiendo la necesidad de proveer soluciones de diagnóstico y terapia en “en el punto de atención (PoC)”. Tras realizar una revisión de los principios de funcionamiento y construcción de los biosensores electroquímicos y del estado del arte, y revisando las capacidades y necesidades del grupo de trabajo, se identificó que para desarrollar biosensores electroquímicos, primero era menester estandarizar uno o varios métodos de fabricación de arreglos de electrodos. Se replanteó el alcance del proyecto, y el objetivo general de este trabajo quedó como:

Desarrollar y estandarizar métodos accesibles de fabricación de arreglos de electrodos miniaturizados que puedan usarse para detectar y cuantificar sustancias de interés biomédico mediante técnicas voltamperométricas, con geometrías planas de tal forma que puedan ser fácilmente integrables en dispositivos microfluídicos tipo “Lab on a Chip”.

Se decidió comenzar en el campo de los sensores electroquímicos que trabajan bajo las técnicas electroanalíticas voltamperométricas pues presentan alta sensibilidad para identificar y cuantificar sustancias electroactivas (10^{-3} a 10^{-8} M), la señal de transducción es fácil de procesar además de que el circuito procesador es fácil de instrumentar. La miniaturización y el uso de metodologías accesibles y de bajo costo se justifican directamente de los requisitos de portabilidad y bajo costo para popularizar un dispositivo tipo PoC. Aunado a esto, haciendo un estudio de las técnicas voltamperométricas se entendieron las ventajas operacionales de implementarlas con electrodos miniaturizados. El uso de *geometrías planas* en los arreglos es para que puedan formar parte del sustrato de los canales microfluídicos y en un futuro lograr analizar la muestra dentro del mismo chip, además, muchos de los métodos de fabricación descritos en el capítulo anterior, son compatibles con los diseños planos.

Al hacer el análisis de las técnicas de fabricación al alcance y los correspondientes materiales con que se podían implementar, se identificó la oportunidad de diseñar no solo uno sino varios métodos accesibles y de bajo costo de construcción de arreglos de electrodos bajo los lineamientos ya apuntados. Esto presenta la ventaja de que los esfuerzos no se enfocan en un sólo protocolo de fabricación cuyo éxito no se tiene asegurado. Siendo así, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

01. Seleccionar los materiales y diseños más adecuados para fabricar los arreglos de electrodos, tomando en cuenta las técnicas de fabricación que se tienen al alcance o que se podrían desarrollar.
02. Diseñar las metodologías de fabricación de arreglos de electrodos.
03. Construir los arreglos de electrodos diseñados.
04. Comprobar la funcionalidad de los arreglos de electrodos en la ejecución de algunas técnicas voltamperométricas con sustancias con comportamiento conocido como peróxido de hidrógeno, ácido ascórbico o sulfato de cobre.
05. Seleccionar los arreglos de electrodos que muestren mejor desempeño en las rutinas electroquímicas preliminares, y de esto definir las metodologías de fabricación a estandarizar.
06. Estandarizar las metodologías de fabricación seleccionadas, caracterizar geométrica y eléctricamente los arreglos resultantes, y repetir las pruebas de funcionalidad como celda electroquímica para

aplicar las técnicas de cronoamperometría y de voltametría cíclica. Caracterizar la reproducibilidad de los resultados.

07. Realizar pruebas preliminares de sensibilización de los electrodos, con la enzima glucosa oxidasa y comprobar su funcionamiento como sensor de glucosa.

Según los objetivos planteados, al final del proyecto se esperaba contar con una o varias *metodologías repetibles y reproducibles* de fabricación de arreglos planares de electrodos miniaturizados útiles para la implementación de métodos electroquímicos voltamperométricos. En esta etapa temprana del proyecto se esperaba comprobar la funcionalidad de los arreglos para detectar sustancias simples, fáciles de manipular y de comportamiento conocido, como son peróxido de hidrógeno, ácido ascórbico y sulfato de cobre. La metodología que se siguió para trabajar cada objetivo particular se describe en cada uno de los capítulos de la parte de *Metodología y Resultados*.

Capítulo 3. Selección de materiales, diseños y técnicas de fabricación

3.1 Materiales y diseños generales

Para implementar los métodos voltamperométricos es necesario fabricar arreglos de dos electrodos (electrodo de trabajo y electrodo de referencia/auxiliar RE/CE) o tres electrodos (electrodo de trabajo, electrodo de referencia y contraelectrodo). El número de posibles combinaciones de diseños y materiales se estrechó tomando en cuenta:

- 1) Que existe una preferencia por arreglos con geometrías planares en el diseño de elementos que se buscan integrar a dispositivos tipo LoC
- 2) Criterios sobre las dimensiones
- 3) Las técnicas de fabricación disponibles

Para la selección de materiales de los electrodos, de entre los que cumplen las propiedades de **buena conductividad** y de ser **inertes**, se identificaron los que son compatibles con las **geometrías planares**, esto es, que permiten hacer recubrimientos uniformes, en forma de películas delgadas o gruesas. Para formar los electrodos de trabajo y conductor, en forma de películas delgadas, se sugieren los metales: *oro, platino o rodio*; en forma de película gruesa se sugieren: *tintas o pastas con partículas conductoras como plata, níquel*, y con materiales a base de *carbono*, como *grafito, grafeno y nanotubos*. Con la misma idea, para la elaboración de electrodos de pseudoreferencia se sugiere usar *plata, oro o platino, o pastas de plata/cloruro de plata* en las mismas formas descritas antes.

Diseño de los arreglos de electrodos

En el capítulo 2 se enunciaron las ventajas de que la dimensión característica del electrodo de trabajo sea menor o cercana al espesor de la capa de difusión de Nernst. Se reporta que ésta tiene dimensiones de entre 10^{-1} y 10^{-2} mm [27] (figura 14), lo que implica que la dimensión principal del electrodo de trabajo, por ejemplo el diámetro de un electrodo circular, debe estar cerca de 0.1 mm.

Como ya se mencionó, se prefirieron las geometrías planares. Esto presenta además las ventajas de que se puede colocar una gota del analito directamente sobre la zona de reacción y se facilita la forma de hacer contacto eléctrico, mediante conectores tipo dentado o usb.

Se decidió hacer diseños de forma compacta para asegurar que toda la superficie de los electrodos esté en contacto con el analito aun cuando se use un volumen mínimo (e.g. 3 y 10 μL como en las tiras reactivas). Un volumen pequeño permite reducir el tamaño de la capa de difusión y la limitación de la corriente.

Respecto a la separación entre los electrodos, se reporta que el electrodo de referencia debe estar lo más cerca posible del electrodo de trabajo, para disminuir la caída de IR, mientras que la distancia al contraelectrodo no es importante a menos que se manejen corrientes altas.[41] El contraelectrodo debe ser el de mayor área, para hacer más eficiente el transporte de la corriente de polarización.

Siendo así, para los arreglos de tres electrodos se escogió la forma de círculos concéntricos y para los de dos electrodos, de pequeños rectángulos adyacentes. En el primer diseño, el electrodo de trabajo circular se coloca en el centro, el electrodo de referencia y el contraelectrodo forman un anillo alrededor de este primero, ocupando un arco de $\frac{1}{4}$ y $\frac{3}{4}$ de vuelta respectivamente (figura 26a). En el segundo diseño, ambos rectángulos son del mismo tamaño, por lo que cualquiera puede fungir como WE o PRE (electrodo de pseudoreferencia).

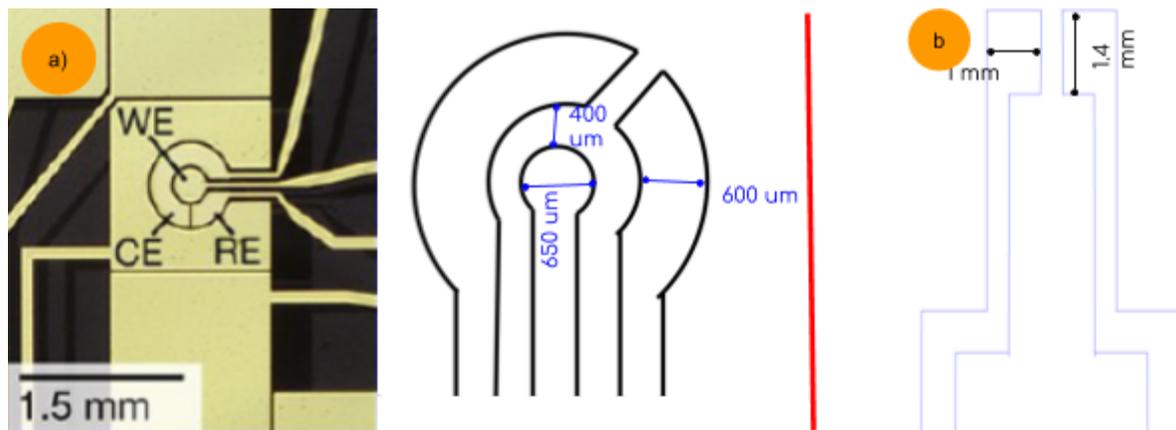


Figura 26 Diseños zona de reacción para: a) arreglos de tres electrodos [42]; b) arreglo de dos electrodos (zonas rectangulares de 1x1.4mm)

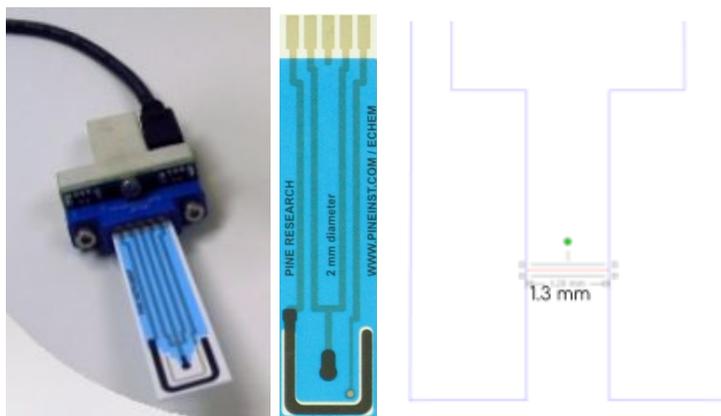


Figura 27. Diseño de pads. Izquierda: conector comercial del *Kit de Voltametría Cíclica*, marca PINE Research, que inspiró el diseño de los pads de los arreglos. Derecha: Pads para arreglo de dos electrodos.

El diseño de pads está inspirado en los conectores tipo USB, en los que el contacto eléctrico se realiza mediante el contacto físico de dos áreas planas metalizadas. Esto evita la dificultad de mantener o soldar un alambre sobre una superficie conductora, lo que contribuye a la reproducibilidad de los experimentos. Se encontraron kits comerciales en los que ya se incluían conectores de este tipo, por lo tanto, los pads se diseñaron al tamaño de estos conectores (figura 27).

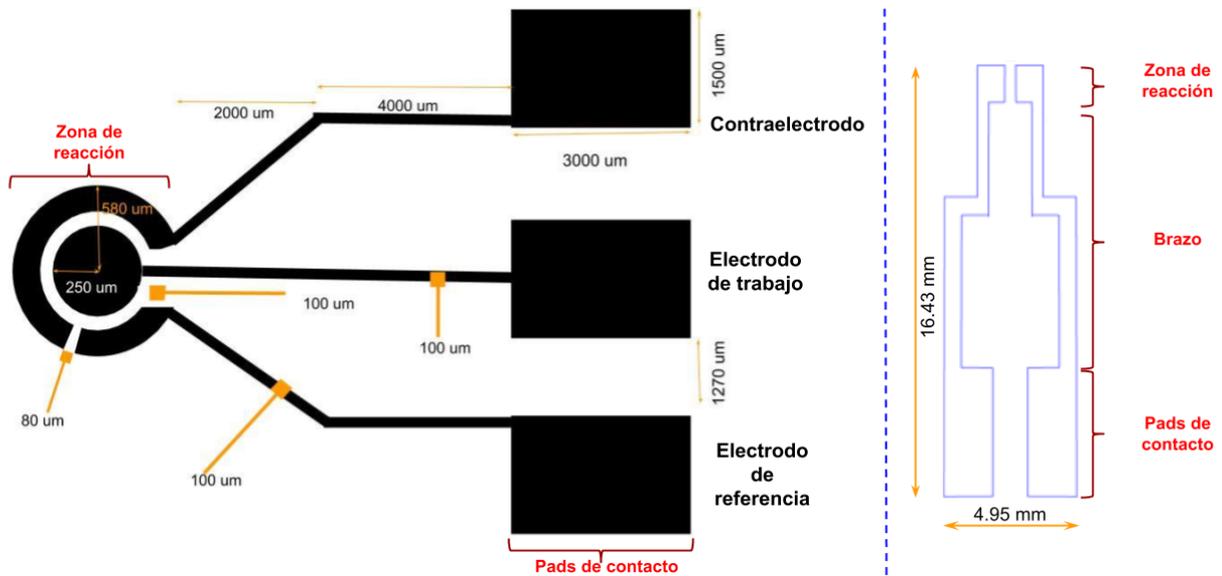


Figura 28. Diseños completos para arreglos de tres y dos electrodos.

3.2 Técnicas de microfabricación disponibles

Para la planeación de los protocolos a seguir, fue importante hacer un revisión de las técnicas de fabricación a las que se tenía acceso. En esta revisión se buscaron las técnicas que permitieran depositar películas delgadas o “gruesas” de los materiales mencionados antes sobre superficies planas; y por otra parte, técnicas que permitieran definir la forma de los electrodos.

Las técnicas de litografía óptica tradicionales (figura 21) generan patrones de muy alta resolución; dependiendo de la especialización del instrumento, se puede llegar a patrones con anchos de unos cuantos nanómetros [43]. Actualmente son las técnicas preferidas a escala industrial debido a la explosión que tuvieron para la construcción de circuitos integrados. Sin embargo, a escala de investigación los equipos y las instalaciones requeridas aún resultan costosos y poco accesibles. Es por esto que en este trabajo se prefiere buscar técnicas alternativas para definir patrones a partir de un diseño en formato gráfico, que permitan que los protocolos sean reproducibles no sólo por otro estudiante, sino en otros laboratorios.

3.2.1 Micromaquinado CNC

El sistema de micromaquinado CNC es un método de fabricación que utiliza cortadores rotativos, o “fresas”, para remover material de un sustrato rígido. Este método hace uso de software de control y programación para controlar el movimiento de los cortadores en tres dimensiones y lograr una resolución micrométrica. En la figura 29 se muestra el proceso general empleado por este método que consiste en: (a) preparar un diseño asistido por computadora (CAD, Computer-aided design); (b) utilizar una fresadora para transferir el diseño al sustrato mediante una herramienta de corte; y (c) transferir el diseño al sustrato mediante el desbaste de la superficie. En la figura 30 se muestra el equipo disponible en el laboratorio.

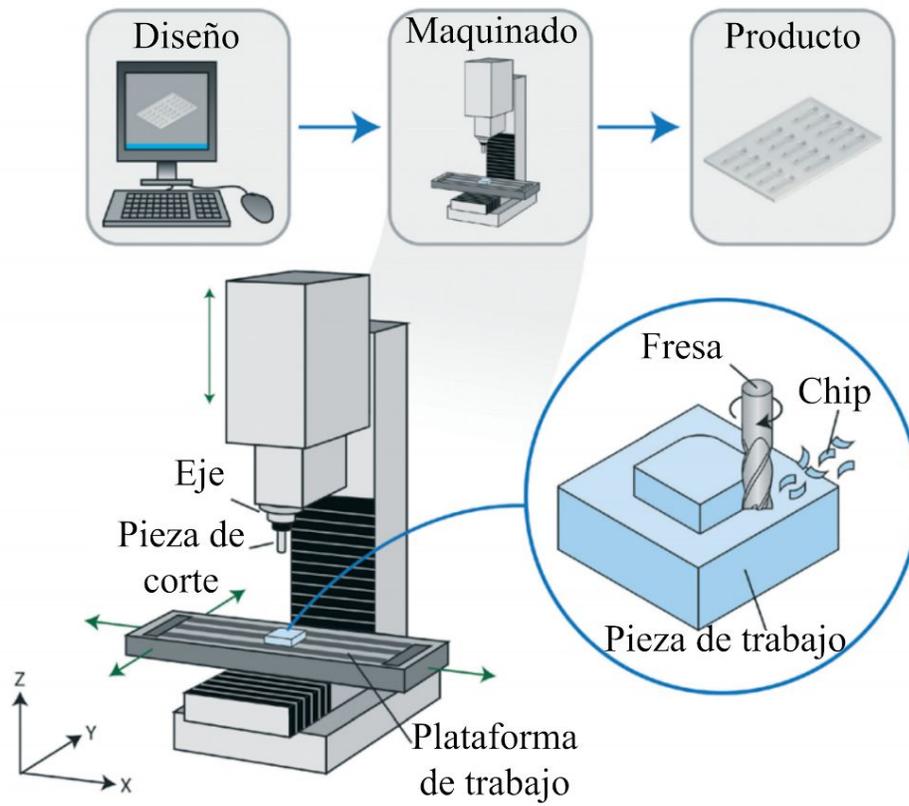


Figura 29 Proceso general de micromaquinado CNC. Tomado de [44]

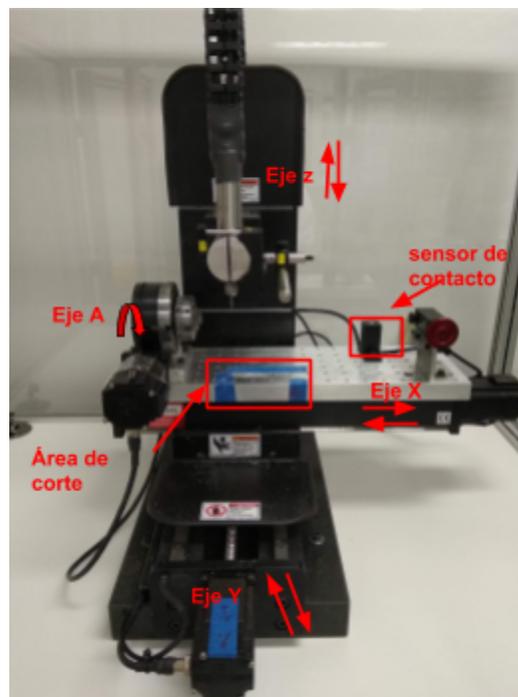


Figura 30 Equipo de micromaquinado CNC Minimill 4 de la marca Minitech Machinery Corporation.

3.2.2 Microfabricación láser

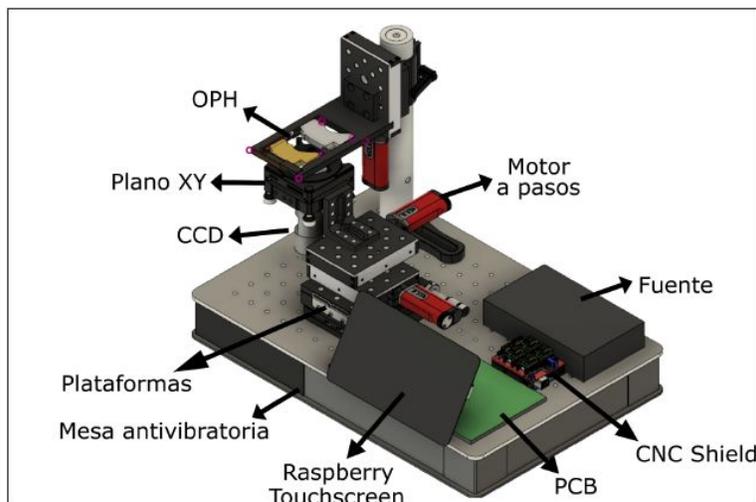


Figura 31. Prototipo final portátil del equipo de microfabricación. Tomado de [45][1]

Se cuenta con un equipo de microfabricación portátil para manufactura sustractiva y manufactura aditiva por la técnica de ablación láser y fotopolimerización por láser, respectivamente (figura 31). Este equipo fue armado en el laboratorio a partir del reuso de las unidades ópticas de un CD/DVD (“Super Multi DVD Rewriter LG”) y de un Reproductor Blu-Ray. Estas unidades contienen respectivamente un diodo láser infrarrojo con una longitud de onda $\lambda = 780 \text{ nm}$ y un diodo láser “azul” con una longitud de onda $\lambda = 405 \text{ nm}$. El proceso de manufactura sustractiva mediante ablación láser se logra con el láser infrarrojo incidiendo sobre una superficie con alta capacidad de absorción de calor, como lo son las nanopartículas de carbono, lo que genera una zona de incandescencia, donde la energía y el plasma provocan la expulsión del material debajo de la capa de carbono. El proceso de fotopolimerización se logra con el láser “blu-ray”, éste se hace incidir sobre una capa de una resina fotosensible, como el adhesivo Loctite 3525, provocando el entrecruzamiento de ésta y la adhesión al sustrato debajo. Los procesos generales se esquematizan en la figura 32.

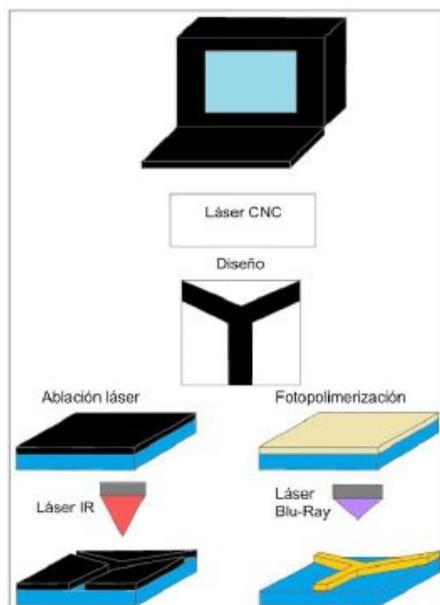


Figura 32. Esquema general de los procesos de microfabricación láser por ablación y fotopolimerización.

El Loctite 3525 es un adhesivo fotopolimerizable con propiedades que hacen ventajoso su uso para el proceso de fotolitografía láser directa:

- 1- Su viscosidad permite depositar capas muy delgadas mediante spin-coating, tal como se hace con las resinas fotosensibles, lo que permite que al polimerizar se logren estructuras de dimensiones mínimas de 30 μm [45]
- 2- El fotoiniciador es sensible a la longitud de onda del láser de Blu-Ray ($\lambda = 405 \text{ nm}$)
- 3- El Loctite no polimerizado se puede lavar con acetona, solvente menos agresivo a la salud y al ambiente que los reveladores usados en litografía óptica.

Con este método es posible crear máscaras sobre sustratos metalizados, de tal forma que tras un ataque químico o físico de la película metálica se puede retirar el metal excepto por la zona enmascarada, proceso favorecido además por la buena adhesión del Loctite 3525 a sustratos metálicos. [46]

3.2.3 Plotter de corte

El plotter de corte es un dispositivo similar a una impresora cuya función es cortar diseños en lugar de imprimir. Es la herramienta principal que se utiliza para estampar con vinilo. En estos equipos un cabezal con una fina cuchilla, se desplaza sobre la superficie mediante un motor a pasos en el eje X mientras que para el movimiento en el eje Y se desplaza la hoja o rollo que se esté cortando. Esta es una técnica sencilla de crear patrones y dada su aplicación comercial los equipos se adquieren a un bajo costo. La resolución máxima, determinada por la cuchilla es de 200 μm de ancho de línea. En la figura 33 se muestra el equipo empleado en este trabajo.



Figura 33. Equipo de plotter de corte CAMEO 3, de la marca Silhouette America.

3.2.4 Depósito de metales por sputtering

El proceso de pulverización (comúnmente referido como sputtering) consiste en la extracción de átomos de la superficie de un blanco debido al intercambio de momento con iones inertes de alta energía (generalmente argón) que bombardean los átomos de la superficie. Los átomos eyectados del blanco viajan hacia la superficie del sustrato confrontado a éste. La naturaleza física (figura 34) de este proceso permite su uso con prácticamente cualquier material existente: metales, dieléctricos, aleaciones y todo tipo de compuestos

(por ejemplo, PZT piezoeléctrico). Los iones inertes que bombardean el objetivo se producen en plasma DC o RF.

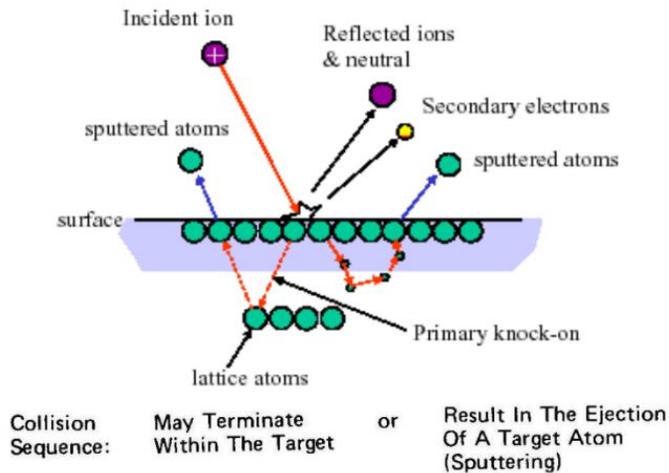


Figura 34. Proceso físico involucrado en la técnica de “Sputtering”. Tomado de [47]

3.2.5 Evaporación de metales por efecto Joule

Esta técnica consiste en llevar a cabo el calentamiento del material que se desea depositar hasta la fusión mediante el paso de corriente eléctrica a través de un filamento o placa metálica sobre el cual se coloca el material (efecto Joule). El material en forma de vapor se condensa entonces sobre el sustrato colocado encima de la zona de evaporación. También se usan otras formas de calentamiento la inducción mediante una bobina de RF rodeando un crisol de grafito o de BN, donde se funde el material que se quiere evaporar. El montaje de la técnica es simple, y resulta muy apropiada para depositar metales y algunos compuestos de bajo punto de fusión (Al, Ag, Au, SiO, etc.). Los metales típicos usados como resistencia de calentamiento son el tantalio (Ta), molibdeno (Mo), wolframio o tungsteno (W) los cuales presentan una presión de vapor prácticamente nula a la temperatura de evaporación ($T_{evap} = 1000-2000\text{ }^{\circ}\text{C}$). Cuando se utiliza un filamento en forma de hélice, es conveniente que el material evaporante moje el metal. El interior de la cámara se debe mantener a un alto vacío para garantizar que las moléculas del material de evaporación puedan llegar y adherirse al sustrato. En la figura 35 se muestra un esquema de las partes del equipo. [48]

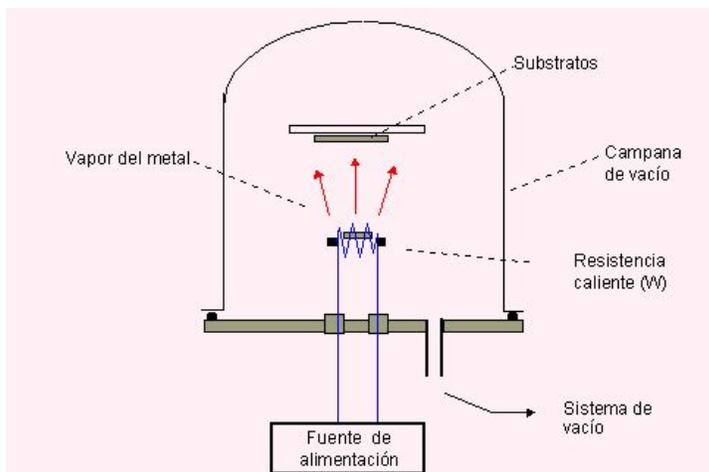


Figura 35 Esquema de un evaporador de metales por efecto Joule.

3.2.6 Doctor blading

La técnica de “Doctor Blade” (figura 36) consiste en depositar un material en forma de pasta o tinta en el hueco de un molde y remover el exceso de material mediante el uso de una navaja. En [49] se ha usado para fabricar electrodos de pastas de carbono y tintas conductoras de plata sobre sustratos de PMMA grabados mediante CNC o ablación láser.

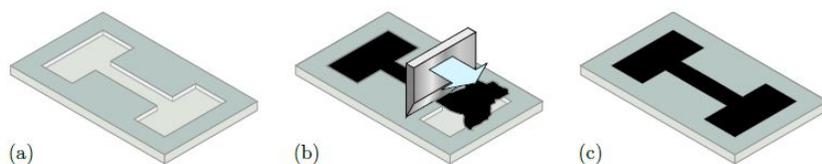


Figura 36. Procedimiento de depósito por Doctor Blading. a) Molde, b) retiro de exceso con navaja, c) electrodo. Tomado de [49].

3.3 Materiales seleccionados para los arreglos de electrodos

Tras la definición de los diseños y de las técnicas de fabricación disponibles, se seleccionaron los materiales a usarse para los arreglos de electrodos y las técnicas de depósito y estructuración de éstos:

- Electrodo de trabajo y contraelectrodo:
 - Oro, Oro/Paladio, Plata: Depósito mediante Sputtering y Evaporación Térmica
 - Plata: Depósito con la técnica “Doctor Blade” a partir de una tinta epóxica con partículas de plata.
 - Grafito: Depósito con la técnica “Doctor Blade” directo a partir de una tinta con partículas de grafito “ahulada”.
- Electrodo de referencia o pseudoreferencia:
 - Oro, Plata: siguiendo las mismas técnicas ya mencionadas
 - Plata/Cloruro de Plata: Depósito de plata como ya se mencionó, sedimentación de partículas de cloruro de plata mediante la inmersión de los arreglos en soluciones cloradas, como de cloruro férrico o hipoclorito de sodio.

Además, aunque se sabe que el cobre no es un buen material para la fabricación de electrodos debido a la facilidad con que se oxida ($E_{\text{oxCu}} = -0.34 \text{ V vs } -1.50 \text{ V}$ para oro) [50], se usó como material para algunas pruebas de concepto de los protocolos de fabricación, debido a su bajo costo.

- Cobre: Depósito mediante evaporación por efecto Joule o uso de placas PCB comerciales

En el capítulo de caracterización eléctrica se estudiará el comportamiento de la impedancia de estos materiales para darse una idea de su estabilidad de polarización ante diferentes frecuencias de escaneo y voltajes, y así, conocer su aplicabilidad en los diferentes métodos electroanalíticos.

3.4 Materiales seleccionados para los sustratos

Se determinó que los materiales de los sustratos debían cumplir con las siguientes características:

- Tener superficies planas y con baja rugosidad para que se puedan generar los arreglos planos deseados.

- Ser compatibles con los materiales seleccionados. Esto es, que los materiales seleccionados tengan buena adhesión al sustrato, y que éste no se vea afectado por los solventes de las tintas conductoras.
- Ser compatibles con las técnicas de fabricación disponibles. Por ejemplo, que resistan las temperaturas en la campana de evaporación, o los lavados con acetona para revelar el Loctite 3525.
- Ser de bajo costo y accesibles.
- Ser (de preferencia) transparentes para permitir la observación óptica de la muestra. Esto es importante para cuando se integren los electrodos en los dispositivos microfluídicos.
- Otra característica que se debe comprobar en un futuro es la biocompatibilidad.

Siguiendo los requisitos anteriores, se propuso usar los plásticos: Polimetilmetacrilato (PMMA), Tereftalato de Polietileno (PET) y Poliestireno (PS) de la marca Shrinky-Dink; y vidrio.

Se realizaron algunas pruebas preliminares de adhesión de los materiales conductores sobre los sustratos seleccionados. Para ello, se depositó cobre mediante evaporación térmica sobre las distintas superficies, utilizando máscaras de vinilo para definir patrones. Se observaron las muestras por la parte posterior a la cara de depósito, sin retirar las máscaras, con la finalidad de determinar cualitativamente en qué material es más notorio el efecto de delaminación de la película metálica del sustrato. Se asoció que a mayor el efecto de delaminación, menor es la adherencia del metal al sustrato. [51] Como se muestra en la figura 37 las películas de cobre mostraron mejor adherencia a los sustratos de PET y PS que a los de PMMA y a su vez que a los de vidrio.

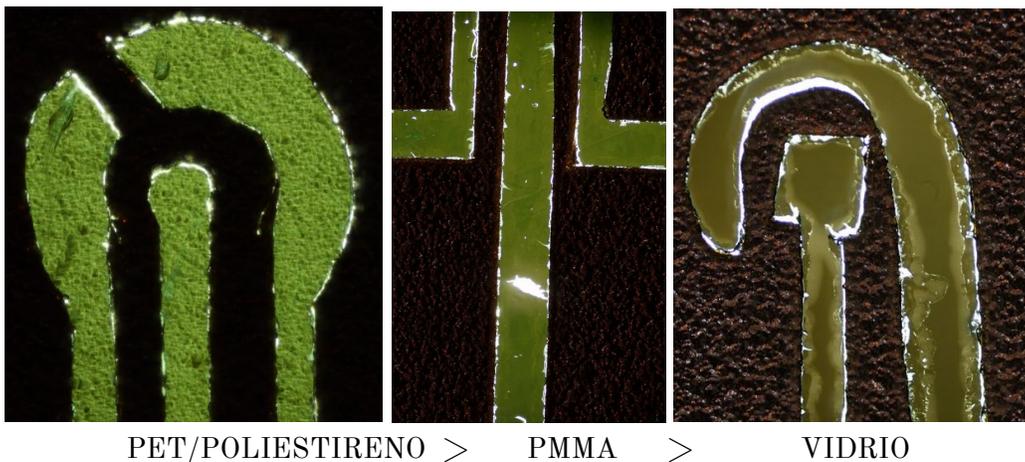


Figura 37. Pruebas de adherencia mediante observación de grado de delaminación. Microfotografías de los arreglos de cobre sobre diferentes sustratos, observación por cara posterior, sin retirar máscara de vinilo.

Está ampliamente reportado que los metales nobles, en particular el oro, tienen la incapacidad de formar enlaces estables metal-óxido por lo que su adhesión al vidrio es muy baja. Para promover la adhesión se usan capas intermediarias de otros metales que sí tienen esta capacidad, como titanio o cromo. También se usan monocapas intermediarias autoensambladas de sustancias como mercaptosilano, donde el grupo silano ($\text{Si}-(\text{OCH}_3)_3$) forma un enlace estable con la superficie del sustrato y el grupo tiol con la película de oro. [52]. Siendo así, se optó, en esta etapa del proyecto por usar los sustratos de **tereftalato de polietileno y de poliestireno** porque se pueden usar sin necesidad de hacer los recubrimientos antes mencionados. Además, por el espesor de estos sustratos fue más factible usar el conector mostrado en la figura 27 para realizar las pruebas de validación.

Capítulo 4. Protocolos de fabricación de electrodos

En este capítulo se describen los protocolos de fabricación de arreglos de microelectrodos que se plantearon y desarrollaron a lo largo de este proyecto, en los que se implementaron las técnicas de fabricación discutidas antes. Como ya se mencionó, la finalidad era obtener arreglos de dos o tres electrodos planares con dimensiones características milimétricas y submilimétricas. Se siguieron dos líneas de trabajo, análogas a los procesos de “grabado” y “lift-off” que se esquematizan en la figura 21.

El proceso de “grabado” es diferente al proceso de “lift-off” en que la película metálica se deposita sobre el sustrato antes de definir la forma del electrodo. En la litografía óptica la máscara que protege a la zona metálica con la estructura deseada se fabrica en resinas fotosensibles que son regionalmente expuestas a luz UV. En el protocolo de “grabado” de este trabajo se propuso polimerizar una máscara del adhesivo fotocurable Loctite 3525 mediante la incidencia directa del láser blu-ray del *equipo de microfabricación láser* (figura 32).

Por otra parte, bajo la línea de trabajo de los procesos análogos al “lift-off” se propusieron otros tres protocolos (*“Protocolos 2 a 4”*) en los que los pasos medulares son: i. Limpieza de los sustratos (preferentemente PET y PS, ver discusión en sección 3.4); ii. Definición de la forma del arreglo con una máscara adhesiva de vinilo; iii. Depósito del material conductor; iv. Desprendimiento de la máscara adhesiva.

La diferencia en estos tres protocolos reside en el material y la estructura superficial de los electrodos. En el “Protocolo 2” se depositan películas metálicas (oro, oro/paladio, cobre) de aproximadamente 50 nm, mediante sputtering o evaporación térmica. El “Protocolo 3” consiste en el depósito de tintas de plata y grafito mediante la técnica de “Doctor Blade”. En el último de estos tres protocolos (“Protocolo 4”) se deposita el material conductor también mediante sputtering y evaporación, pero se agregan pasos posteriores como son el encogimiento térmico del sustrato, con la finalidad de estructurar la superficie de los electrodos, y la transferencia de los electrodos estructurados a sustratos flexibles de polidimetilsiloxano. Para evitar confusiones de nomenclatura, en el título de los protocolos se hará una breve referencia al proceso: “Protocolo 1. Electrodos por grabado de cobre”, “Protocolo 2. Electrodos por sputtering o evaporación”, “Protocolo 3. Electrodos por Doctor Blading” y “Protocolo 4. Electrodos de superficie estructurada”.

Se implementaron estos cuatro protocolos para comprobar si permitían la fabricación de arreglos de dos y tres electrodos con los diseños y las dimensiones deseadas (capítulo 3). Esto se logró en un principio sólo con los protocolos 2 y 3. Estos primeros arreglos se sometieron a las pruebas de funcionalidad, que consistieron en implementar rutinas de cronoamperometría con soluciones de peróxido de hidrógeno de concentración conocida (capítulo 6). De estas pruebas de funcionalidad se destacaron los arreglos plata-grafito fabricados con el protocolo 3, por su sensibilidad y comportamiento congruente con lo esperado (ver sección *Voltamogramas*). Entonces, se decidió estandarizar tal proceso, entendiendo estandarizar como definir cada uno de los pasos del protocolo, por ejemplo, la cantidad a utilizar de cada reactivo, los instrumentos y el modo con que se depositan, etc. Los arreglos resultantes de este protocolo estandarizado se caracterizaron geométrica y eléctricamente, lo que se muestra en la sección 4.3.2 y en el capítulo 5, respectivamente.

En este capítulo se describen los cuatro protocolos y se muestran algunos de los arreglos resultantes, fuesen funcionales o no. Se consideró necesario mostrar todas las técnicas por el potencial que presentan en cuanto a las capacidades de fabricación de microestructuras en general, y porque se espera que en un trabajo futuro se puedan implementar los materiales y parámetros necesarios para que tengan un funcionamiento adecuado, y de esta forma se pueda proceder a su estandarización.

4.1 Protocolo 1. Grabado de cobre mediante la protección con máscaras fotopolimerizadas por Blu-Ray

Ya se mencionó que en los procesos “de grabado”, el depósito de la película metálica se realiza antes de definir la forma del electrodo. En esta etapa del proyecto sólo se lograron las pruebas de concepto de este protocolo, para las cuales se decidió usar placas de baquelita con recubrimientos de cobre (PCB) debido a su bajo costo. Se esperaba incluir el depósito de los metales de interés (oro, plata, etc.) pero se tuvo que trabajar primero en la afinación de los parámetros para lograr definir la forma de la máscara y las estructuras de cobre con las dimensiones submilimétricas deseadas (figura 39). A continuación se enlistan los procedimientos que conforman este protocolo y se muestran algunos arreglos resultantes.

4.1.1 Descripción del protocolo 1.

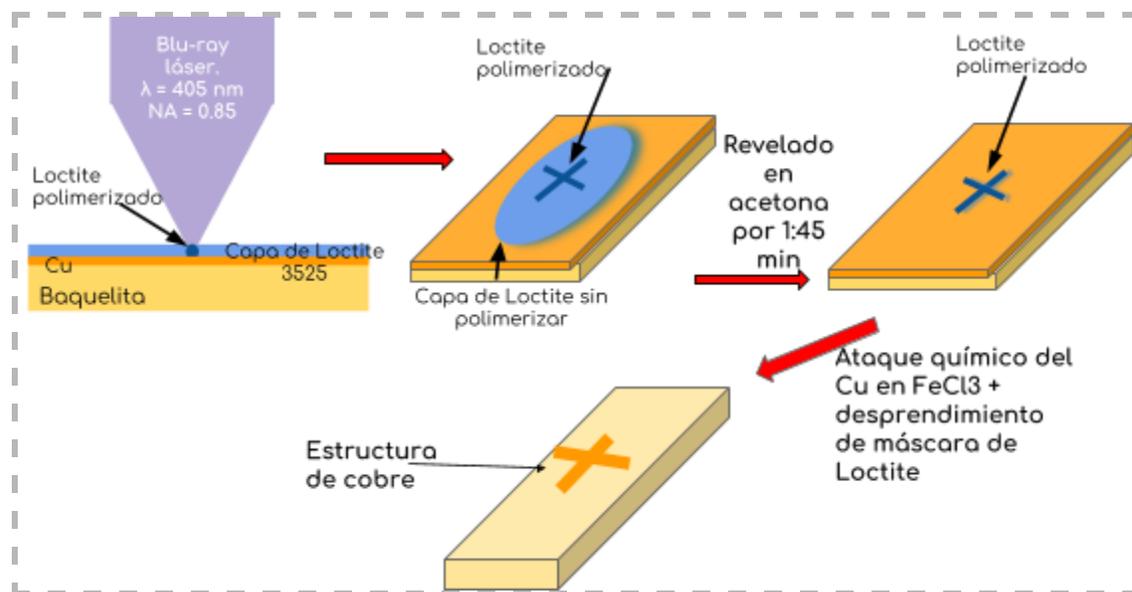


Figura 38. Esquema del protocolo 1 de fabricación de electrodos.

En este método se emplea como técnica de fabricación principal la fotopolimerización de máscaras sacrificiales de Loctite 3525 usando el equipo de microfabricación por láser blu-ray (ver sección 4.2.2). El protocolo de fabricación se describe a continuación.

MATERIALES Y EQUIPOS

- Placa de baquelita con recubrimiento de cobre
- Adhesivo fotocurable Loctite 3525
- Acetona pura
- Isopropanol
- Agua destilada
- Solución de cloruro férrico en agua en proporción 1:2
- Spincoater
- Equipo de microfabricación láser con cabezal de Blu-Ray

- Parrilla

PROCEDIMIENTO 1. DIBUJO DEL DISEÑO Y TRANSFORMACIÓN A LAS LÍNEAS GUÍA.

Se realiza el diseño del electrodo a fabricar en el software Inkscape, dibujando el contorno con las dimensiones exactas. El interior del diseño debe rellenarse con líneas paralelas con una separación de 30 μm (figura 39), para que los trazos que el láser polimeriza se superpongan unos con otros y no queden discontinuidades en el relleno de la máscara.

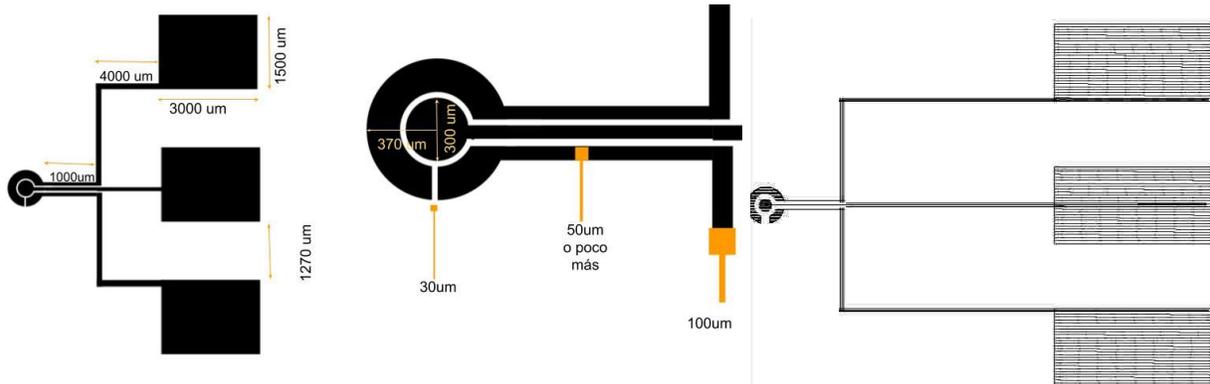


Figura 39. Izquierda: Uno de los diseños planeados para el protocolo 1, indicando las dimensiones deseadas, está inspirado en el arreglo mostrado en la figura 26a) [42], manteniendo la correspondencia de los electrodos.

Una vez que se tiene el dibujo completo, con el mismo software (Inkscape) se genera el archivo g-code, el cual contiene las rutas de trayecto que realizará la maquina de microfabricación blu-Ray y la velocidad de desplazamiento a lo largo del trayecto. Para estos electrodos la velocidad empleada cuando el diodo láser está encendido fue de 2 mm/min y cuando está apagado fue de 10 mm/min. Para corroborar las dimensiones finales del diseño y estimar el tiempo de fabricación del electrodo, es de gran utilidad verificar el código generado, utilizando el simulador web “G-CODE simulator”.

PROCEDIMIENTO 2. LIMPIEZA DE LAS PLACAS FENÓLICAS

Se utiliza para obtener una superficie de cobre libre de grasa e impurezas, para mejorar la adhesión del Loctite 3525 al cobre. Para llevar a cabo el proceso descrito, se debe trabajar con guantes para no engrasar la superficie de cobre.

- Con una goma de migajón, se exfolia la superficie de cobre.
- Se retiran los restos de migajón con una kimwipe empapada con IPA.
- Se lava la superficie con una fibra empapada con jabón extran, enjuagar con agua desionizada.
- Se vierte un poco de acetona y finalmente un poco de isopropanol y resguardar del polvo.

PROCEDIMIENTO 3. DEPÓSITO DE LOCTITE 3525

Se utiliza para depositar una capa delgada y uniforme de Loctite 3525 necesaria para que el láser Blu-Ray mantenga el enfoque en la interfase sustrato-adhesivo. El depósito se lleva a cabo mediante spin coating en el equipo Laurell WS-650-23 de la marca Laurell Technologies.

- La placa fenólica se adhiere con cinta doble cara a un portaobjetos de vidrio.
- El portaobjetos de vidrio se monta en la base correspondiente del equipo de spincoating.

- Se hace girar el portaobjetos a 2000 rpm mientras se vierte acetona para eliminar remanentes de grasa. Manteniendo el giro, se vierte alcohol isopropílico.
- Se agrega una gota de Loctite 3525 sobre la placa fenólica estática.
- Se hace girar el sustrato por 60 segundos a 6000 rpm, llevándolo a tal velocidad con una rampa de aceleración de 1000 rpm/s. Esto genera una capa de espesor $\approx 13.78 \mu\text{m}$.
- Terminada la rutina se guarda el sustrato en una caja negra para evitar la polimerización del Loctite 3525 por la luz ambiental.



Figura 40. Izquierda: Envase del adhesivo fotopolimerizable Loctite 3525. Derecha: Spin Coater Laurell WS-650-23.

PROCEDIMIENTO 4. POLIMERIZACIÓN DE LA MÁSCARA

- Cuando se tiene el sustrato con el depósito de loctite 3525 se coloca en la base móvil de la máquina de microfabricación láser.
- Se procede a enfocar el spot del láser Blu-Ray en la interfase sustrato-loctite.
- Cuando el spot se encuentra enfocado y en la posición XY de inicio deseada, se establece la corriente de alimentación, de 13.2 mA, lo que corresponde a una potencia óptica de $1.374 \mu\text{W}$.

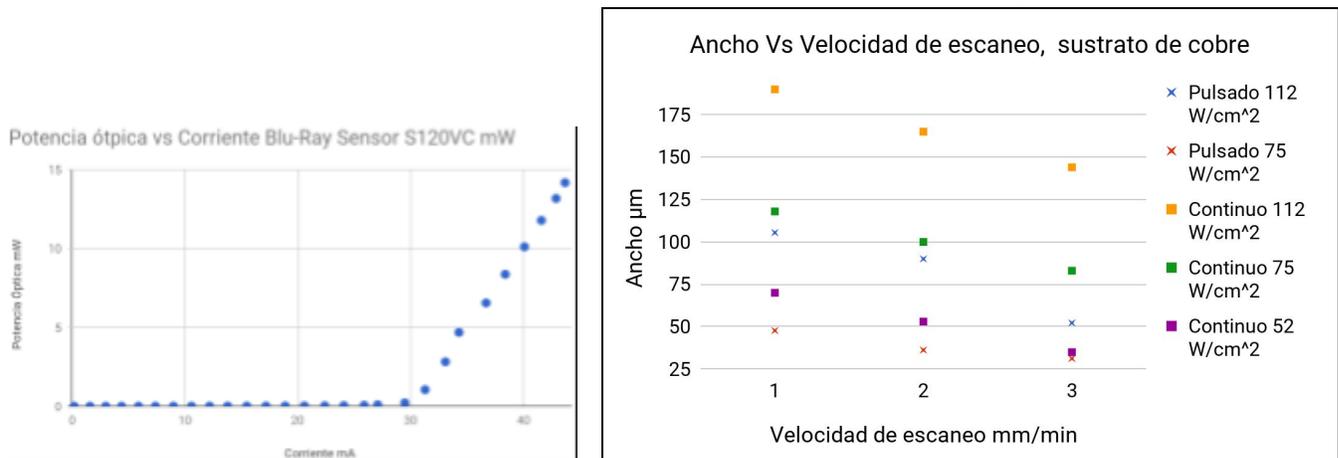


Figura 41. Gráficas de Potencias ópticas vs Corriente de diodo Blu-Ray. Derecha: Gráfica que muestra el ancho de líneas polimerizadas Vs velocidad de escaneo a diferentes densidades de potencia con láser pulsado y con el continuo, sobre cobre.

Tomadas de [45]

De acuerdo con cálculos realizados previamente, estas condiciones de velocidad y potencia óptica corresponden a una densidad de potencia óptica de aproximadamente 52 W/cm^2 , dato útil para su posible reproducibilidad en otro equipo. Como se puede observar en la gráfica de la figura 41, esto genera un ancho

de línea de entre 50 y 75 μm . Ya que se han configurado todos los parámetros necesarios, se carga el archivo G-code en la plataforma Universal Gcode Sender y se inicia la irradiación del adhesivo.

PROCEDIMIENTO 5. REVELADO DE LA MÁSCARA DE LOCTITE 3525.

Se utiliza para eliminar el adhesivo no polimerizado y revelar la estructura de la máscara.

- Concluida la polimerización de la máscara, se debe sumergir el sustrato en una caja de Petri con acetona durante 1.45 min, haciendo movimientos oscilatorios. Se retira el sustrato de la acetona, se escurre y se resguarda del polvo.

Cuando se “polimeriza” el Loctite 3525, lo que está ocurriendo es un entrecruzamiento entre las cadenas poliméricas del adhesivo, para formar una red compleja, que da origen a una especie de polímero termofijo. Estas redes no se pueden romper con la acción de un solvente, lo que hace tan resistente a este tipo de materiales.

PROCEDIMIENTO 6. ATAQUE QUÍMICO PARA REMOVER COBRE Y DESPRENDIMIENTO DE LA MÁSCARA

Se utiliza para “disolver” el cobre no protegido y liberar la superficie del arreglo de electrodos. Para el proceso descrito a continuación se debe trabajar con guantes, cubrebocas, bata y se deben alejar los instrumentos metálicos puesto que el cloruro férrico es una sustancia corrosiva.

- En un tubo falcon se diluye el FeCl_3 comercial en H_2O desionizada en proporción 2:1 en volumen.
- Se vierte un poco de esta solución en una nave para pesar pequeña. Se coloca en la parrilla a 30°C .
- Transcurridos aproximadamente 5 minutos para que la solución llegue a 30°C , se introduce la placa de cobre.
- Se mueve la nave de forma oscilatoria manteniéndola en contacto con la parrilla. Se debe inspeccionar el estado de la placa cada cierto tiempo, por ejemplo, cada 2 minutos.

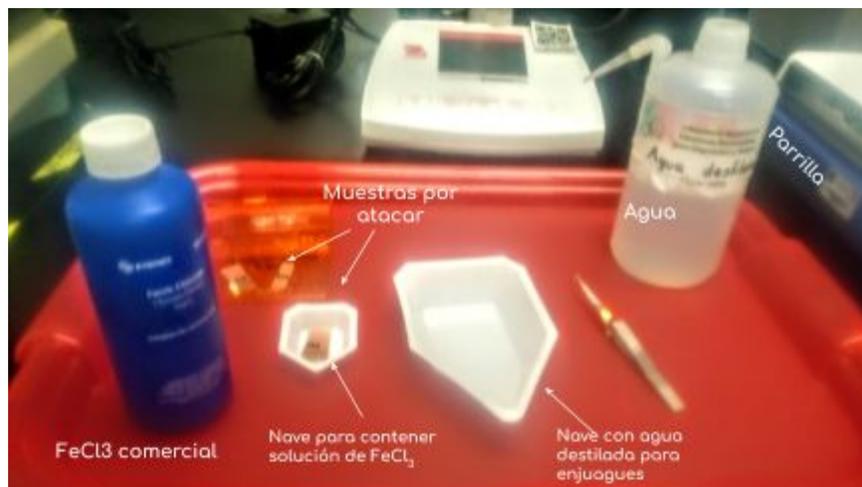
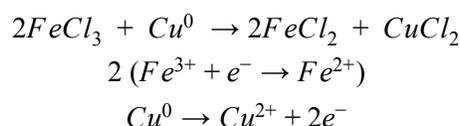


Figura 42. Materiales para realizar ataque químico de cobre.

- Para las dimensiones usadas, el tiempo de ataque químico está entre los 8 y 10 minutos.
- Se retira la placa de la solución con ayuda de algún instrumento de plástico o madera, se seca el exceso de solución en una toalla de papel.

- Se lleva el arreglo a observación en el microscopio, si queda un poco de cobre en los espacios entre las pistas de la máscara, se debe volver a sumergir unos segundos en la solución de $FeCl_3$.
- Terminado el ataque químico, se sumerge la placa en un poco de agua destilada para retirar el exceso de $FeCl_3$, colectando esto en otra nave de plástico grande la cual deberá ser neutralizada con unas gotas de una solución de hidróxido de sodio $NaOH$.
- Se seca la placa en una kimwipe, de ser necesario se inyecta aire limpio con una pistola a presión.
- Para retirar la máscara de Loctite se debe empapar un hisopo en acetona y se debe pasar suavemente por el arreglo para no rayar el cobre.

El proceso de ataque químico del cobre es una reacción de óxido-reducción. El cloruro férrico reacciona con el cobre dando cloruro ferroso y cloruro cúprico como lo muestra la siguiente ecuación:



ARREGLOS FABRICADOS CON EL PROTOCOLO 1

En la figura 43 se muestra un ejemplo de las máscaras que se pueden lograr con el equipo de microfabricación láser. Se midieron diferencias entre las dimensiones esperadas y logradas de aproximadamente 15%. Las diferencias entre las dimensiones esperadas y las logradas pueden deberse a que se hayan indicado dimensiones ligeramente diferentes en el diseño de las trayectorias, a que no se mantiene el tamaño del spot del foco a lo largo del grabado, o al efecto de los fotones generados por debajo de la corriente umbral del diodo. [45]

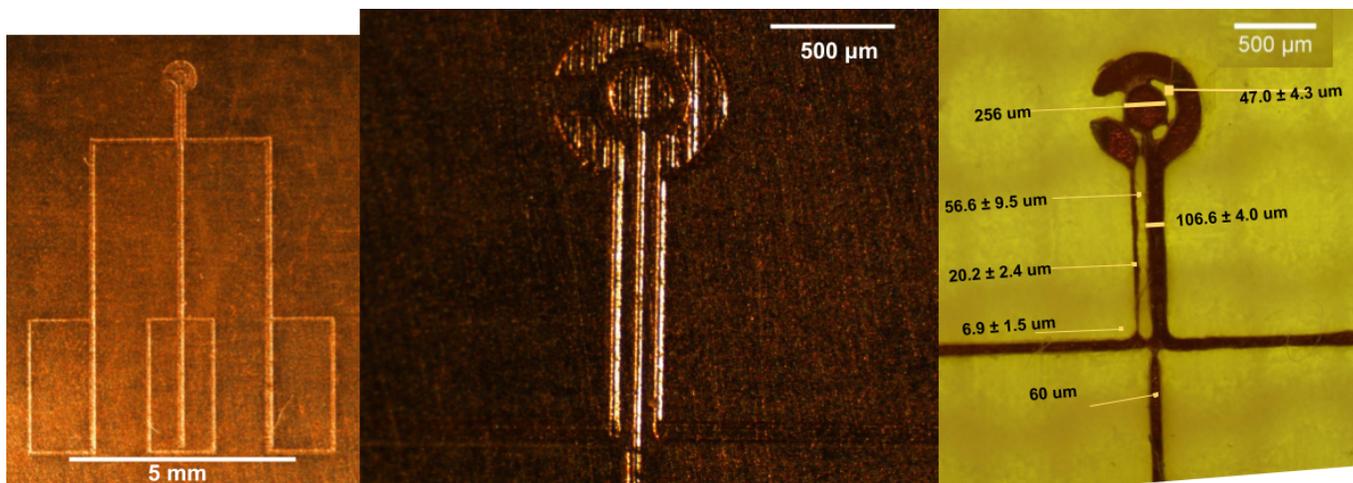


Figura 43. Máscaras de Loctite 3525 para arreglos de tres electrodos.

En la figura 44 se muestra un arreglo de cobre después del ataque químico y el desprendimiento de la máscara. Este es uno de los arreglos en los que se alcanzó la mayor resolución de línea, sin embargo, como ocurrió en varias pruebas, no se lograron separar los tres electrodos en la zona de reacción, pero al mismo tiempo, algunas pistas se adelgazaron tanto que perdieron continuidad. Se atribuye esta falla a que por la forma de arco del contraelectrodo, la solución de cloruro férrico no logra penetrar debido a un efecto de tensión superficial. Siendo así, se optó por aumentar las dimensiones de la zona de reacción y el ancho de las pistas.

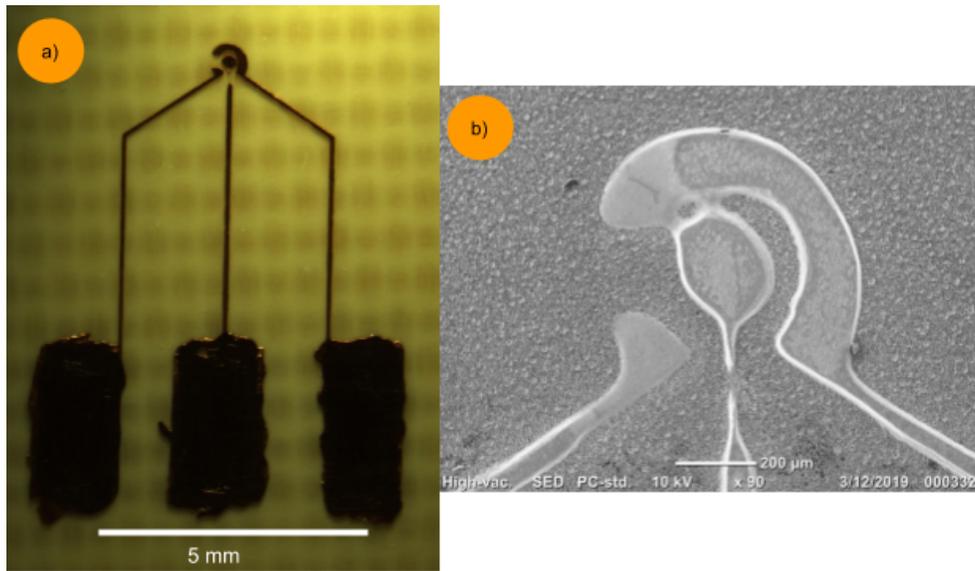


Figura 44. Arreglo de tres electrodos para voltametría cíclica, producto del protocolo 1. a) Arreglo completo mostrando pads de contacto (Microscopio Espectroscópico), b) acercamiento a la zona de reacción (Microscopía electrónica de barrido)

En la figura 45 se muestra un arreglo con un tamaño más grande, se marcan las dimensiones logradas. Se observa que en este caso se logró definir y separar los tres electrodos, a excepción de una pequeña zona en el cuadrante I en la que durante el ataque químico se levantó la máscara.

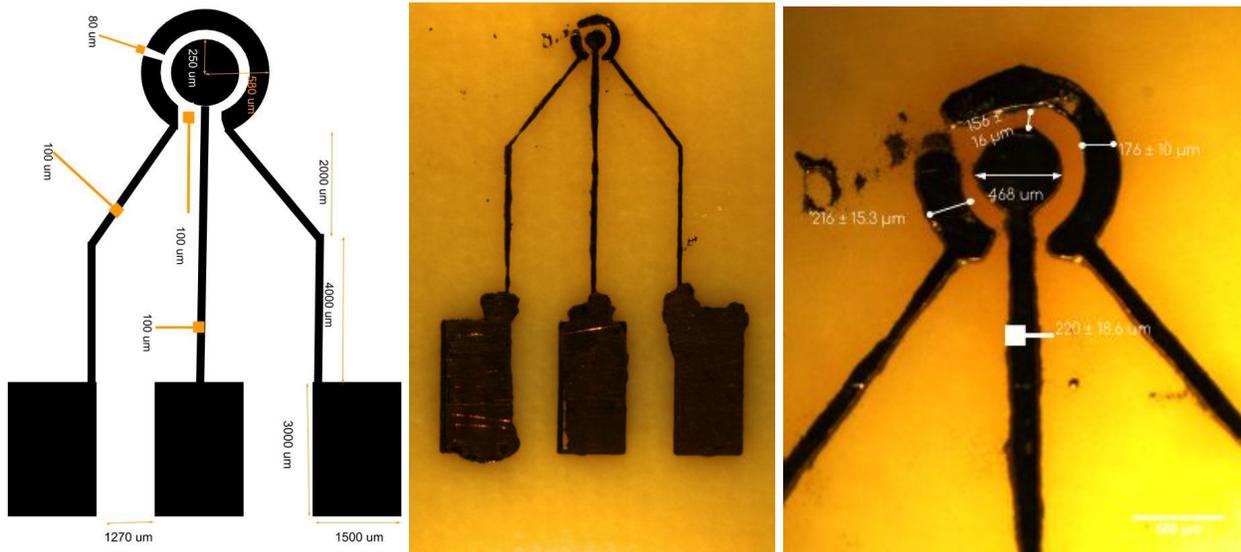


Figura 45. Arreglo resultante del protocolo 1.

Ya que se ha comprobado que sí se logran las dimensiones y los patrones deseados según lo descrito en la sección 3.1, se espera estandarizar el protocolo para usarlo en la fabricación de arreglos de oro, utilizando el mismo proceso pero haciendo el ataque químico con una solución “Gold Etchant” que contiene de 1 a 10% en masa de yodo (I_2) y de 20-40% de yoduro de potasio (KI). [53]

4.2 Protocolo 2. Electrodo mediante el depósito de metales por sputtering o evaporación

Como ya se mencionó este método pretende ser una versión accesible de los métodos de fabricación tipo “lift-off”. Para esto, en vez de definir las máscaras mediante métodos de fotolitografía, se usó el corte de máscaras de vinilo con una “cortadora para manualidades”. Se encontró que este proceso permitía hacer máscaras con un ancho de línea mínimo de 200 μm , por lo que las dimensiones del diseño en la figura 45 se tuvieron que aumentar. En este protocolo también se usó cobre para las pruebas de concepto, en particular con la evaporación térmica.

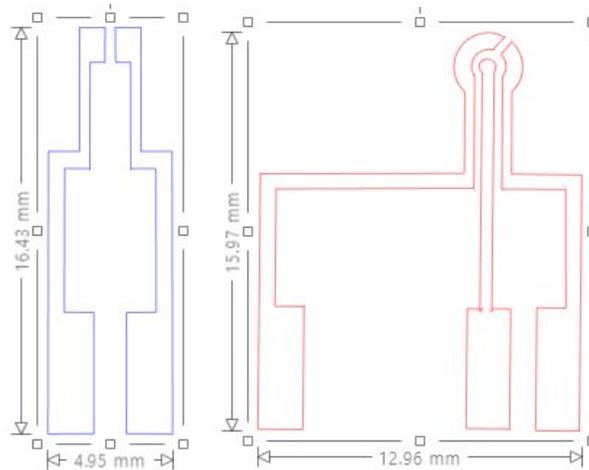


Figura 46. Diseños de las máscaras usadas para hacer patrones por los protocolos 2 y 3.

4.2.1 Descripción del protocolo 2

PROCEDIMIENTO 1. LIMPIEZA DE SUSTRATOS. Consiste en frotar suavemente su superficie con una kimwipe empapada con IPA o etanol.

PROCEDIMIENTO 2. CORTE, DESPRENDIMIENTO DE LAS ZONAS INTERNAS DEL STENCIL Y ADHESIÓN DE MÁSCARAS AL SUSTRATO. Las máscaras de vinilo son cortadas en el equipo Silhouette Cutter Plotter Cameo 3 (figura 33) en arreglos de dos y tres electrodos (figura 46).

PROCEDIMIENTO 3. DEPÓSITO DE METALES: SPUTTERING O EVAPORACIÓN POR EFECTO JOULE DE COBRE.

a. Sputtering:

- i. Se introducen las muestras dentro de la campana de vacío, buscando que queden centradas debajo de blanco y a una distancia tal que el depósito uniforme en toda la superficie.
- ii. Se arranca el equipo de sputtering según el Manual de Operaciones. Se ajusta la corriente, a 18 mA, mediante el control del flujo de argón hacia el interior de la campana. Se selecciona el tiempo del proceso. Se inicia el proceso, se debe observar el brillo púrpura característico del plasma de argón. En esta fase del proyecto sólo se alcanzaron a usar los blancos de oro y oro-paladio.



Figura 47. Esquema del protocolo 2 de fabricación de electrodos.

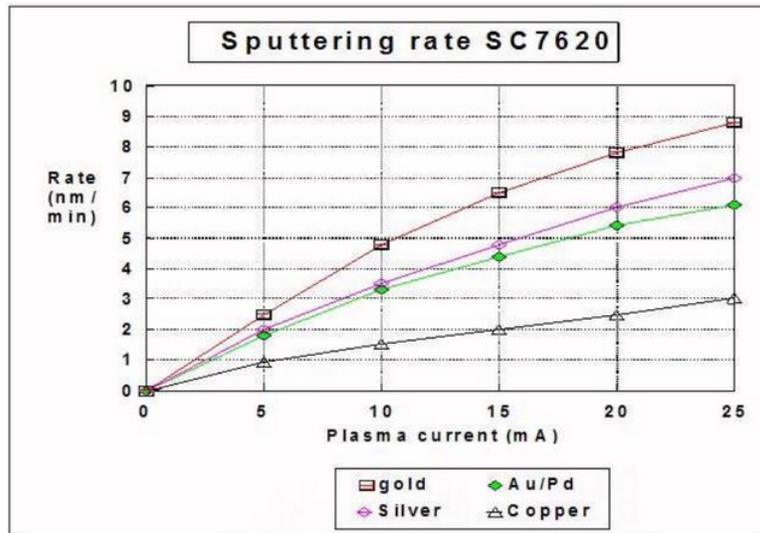


Figura 48. Velocidad de depósito contra corriente del plasma para Mini Sputter SC7620

- b. Depósito de metales por efecto Joule: Se realizó en el Taller de Vacío de la Facultad de Ciencias. Previamente el encargado del equipo coloca el fragmento de cobre dentro de una canastilla hecha de un filamento de tungsteno o de magnesio.
 - i. Se montan los sustratos limpios (con las máscaras de vinilo adheridas) en un soporte con una plataforma elevada. Se introduce el soporte dentro de la campana de vacío.
 - ii. Se coloca la campana de vidrio en su posición y se enciende la bomba para hacer vacío. En todos los casos se esperó hasta que el vacío llegara a magnitudes de 10^{-6} Torr.
 - iii. Alcanzado el límite de 10^{-6} Torr, se enciende la fuente para aplicar una diferencia de potencial entre los electrodos. Se manejaron valores de voltaje entre 1.8 V y 2.59 V, y de corriente entre 35 A y 41.8 A.
 - iv. Terminado el proceso de recubrimiento, se apaga la fuente y la bomba. Se debe levantar la campana sólo una vez que alcanzó una temperatura manipulable. Se extrae el soporte del interior de la campana. Con cuidado se retiran las muestras.

PROCEDIMIENTO 4. DESPRENDIMIENTO DE LA MÁSCARA. Se debe desprender lentamente para que no queden residuos de adhesivo en la superficie.

ARREGLOS FABRICADOS CON EL PROTOCOLO 2.

En la figura 49 se muestran arreglos característicos resultantes del protocolo 2. Los primeros dos se fabricaron con el equipo “Mini Sputter SC7620” de la marca Quorum Technologies, y con el equipo de evaporación térmica del Taller de Vacío respectivamente. El tercer arreglo se fabricó con el mismo procedimiento, pero en un equipo de sputtering de mayor capacidad y con un indicador de cuarzo para medir indirectamente el espesor de la película formada. El ancho de línea mínimo logrado fue de aproximadamente $165 \mu\text{m}$, determinado por la cortadora de vinilo.

El espesor de la película de oro en el tercer arreglo es de 30 nm. Se puede hacer una estimación del espesor de la película fabricada con el equipo “Mini Sputter” usando la gráfica en la figura 48. Ésta se fabricó

usando una corriente de 20 mA y el tiempo de proceso fue de 3 minutos. Esto implica que, la velocidad de depósito es de aproximadamente 5 nm/min, y por tanto, la película tiene aproximadamente 15 nm de espesor, lo que explicaría que se ve más translúcido que el depósito de oro. No hay forma de estimar el espesor de la película de cobre ya que no se tiene un gráfico similar ni un sensor de espesor. La alta irregularidad de los bordes y el bajo espesor de las películas se observó en la mayoría de los arreglos fabricados con este protocolo. A pesar de ello, los electrodos fabricados mantuvieron la continuidad desde la zona de reacción hasta los pads, por lo que sí fue posible usarlos para probar su funcionalidad como celdas electroquímicas. Por otro lado, se comprobó que los sustratos plásticos usados (PET y PS) sí son compatibles con ambas técnicas de depósito, a pesar de que se temía que la incandescencia en el proceso de evaporación indujera el encogimiento del poliestireno. En el capítulo 5 se discute el comportamiento de la impedancia eléctrica que mostraron los electrodos de oro-paladio, que es diferente al esperado para los buenos conductores.

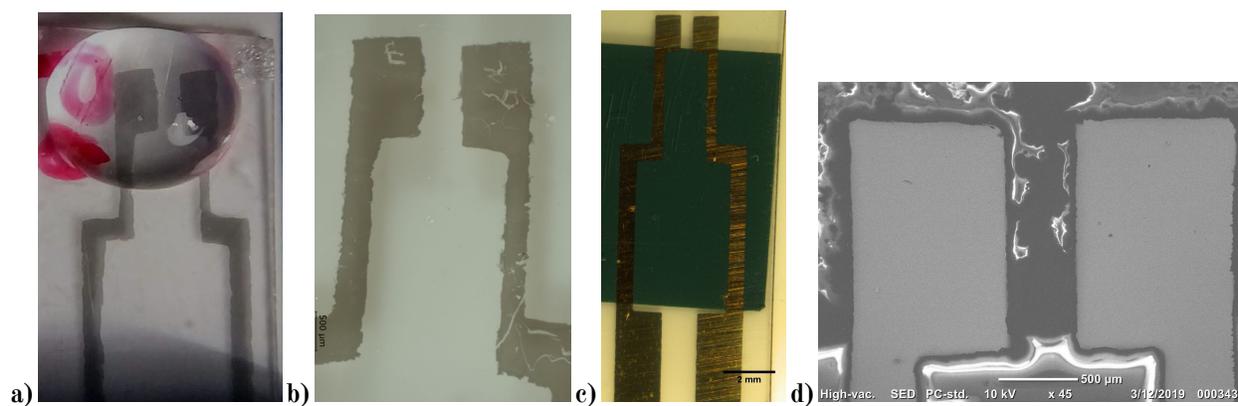


Figura 49. Acercamiento a los arreglos de dos electrodos resultantes del protocolo 2. a) Arreglo de **oro-paladio** sobre **PET**, depositado por sputtering. b) Arreglo de **cobre** sobre **vidrio**, depositado por evaporación térmica. c) Arreglo de **oro** sobre **PS** fabricado con equipo de sputtering con indicador de espesor (en estancia de investigación), barra 2 mm. d) Acercamiento a estructura en c), barra 500 μm .

Antes de proceder a la estandarización del protocolo se debe resolver el problema de la adhesión de las capas metálicas a los sustratos para que no ocurra el efecto de delaminación en los bordes. Se debe probar con otros tiempos y corrientes de depósito para lograr películas de mayor espesor, además, se debe probar con promotores de adhesión entre los sustratos orgánicos y a base de silicio y los metales, como son los compuestos que contienen grupos silano y grupos tiol. Una vez determinados los parámetros que generen espesores de mínimo 30 nm en superficies de PET y PS, se deben hacer pruebas de reproducibilidad, para así definir los procedimientos estandarizados. Más adelante se describe un protocolo en el que las películas metálicas se estructuran mediante el encogimiento del sustrato de poliestireno en que están depositadas, lo que confiere a los electrodos mayor robustez y mayor sensibilidad por área geométrica. [54]

En cuanto al proceso de evaporación, es difícil aplicarlo para el depósito de otro metal que no sea cobre porque se necesitan bloques de oro o de plata de alta pureza, los cuales pueden ser costosos.

4.3 Protocolo 3. Electrodo de tintas conductivas fabricados mediante doctor blading

Este método está inspirado en la técnica de screen printing, método común de fabricación de electrodos comerciales, como los de glucosa, y en la técnica de relleno de micrograbados antes implementada en el laboratorio. Se usaron tintas conductivas comerciales y accesibles, cuyo uso está destinado a la unión de componentes electrónicos. La de grafito es una tinta con un aglutinante “ahulado” de la marca mexicana *Microsolder*. La de plata es una tinta con un aglutinante epóxico de la marca *Chemtronics*. Las ventajas más interesantes de estas tintas son su facilidad de uso, y que el solvente se evapora en pocos minutos a temperatura ambiente [55], a diferencia de muchas tintas o pastas usadas para “screen-printing”, a las que se debe someter a altas temperaturas para que ocurra el sinterizado de las partículas. Sumado a esto, se comprobó que tienen buena adherencia a los sustratos plásticos propuestos. Los procedimientos descritos a continuación conforman un protocolo estandarizado en vías de validación.

4.3.1 Descripción del protocolo 3

Los pasos descritos a continuación se resumen en la figura 50.

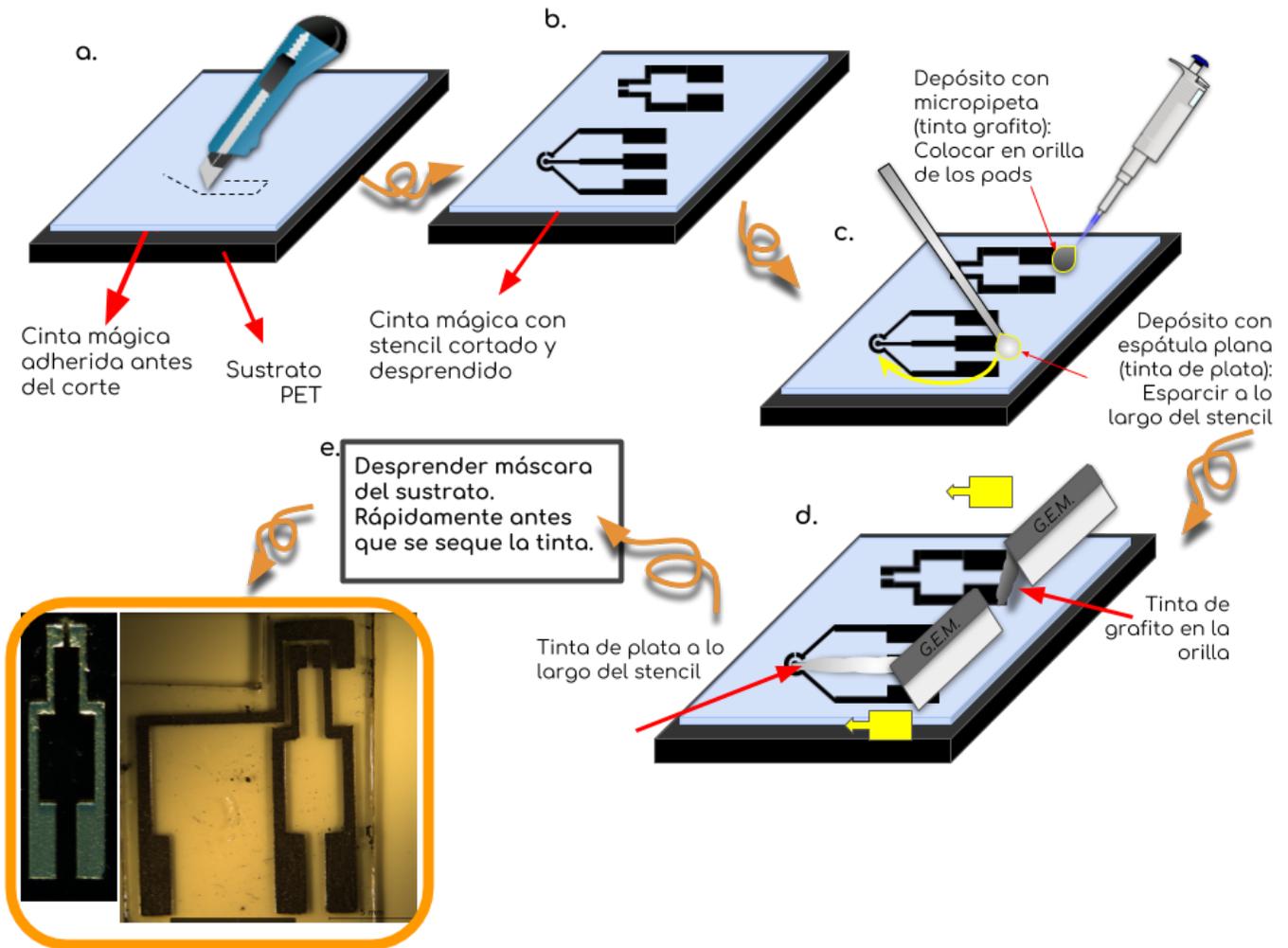


Figura 50 . Esquema del proceso general seguido en el método 3.



Figura 51. Materiales y herramientas usados en las pruebas de fabricación de arreglos de grafito y plata (Parte 1). Los instrumentos de borde plano probados fueron: 1)navaja de acero inoxidable teflonada, 2)mini-rodillo de acero inoxidable, 3) barra de goma, 4) acrílico.

PROCEDIMIENTO 1. LIMPIEZA DE SUSTRATOS DE PET O PS. Consiste en frotar suavemente su superficie con una kimwipe empapada con IPA o etanol.

PROCEDIMIENTO 2. CORTE, DESPRENDIMIENTO DE LAS ZONAS INTERNAS DEL STENCIL Y ADHESIÓN DE MÁSCARAS AL SUSTRATO. Las máscaras de vinilo son cortadas en el equipo Silhouette Cutter Plotter Cameo 3 (figura 33) en arreglos de dos y tres electrodos (figura 46).

PROCEDIMIENTO 3. FABRICACIÓN DE ELECTRODOS DE GRAFITO

Partiendo de un sustrato de PET con una máscara de cinta invisible adherida, se hace lo siguiente:

- I. Retirar interior del stencil y pegar el sustrato a una tabla adhesiva, protegiendo la cara posterior con cinta invisible (figura 52).
- II. Agitar el frasco de tinta en el vortex hasta que se escuche que las perlas del interior colisionan entre sí. Sacudir verticalmente justo antes de tomar la tinta.
- III. Abrir frasco y con la micropipeta correspondiente, tomar 20 μ L de tinta.
- IV. Enseguida, verter la tinta en la orilla de los pads, sobre la cinta.
- V. Con un sólo movimiento, desplazar con la navaja teflonada la tinta (doctor blading) a lo largo de la máscara (hacia la zona de reacción), presionando la navaja sobre la cinta para que arrastre el exceso a la vez que limpia la cinta.
- VI. Esperar a que se evapore el solvente.
- VII. Retirar la máscara con las pinzas de presión negativa - las delgadas para levantar la cinta y las gruesas para jalarla - haciendo movimientos tales que la cinta se enrolle en las puntas. Dejar secar mínimo 10 minutos antes de usar.

PROCEDIMIENTO 4. FABRICACIÓN DE ELECTRODOS DE PLATA. Para fabricar pistas de plata se debe seguir casi los mismos pasos descritos antes, el cambio está en la forma en que la pasta de plata se puede depositar, ya que su mayor viscosidad no permite que se tome con una micropipeta.

- I. Retirar interior del stencil y pegar el sustrato a la tabla adhesiva (figura 52).
- II. Agitar frasco de tinta en vortex hasta que se escuche que las perlas del interior colisionan entre sí.
- III. Dar unos golpes a la base del frasco sobre la mesa para que la tinta que queda en la tapa baje.
- IV. Abrir frasco y tomar con una espátula fina una cantidad basta de tinta (que se forme una gota en la punta). Cerrar frasco.
- V. Esparcir con la espátula la tinta a lo largo del stencil.
- VI. Enseguida, con un sólo movimiento, retirar el exceso de tinta con la navaja teflonada, moviéndose a hacia la zona de reacción. Presionar la navaja sobre la cinta en un ángulo de $\sim 30^\circ$ para que arrastre el exceso a la vez que limpia la cinta.
- VII. Retirar máscaras con pinzas de presión negativa. Dejar secar mínimo 10 minutos antes de usar.

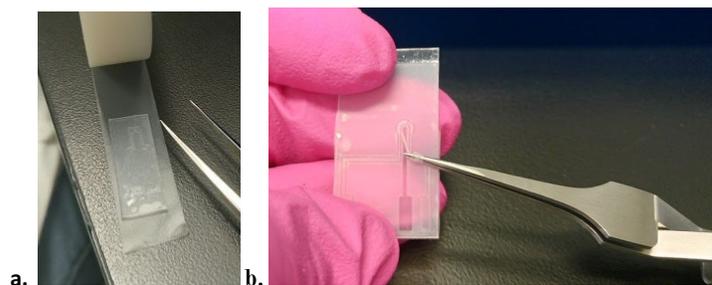


Figura 52. a. Método para adherir sustrato a cinta invisible para que ésta sea la que quede en contacto con el adhesivo removible de la tabla b. Método para desprender el interior del stencil con pinzas ultradelgadas de presión negativa.

PROCEDIMIENTO 5. FABRICACIÓN DE ARREGLOS DE PLATA Y GRAFITO EN UN MISMO SUSTRATO

- ❑ Pegar sustrato a la tabla adhesiva de trabajo.
- ❑ Retirar el interior del stencil que va a corresponder a la pista de plata (electrodo de referencia).
- ❑ Depositar tinta de plata según el PROCEDIMIENTO 4, excepto la parte de retirar la máscara. Esperar alrededor de 15 minutos a que la tinta esté seca.
- ❑ Colocar un poco de cinta invisible sobre la parte de la máscara rellena con tinta de plata, cuidando de no ejercer presión, para que el adhesivo no entre en contacto con la tinta.
- ❑ Retirar interior del stencil que corresponde a la pista de grafito.
- ❑ Depositar tinta de grafito según el PROCEDIMIENTO 1, tener especial cuidado en que al hacer el doctor blading con la navaja, se deslice al ras de la cinta de protección, sin levantarla, porque esto puede provocar que la tinta de grafito se desplace hacia las pistas de plata.
- ❑ Retirar toda la máscara, siguiendo las recomendaciones ya dadas. Dejar secar mínimo 10 minutos.

ARREGLOS FABRICADOS CON EL PROTOCOLO 3

En la figura 53 se muestran comparaciones de los arreglos logrados antes y después de la estandarización de los procedimientos. Se puede observar que se mejoró la definición de los bordes de los arreglos y la uniformidad de sus superficies utilizando los procedimientos 3 y 4 de fabricación de electrodos de sólo grafito y plata respectivamente.

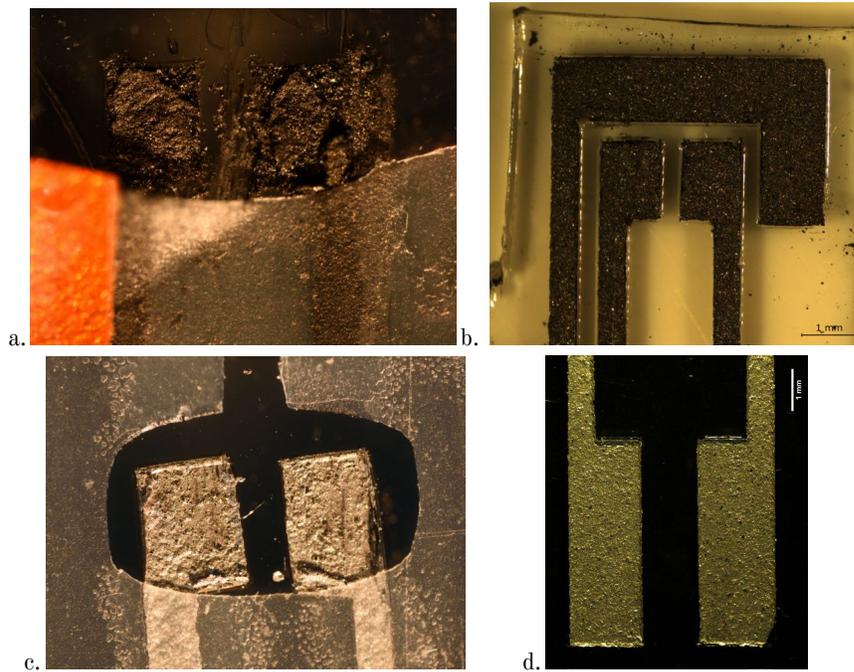


Figura 53. Arreglos por doctor blading antes y después de estandarización. Barras de escala: 1 mm.

Se fabricó con el protocolo estandarizado una tanda de arreglos con un electrodo de grafito y uno de plata. En la figura 54 se muestran fotomicrografías de uno de los ejemplares, captadas mediante un microscopio estereoscópico y uno de barrido electrónico. En la imagen de SEM se puede observar con mayor detalle que la superficie de plata es más lisa que la de grafito, sin embargo, en el electrodo de plata se distinguen algunas zonas más claras que otras, lo que puede ser señal de que hay una inhomogeneidad en la densidad de las partículas de plata a lo largo de la superficie (más partículas en las zonas más claras). En el detalle de la tinta de grafito se pueden observar algunas partículas de grafito con formas prismáticas, mientras que en el detalle de la tinta de plata, se alcanzan a distinguir partículas esféricas embebidas en el compuesto.

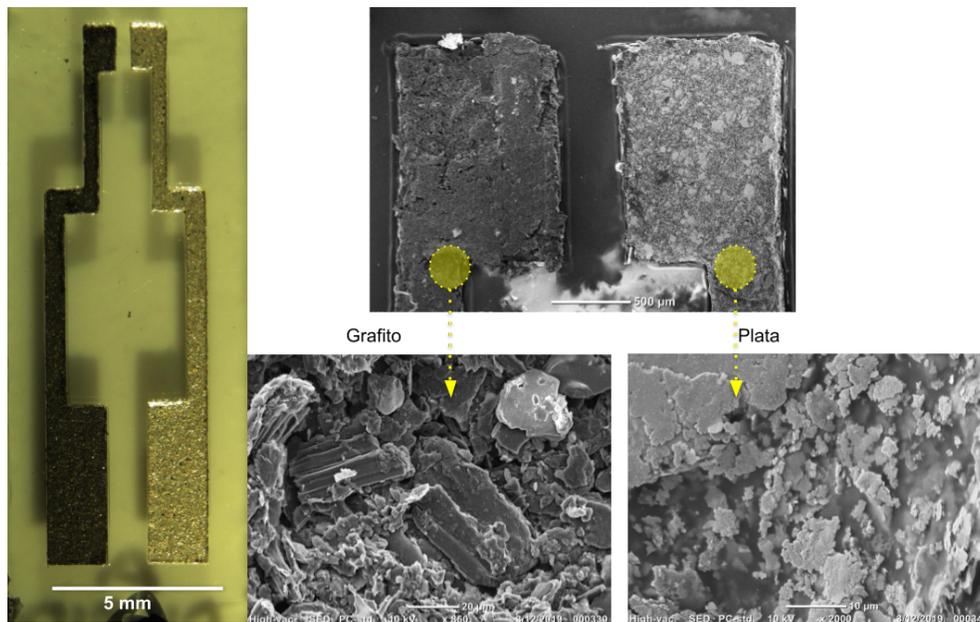


Figura 54. Arreglo de electrodos de grafito-plata fabricados con protocolo 3 estandarizado. Se muestran fotomicrografías por SEM del detalle de las tintas, se alcanzas a distinguir las partículas conductoras.

Estos arreglos se sometieron a pruebas de caracterización eléctrica y geométrica para estudiar la reproducibilidad del protocolo. Para la caracterización geométrica, se hicieron estudios de perfilometría, cuyos resultados se muestran en la sección siguiente. En cuanto a la caracterización eléctrica se realizó un estudio de espectroscopía de impedancia eléctrica, el cual se presenta en el capítulo 5.

4.3.2 Análisis por perfilometría de los arreglos grafito-plata

La perfilometría mecánica o de contacto es una técnica de análisis superficial 2D, basada en un estilete. La técnica consiste en la medida del desplazamiento vertical que se produce en el estilete mientras se realiza un barrido lineal manteniendo constante la fuerza que éste realiza sobre la superficie de la muestra (figura 55). [56]

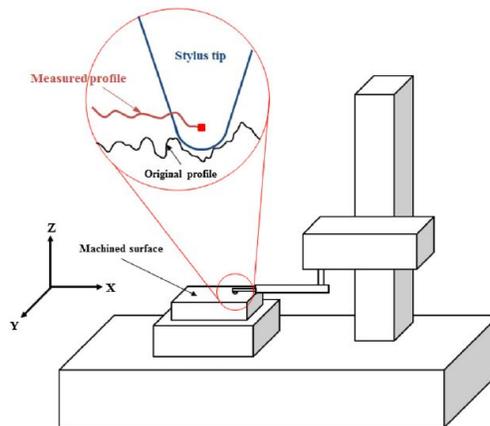


Figura 55. Caracterización por perfilometría. Principio de funcionamiento (tomado de [57])

En este caso se deseaba caracterizar el espesor a lo largo del electrodo, puesto que es un parámetro que se desea poder reproducir porque afecta la conductividad eléctrica. En un proyecto del grupo de trabajo se demostró que el valor de la magnitud de la impedancia (Z) es inversamente proporcional al área de sección transversal, donde se usaron varios electrodos de carbono de la misma longitud y diferente área de sección transversal.[49]

Se realizó el análisis por perfilometría de las muestras “arreglo grafito/plata” 1 a 3, usando el Perfilómetro KLA Tencor D600. Se definieron tres zonas de interés en cada electrodo: la zona de reacción (reactor), la pista (brazo) y los pads de contacto. Se hicieron tres pases en cada zona, como se muestra en el recuadro amarillo de la figura 56, con las flechas rojas.

Los valores mostrados en la figura 56 corresponden al promedio de espesor de cada pista, tomando los nueve escaneos. Se esperaba que los valores para las tres pistas de grafito fuesen iguales o muy cercanos, lo mismo que para las tres pistas de plata, incluso que fueran iguales entre sí, con base en la hipótesis de que la técnica de “Doctor Blading” permite fabricar estructuras de espesor uniforme, determinado por el espesor del molde, la cinta invisible en este caso ($62.5 \mu\text{m}$ [58]).

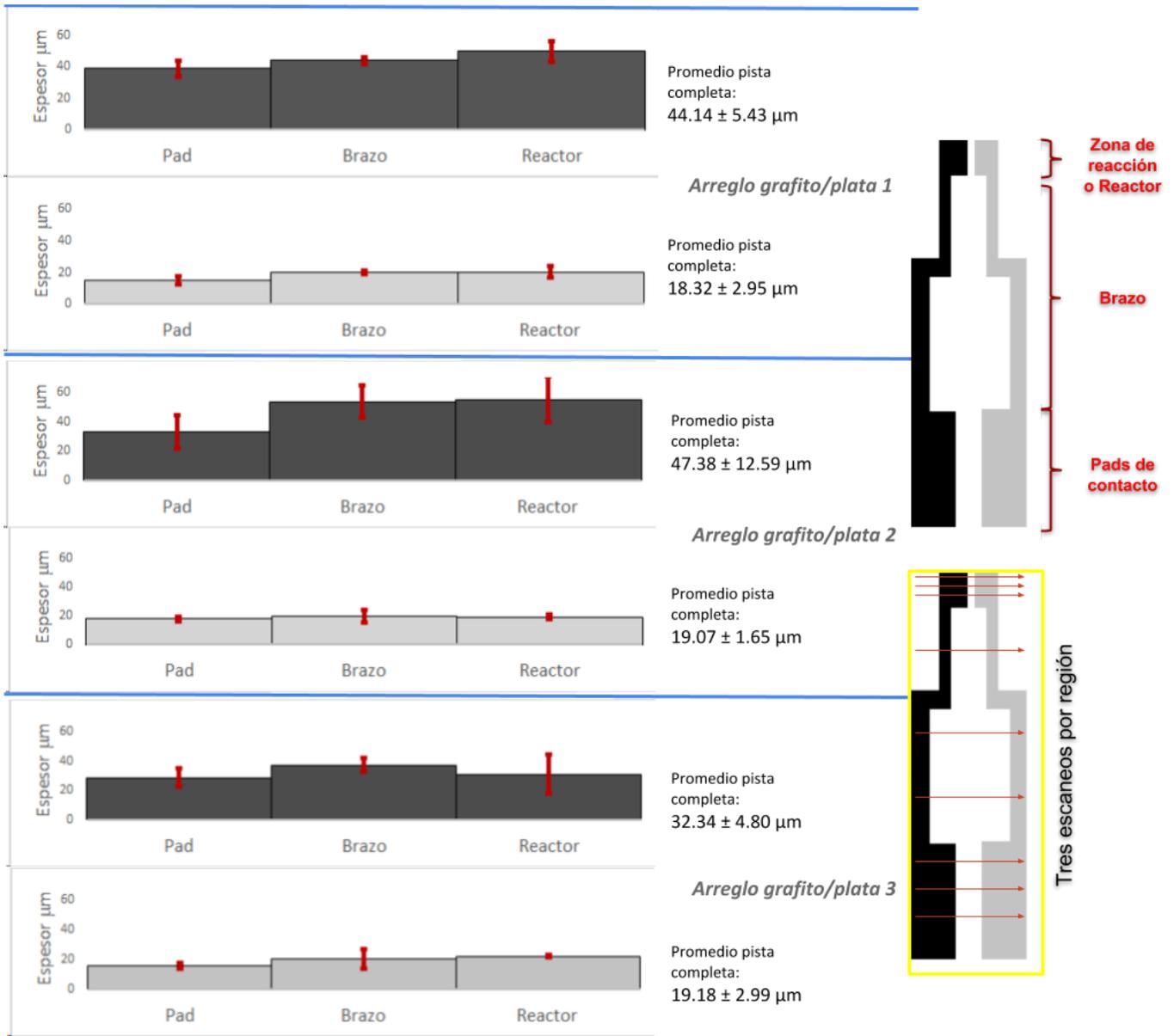


Figura 56. Resultados de la caracterización del perfil de los electrodos de grafito y de plata fabricados por el método 3.

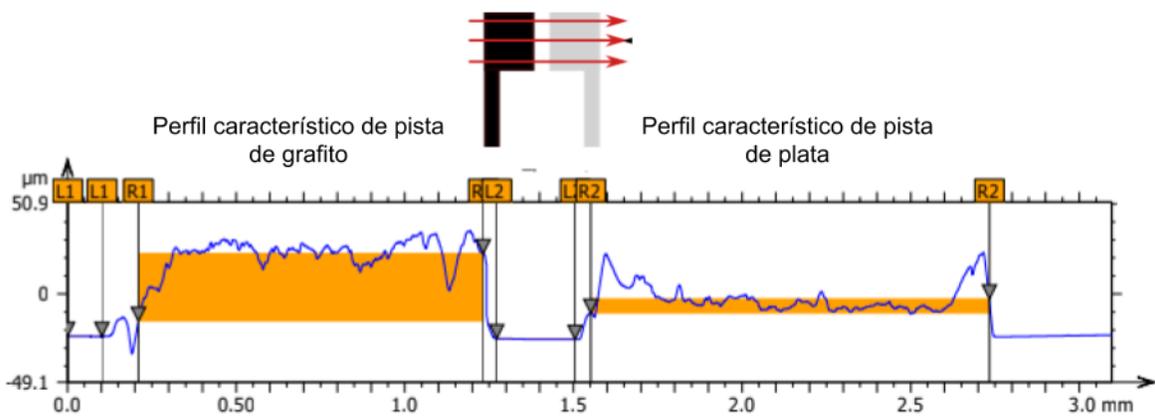


Figura 57. Perfil característico que mostraron los electrodos de grafito (izquierda) y los de plata (derecha).

Se promediaron los valores correspondientes a cada material. En el caso de los electrodos de carbono, hay una desviación del 19.18% respecto al valor promedio de espesor (41.3 μm). Para los electrodos de plata, la desviación en el espesor es del 2.47% respecto al valor promedio de (18.9 μm). Con base en los valores de desviación, se puede decir que la fabricación de los electrodos de plata es más reproducible que la de los electrodos de grafito. Por otro lado, como puede verse de los valores promedio, y las gráficas de la figura 56, el espesor de los electrodos de grafito es mayor que el de los electrodos de plata. Esto puede deberse a que el tamaño de las partículas de plata sea menor que el de las partículas de grafito, generando mayor compacidad al momento de evaporarse el solvente.

En la figura 57, se muestra el perfil característico que mostraron todos los escaneos para cada material. En las pistas de grafito se observó mayor “rugosidad” (desde 5 hasta 12 μm) que en las pistas de plata (entre 1.5 y 3 μm), pero en el perfil de estas últimas fue característica la forma cóncava, es decir, las elevaciones en los extremos. La mayor rugosidad de las pistas de grafito puede deberse a que las partículas conductoras no estaban distribuidas uniformemente en el volumen agregado al momento de esparcir con la navaja. Esto también se vería influenciado por un tamaño de partícula mayor.

Aunque se mostró un protocolo en el que, después de varias pruebas de fabricación, se definieron los pasos que cualitativamente (observación) dieron mejores resultados, de la caracterización se puede ver que aun hay oportunidad de optimizarlos. Siguiendo esta idea, en el anexo A2 se muestra un post-tratamiento de calentamiento y deformación con presión uniforme que se realizó a los electrodos. Además, en el anexo A3 se muestra una propuesta de procedimiento para inmovilizar cloruro de plata sobre los electrodos de plata, en analogía a las tintas de plata-cloruro de plata que se usan en la fabricación de electrodos por screen-printing (ver sección 2.3.2.2), o a los electrodos de referencia de filamento de plata con recubrimiento de cloruro de plata “caseros”.[59] Se espera que con este procedimiento se logre mayor estabilidad en el comportamiento de la corriente respecto al tiempo.

4.4 Protocolo 4. Electrodo de superficie metálica estructurada

Los sustratos térmicamente encogibles son plásticos como el poliestireno (PS) y las poliolefinas, que durante su proceso de fabricación son calentados, desplegados en forma de hojas delgadas y finalmente son enfriados rápidamente para que mantengan esa forma, dejando un campo de estrés dentro del material. El acomodo menos energético de las cadenas poliméricas es en forma de madejas aleatoriamente agrupadas. [60] Entonces, al subir la temperatura del material éste tiende a liberar el estrés dentro y a acomodarse en la forma menos energética, encogiéndose. [61]

Este principio permite el encogimiento de materiales que se depositan sobre el poliestireno, generando estructuras en relieve. Esta idea se ha usado ampliamente para hacer moldes para replicar con litografía suave.[62] Recientemente [63] se describió su aplicación en la fabricación de estructuras metálicas con superficies estructuradas mediante el encogimiento de una película delgada de metal depositada en la superficie del poliestireno. En tal trabajo[63] comprueban además que es posible transferir estas películas estructuradas a sustratos flexibles como el PDMS, generando estructuras conductivas flexibles y estirables (figura 58). La gran ventaja que presentan este tipo de arreglos es que la presencia de microarrugas permite tener más superficie electroquímicamente activa por área geométrica que en un electrodo plano, lo que aumenta la sensibilidad por área geométrica. Esto es de gran interés para la fabricación de biosensores altamente sensibles integrables a dispositivos microfluídicos, los cuales también se suelen fabricar en PDMS.

Para aprender de primera mano este método de fabricación de electrodos se realizó una estancia de investigación en el Grupo Moran-Mirabal en el Departamento de Química y Química Biológica de la Universidad de McMaster, en Hamilton, Canadá. El protocolo a continuación descrito (figura 59) fue desarrollado durante esta estancia. Debido a que esta estancia se realizó en los últimos semestres del proyecto de maestría, los arreglos ya no se incluyeron en las pruebas de funcionalidad electroquímica (cronoamperometría). Este protocolo se debe someter aun a un proceso de estandarización, y por lo tanto los arreglos tampoco fueron caracterizados geométrica (perfilometría) ni eléctricamente (impedancia).

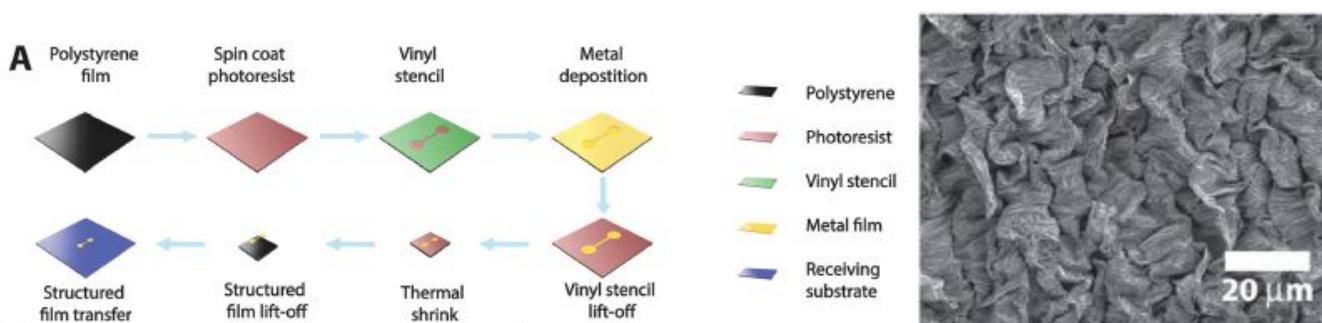


Figura 58. Izquierda: Esquema de la fabricación “bench-top” de la capa metálica rugosa y su transferencia a sustrato de PDMS. Derecha: Imagen SEM de las arrugas en la capa metálica sobre PS. Extraído de [63]

4.4.1 Descripción del protocolo 4.

PROCEDIMIENTO I. ADHESIÓN DE STENCIL A SUSTRATO DE POLIESTIRENO

1. Se diseñan las máscaras de vinilo en un formato de gráfico vectorial, por ejemplo en el software Inkscape. El tamaño del diseño debe ser 2.5 veces del tamaño que se desea obtener después del

encogimiento del poliestireno. En este caso se usaron los mismos diseños de dos y tres electrodos que en los protocolos 2 y 3. Se cortan en vinilo adhesivo en un plotter de corte. Se desprende el interior del stencil.

2. Se pega una cinta de transferencia (tienen poca adherencia) sobre la cara no adhesiva del stencil de vinilo, para que sea más fácil desprender el papel encerado sin que se deformen las máscaras. Se pega el stencil de vinilo a la superficie de poliestireno limpia (PS) y se despega cuidadosamente la cinta de transferencia. Se recortan cada uno de los arreglos de dos o tres electrodos.

PROCEDIMIENTO II. DEPÓSITO DE PELÍCULA DELGADA DE ORO

3. Se colocan los sustratos de PS con las máscaras en la base del equipo de sputtering. Se procede a hacer el depósito del metal. En este caso se hicieron películas de oro de 30 nm de espesor, para lo que se usaron aproximadamente 380 V y una corriente de 80 mA.

PROCEDIMIENTO III. ENCOGIMIENTO TÉRMICO DEL SUSTRATO DE POLIESTIRENO: ESTRUCTURACIÓN DE LA PELÍCULA DE ORO

4. Se desprende lentamente la máscara del poliestireno, para que no queden residuos de adhesivo.
5. Para el proceso de encogimiento térmico: se debe precalentar el horno a 135°C, se colocan los sustratos de poliestireno en una base de aluminio y papel, se introduce la base al horno. A esta temperatura la reducción toma de 5 a 10 minutos. Para aplanar los sustratos encogidos de poliestireno: se retiran del horno y de la base de aluminio, se colocan sobre una base plana de vidrio o silicio, se introduce esto al horno y se aumenta la temperatura a 160°C. Esperar de 3 a 5 min hasta que los sustratos se vean planos y retirar del horno. Hasta este paso se cumple el protocolo para fabricar electrodos de oro estructurados sobre poliestireno. Un tratamiento que se puede añadir antes de su implementación como celda electroquímica es limpiarlos con plasma de oxígeno por alrededor de 5 minutos.

PROCEDIMIENTO IV. TRANSFERENCIA DE PELÍCULA ESTRUCTURADA A SUSTRATO DE PDMS

6. Los arreglos de oro sobre poliestireno se sumergen a una solución de mercaptopropil trimetoxisilano (MPTMS) 5 mM en etanol y agua, por mínimo una hora y media. Se retiran del baño, se enjuagan suavemente en agua y se secan con nitrógeno o aire limpio. Se debe tener cuidado de realizar este paso dentro de una campana de extracción.
7. Al mismo tiempo que se lleva a cabo el proceso 6, se debe preparar el PDMS que se va a usar para hacer un bloque directamente sobre la superficie de oro estructurada. En este caso se usó una preparación 10:1 en volumen de base y agente curante. Se degasifica por aproximadamente 30 minutos.
8. Se coloca en un recipiente la muestra de oro y poliestireno, tratada con MPTMS, y se vierte lentamente el PDMS degasificado sobre la superficie de PS con oro.
9. Para curar el PDMS se puede introducir al horno a 60°C por un periodo de aproximadamente 2 horas, o se puede dejar a temperatura ambiente toda la noche (ON).
10. Se corta el bloque de PDMS al ras del bloque de PS, para que el disolvente del PS pueda tener mayor área de contacto con éste.
11. Se debe inspeccionar que el PDMS no se haya desprendido del oro al momento de hacer los cortes. Si ocurriese, la muestra se tiene que desechar y repetir todo el proceso, por ello se debe tener mucho cuidado en el paso 10.

12. Se introduce el bloque de PS y PDMS a un baño de acetona ON. El PS se coloca en contacto con el fondo del recipiente. El recipiente se coloca en un equipo de agitación oscilatoria, debe estar cubierto para evitar la evaporación del acetona.
13. Cuando se observe que el PS se ha gelificado se procede a retirar el bloque de PDMS con los electrodos de oro. Para esto, se agrega más acetona al recipiente para que el PS siempre esté inmerso y no se solidifique; con ayuda de unas pinzas se voltea el bloque de PDMS dentro del mismo baño. Con ayuda de una espátula se retira el gel de PS que pudiera haber quedado en la superficie de oro.
14. Para disolver cualquier residuo de PS en la superficie de oro, se realizan tres baños de tolueno, de 10 minutos cada uno, en agitación. Finalmente se coloca el bloque de PDMS en un baño de metanol para retirar el tolueno del interior.

ARREGLOS FABRICADOS MEDIANTE EL PROTOCOLO 4

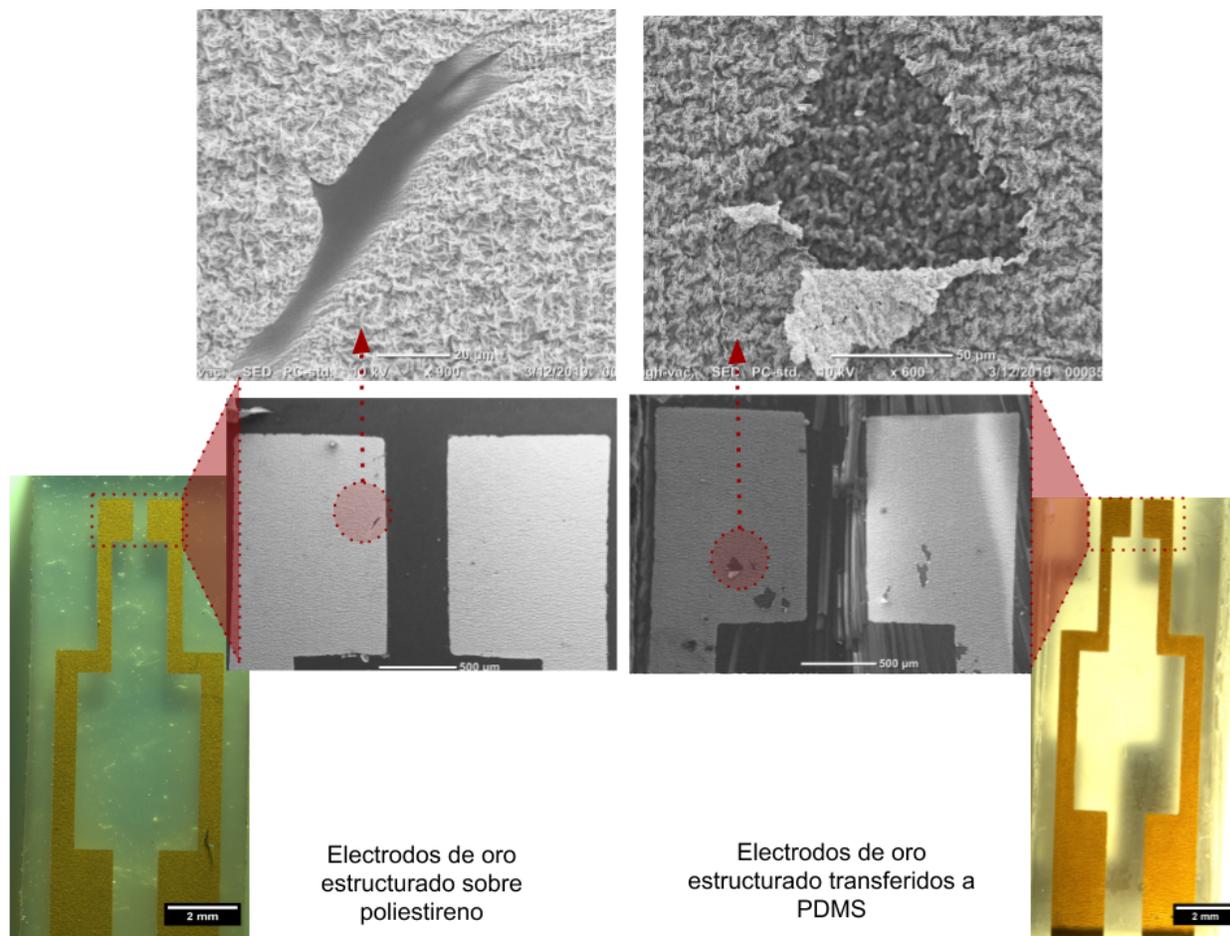
El resultado final de este protocolo son los electrodos de superficie de oro estructurada sobre un sustrato flexible de PDMS. Sin embargo, uno de los resultados intermedios, que también es de gran utilidad, son los electrodos sobre el sustrato original de poliestireno. En la figura 60 se muestran ambos tipos de arreglos. Se realizó la observación por microscopía electrónica de barrido de ambas superficies. Se enfocaron zonas con defectos para poder observar la estructura de las películas con una cierta inclinación.

Es necesario medir las dimensiones exactas logradas, pero a simple vista se puede observar que con este protocolo se logran definir las formas buscadas, y los bordes son más suaves que los que se obtienen con el “Protocolo 2. Electrodos por sputtering o evaporación” y el “Protocolo 3. Electrodos por Doctor Blading”, debido a que el proceso de encogimiento disminuye el tamaño de los defectos. En el caso de los electrodos fabricados mediante Doctor Blading se mencionó el deseo de mejorar el procedimiento para disminuir la rugosidad, pero en este caso, la presencia de microarrugas es ventajosa, como se mencionó en la introducción a este protocolo. La diferencia reside en el origen de la rugosidad. En el caso de los electrodos de tintas conductoras la rugosidad se debe a la presencia de grumos del compuesto partícula conductora-aglutinante, es señal de una baja homogeneidad en el bulto del electrodo, y por tanto es señal de una baja percolación, por lo que en este caso la rugosidad no es deseable. En el caso de la estructuración por encogimiento térmico, la película, que inicialmente es prácticamente homogénea, no pierde esta propiedad (ver figura 49) y por lo tanto las arrugas no son señal de una baja percolación, y por el contrario, son una señal de aumento de sensibilidad.

Como se aprecia en la figura 60, las microarrugas son similares en ambos tipos de sustratos, como esperado. En el proceso de estandarización a que se debe someter este protocolo, se debe poner atención en el paso de transferencia al PDMS, para evitar desprendimientos de la película estructurada, como los que se observan en la figura 60.



Figura 59. Esquema de los pasos para obtener electrodos de alta rugosidad de oro sobre poliestireno.



Electrodos de oro
estructurado sobre
poliestireno

Electrodos de oro
estructurado transferidos a
PDMS

Figura 60. Arreglos de electrodos fabricados con el Protocolo 4. Fotomicrografías por SEM de la zona de reacción en cada caso, y con un mayor aumento, de las microarrugas.

En este capítulo se presentaron cuatro protocolos de fabricación de arreglos planares de dos y tres electrodos. El primer protocolo (“Protocolo 1. Electrodos por grabado de cobre”) presentó inicialmente el problema de que el cobre quedaba unido entre al menos dos pistas entre sí después del ataque químico. Se atribuyó esto a que la solución de FeCl_3 no podía penetrar en tales zonas debido a los efectos de tensión superficial causados por el pequeño tamaño de la máscara de Loctite 3525. Para costear este problema se tuvo que trabajar en hacer un nuevo diseño con dimensiones mayores, se mejoró la limpieza del sustrato para que el adhesivo no se desprendiera en el ataque químico, se incluyeron mejoras al proceso de ataque químico como reducir la concentración de FeCl_3 y calentar la solución, y de tal forma se realizaron arreglos bien definidos. La fabricación de electrodos de cobre se ha usado en el laboratorio para aplicaciones de sensores de impedancia, como contadores de células, o sensores de temperatura. Puesto que este método es con el que se alcanza mayor resolución ($\sim 50 \mu\text{m}$), se prevé que permita fabricar fácilmente microarreglos de oro y plata. Para esto, primero se debe encontrar una forma de mejorar la adhesión de tales películas metálicas a los sustratos de vidrio o a sustratos plásticos resistentes a la acetona.

Con el segundo protocolo (“Protocolo 2. Electrodos por sputtering o evaporación”) sí se logró desde un principio la definición de cada pista, aunque con bordes bastante irregulares, efecto de la delaminación de la película metálica en la frontera del diseño, y espesores de película muy bajos. Aun así, algunos arreglos

fabricados sobre PET y PS, principalmente de materiales como oro/cobre, oro/paladio y cobre, se sometieron a pruebas de funcionalidad, que se mostrarán en el capítulo 6, De estas pruebas se concluyó que es necesario aumentar el espesor de la película metálica, y buscar métodos para mejorar la adhesión a los sustratos orgánicos y de base silicio.

Se presentó un tercer protocolo “estandarizado” de fabricación de electrodos con tintas de grafito y plata “Protocolo 3. Electrodo por Doctor Blading”, los cuales se sometieron a pruebas de caracterización geométrica y eléctrica. La reproducibilidad del protocolo de fabricación de arreglos de plata-grafito no resultó como se esperaba, pero se prevé que esto se solucione construyendo cada electrodo por separado, para finalmente ensamblarlos en un mismo sustrato. En los capítulos siguientes se describirán las caracterizaciones eléctricas y las pruebas de funcionalidad, mostrando el método y algunos principios de cada parte.

Finalmente, se observó cualitativamente que con el último protocolo (“Protocolo 4. Electrodo de superficie estructurada”) se logran definir arreglos de electrodos metálicos estructurados sobre poliestireno y sobre PDMS, con bordes mejor definidos. Además, aunque la película depositada sea muy delgada, el encogimiento aumenta su robustez y la sensibilidad por área. Se prevé que este protocolo sea fácil de estandarizar y reproducir, siendo los procesos de cuidado el depósito del metal por sputtering y el desprendimiento del poliestireno gelificado en la transferencia al sustrato de PDMS.

Capítulo 5. Caracterización eléctrica

Como ya se describió en el capítulo anterior, se implementaron varios métodos de fabricación de arreglos de electrodos pero solamente el “*Protocolo 3. Electrodo de tintas conductoras fabricados mediante doctor blading*” se sometió a pruebas de estandarización, y por tanto, a las pruebas de caracterización.

La caracterización eléctrica de los arreglos se realizó mediante un análisis de su espectro de impedancias. Las mediciones de impedancia son necesarias para caracterizar la respuesta del material ante diferentes condiciones eléctricas.[64,65] En el caso de los sensores electroquímicos es importante evaluar si su comportamiento es compatible con las condiciones de las técnicas electroquímicas para las que se quieren usar, por ejemplo con los voltajes de polarización o las velocidades de escaneo. Dado que, idealmente, se evalúan arreglos con las mismas dimensiones (longitud y sección transversal), la magnitud de la impedancia permite evaluar si hubo reproducibilidad en la fabricación, para cada material. A continuación se describen brevemente los fundamentos y la metodología para hacer una caracterización por impedancias, y posteriormente se muestran los resultados del estudio una tanda de arreglos fabricados con el “Protocolo 3. Electrodo por Doctor Blading”.

5.1 Fundamentos de la caracterización de impedancias

La impedancia [Ω] es una variable eléctrica que describe la resistencia de un circuito en corriente alterna y se define por la razón:

$$Z = E/I \quad \dots \text{Ec. 16}$$

Donde:

$$E = \Delta E \sin(\omega t) \quad \dots \text{Ec. 17}$$

$$I = \Delta I \sin(\omega t + \phi) \quad \dots \text{Ec. 18}$$

son el valor instantáneo del potencial eléctrico [V] y de la corriente eléctrica [A] respectivamente. ΔE y ΔI son la amplitud máxima del senoide y ω es la frecuencia angular. Cuando en el circuito están involucrados elementos eléctricos como un inductor (L) o un capacitor (C), se define la variable eléctrica *reactancia* (X) que puede ser *inductiva* ($X_L = 2\pi fL$) o *capacitiva* ($X_C = 1/(2\pi fC)$) respectivamente. Entonces, la impedancia se puede representar como un número complejo,

$$Z = R + jX \quad \dots \text{Ec. 19}$$

que encuentra su representación gráfica en el plano complejo como se muestra en la figura 61. También se puede representar la impedancia como una magnitud y un ángulo de fase: $|Z|$, θ , donde

$$|Z| = \sqrt{R^2 + X^2} \quad \& \quad \theta = \tan^{-1}(X/R) \quad \dots \text{Ec. 20}$$

La espectroscopía de impedancias se refiere al estudio de los cambios de impedancia respecto a los cambios en la frecuencia de la corriente alterna. Generalmente los valores de θ para un material conductor son muy bajos $< 5^\circ$. Esto significa (ecuación 20) que $R \gg X$, por lo tanto la magnitud de la impedancia nos da una

pista de la resistencia eléctrica del material. Por otro lado, el comportamiento de θ nos permite identificar bajo qué tipo de reactancia se está comportando el material. Si se tiene un desfase de 90° se trata de un elemento inductivo (L) y Z estará representado en el primer cuadrante. Si se tiene un desfase de -90° el elemento es capacitivo y se representa en el cuarto cuadrante.

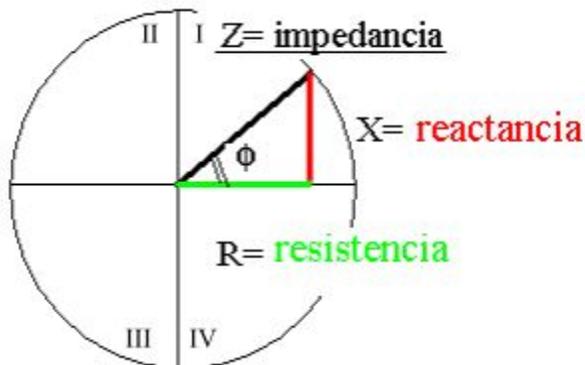


Figura 61. Representación de la impedancia en el plano complejo.

5.2 Metodología de medición de impedancias

La caracterización eléctrica de los electrodos se realizó utilizando el medidor de impedancias Precision LCR Meter Agilent E4980A. Se usaron señales de 0.1 V, 0.5 V, 1 V y 1.5 V puesto que son valores que están o se acercan al rango de potenciales de reducción de las sustancias de interés (como H₂O₂, 0.7 V). El barrido espectroscópico se realizó a temperatura ambiente, en todo el rango de frecuencias que ofrece el equipo (de 20Hz a 2MHz) seccionado en intervalos en escala logarítmica. El medidor de impedancias E4980A tiene intrínsecamente una configuración de medición de cuatro terminales las cuales han sido adaptadas a dos terminales (figura 62) junto a un equipo de micromanipulación (figura 63). Después de hacer una calibración en modo circuito abierto y en corto circuito, se seleccionan los parámetros de medición mencionados arriba. Se procede a colocar la muestra en la platina y a hacer contacto con las puntas en los extremos del electrodo, como se ejemplifica en las figura 63 c y d, con ayuda de las perillas del micromanipulador. Cuando las puntas están en una posición estable, se inicia el barrido de frecuencias al potencial seleccionado.

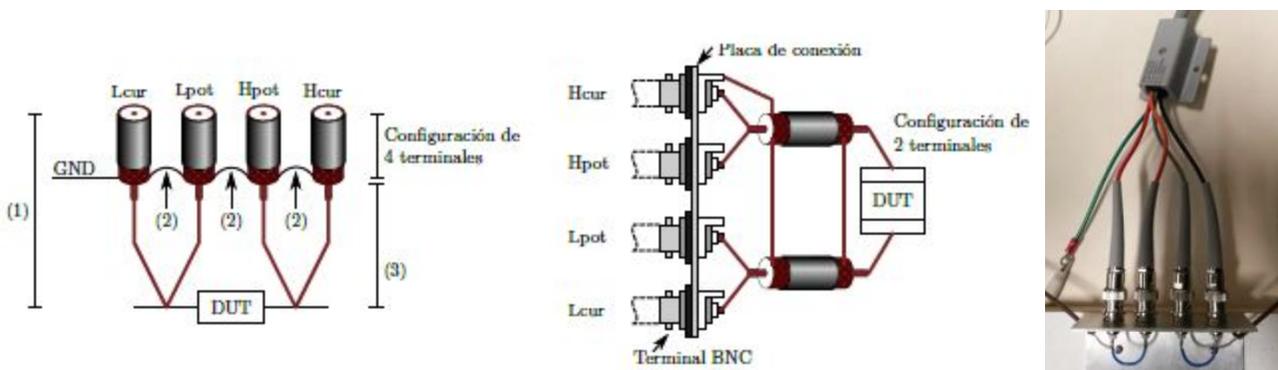


Figura 62. Esquema 1: Configuración de 4 terminales. Esquema 2: Configuración adaptada a 2 terminales. Esquema 3. Fotografía de las terminales del medidor de impedancias.

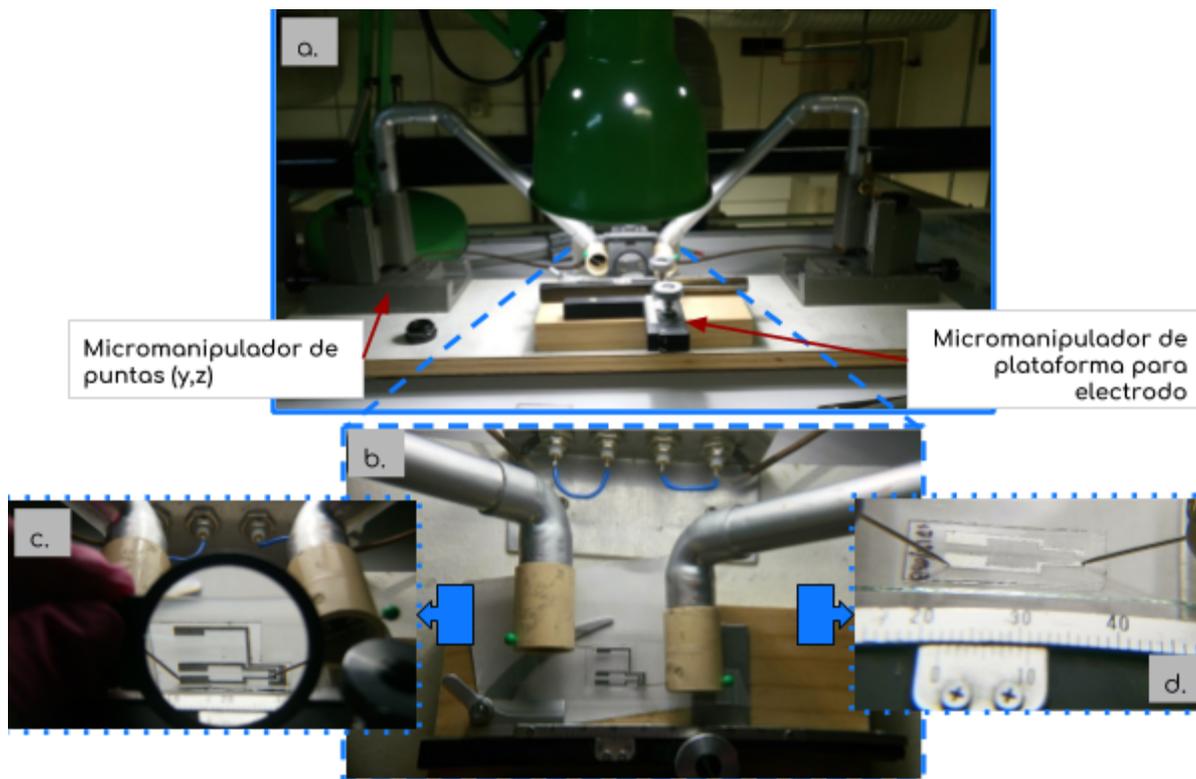


Figura 63. Proceso de caracterización de impedancias de los electrodos planares. a) Micromanipulador. b) Acercamiento a la zona de medición. c) Ejemplo de medición a una pista de grafito. d) Ejemplo de medición a una pista de plata.

5.3 Resultados de la caracterización de impedancias

CARACTERIZACIÓN DE ELECTRODOS DE PLATA Y GRAFITO DEL PROTOCOLO 3.

La caracterización eléctrica se realizó a 3 arreglos con una pista de plata y una de grafito, los mismos cuya caracterización geométrica se discutió antes. Como se mencionó en la sección anterior, para cada pista se realizó un barrido logarítmico de frecuencias a cuatro valores de voltaje: 0.1 V, 0.5 V, 1 V y 1.5 V.

Primero, se muestran ejemplos representativos de las gráficas Z vs f y Θ vs f para una pista de grafito y una de plata (figura 64). De estas se puede estudiar el comportamiento eléctrico que expresa cada material, plata o grafito. Se observa que:

- Las pistas de plata tienen un valor de impedancia casi 4 órdenes de magnitud menor al valor de la impedancia de las pistas de grafito. Quizá se podrían agregar compuestos a base de carbono a la tinta de grafito, como nanopartículas de carbono o grafeno, populares recientemente en la fabricación de materiales conductores, para aumentar la densidad de partículas conductoras y así la percolación.
- La impedancia de las pistas de plata muestra un comportamiento congruente con la ley de Ohm: $Z \propto E$, como se predice para un material “buen conductor”.
- La impedancia de las pistas de grafito no muestra un comportamiento congruente con la ley de Ohm, sino inverso: $Z \propto 1/E$.
- Las pistas de plata muestran un comportamiento inductivo (RL en serie), esperado de los buenos conductores.
- Las pistas de grafito muestran un comportamiento capacitivo (RC en paralelo), esperado de materiales más resistivos, como lo son los compuestos de carbono, cuyas propiedades eléctricas dependen de las fracciones de carbono sp^2 .

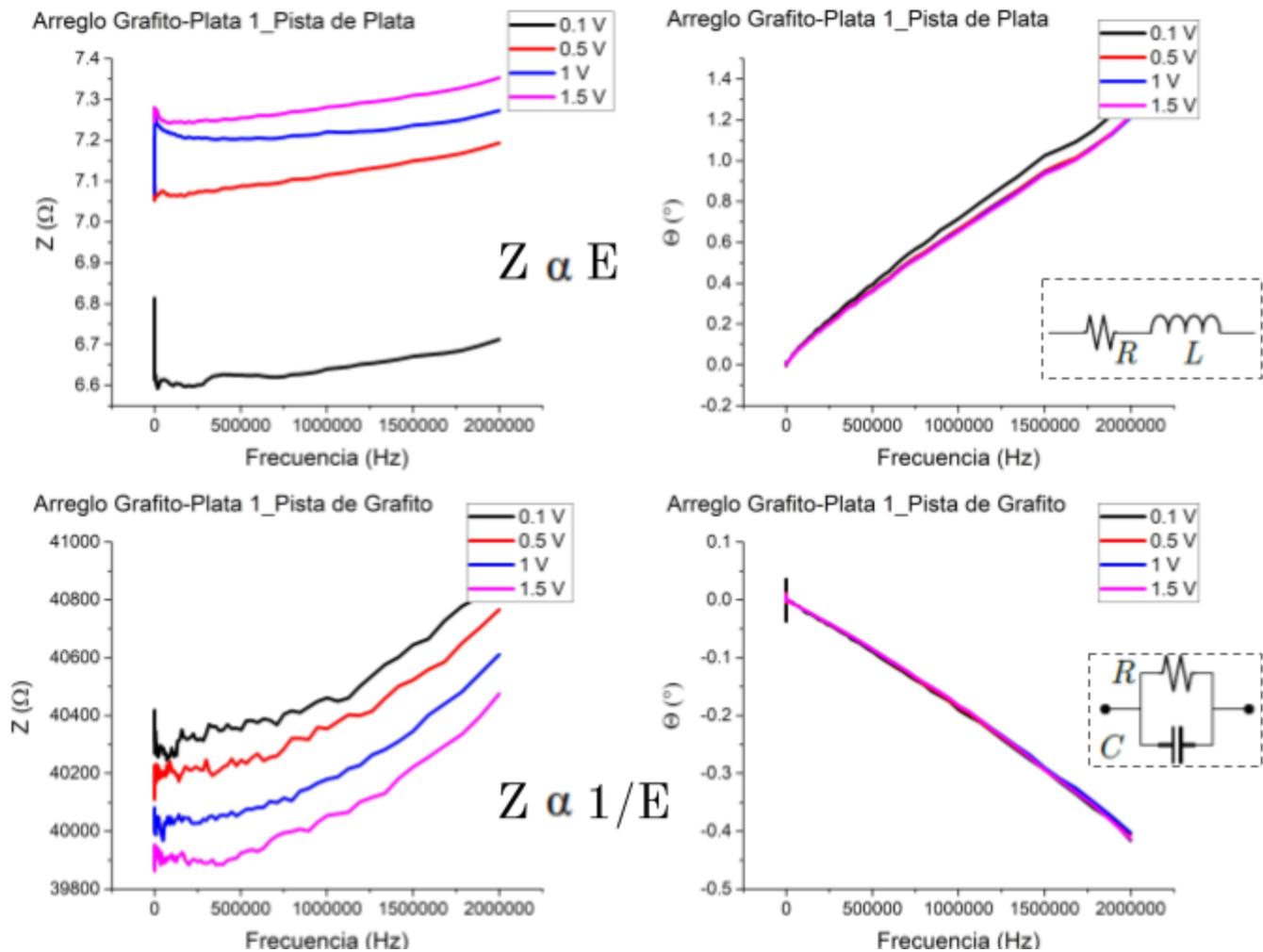


Figura 64 Gráficas Z vs f y Θ vs f representativas para cada material. Se inserta en cada caso el circuito equivalente según el comportamiento eléctrico detectado.

Para cada pista y cada voltaje, se identificó el *valor más alto de magnitud de la impedancia Z* en el rango escaneado de frecuencias. Se hizo un promedio de estos valores, para cada pista, y se calculó la desviación estándar (tablas en tabla 2). Las pistas de plata presentaron una desviación de la *impedancia promedio* (serie de voltajes 0.1 a 1.5 V) desde 1.0% hasta 7.6%. Para las pistas de grafito, la desviación quedó en el rango de 0.1% y 0.3% respecto al valor promedio. Esto implica que las pistas de plata son más sensibles al cambio de voltaje que las de grafito. Esto es una desventaja, ya que las pistas de plata se desean usar como electrodos de pseudoreferencia, es decir, se espera que sean más estables ante los cambios de potencial.

Ahora, para estudiar la variabilidad, se calculó la media y la desviación estándar de los valores de *impedancia promedio* calculados antes para cada pista, segregando evidentemente cada tipo de material, plata o grafito. A mayor desviación del valor de impedancia promedio, mayor variabilidad y menos reproducibilidad. En la tabla 3 se encuentran los resultados.

Tabla 2. En esta tabla se muestran fotomicrografías de los arreglos de plata/plata y de grafito/plata logrados mediante el protocolo 3.

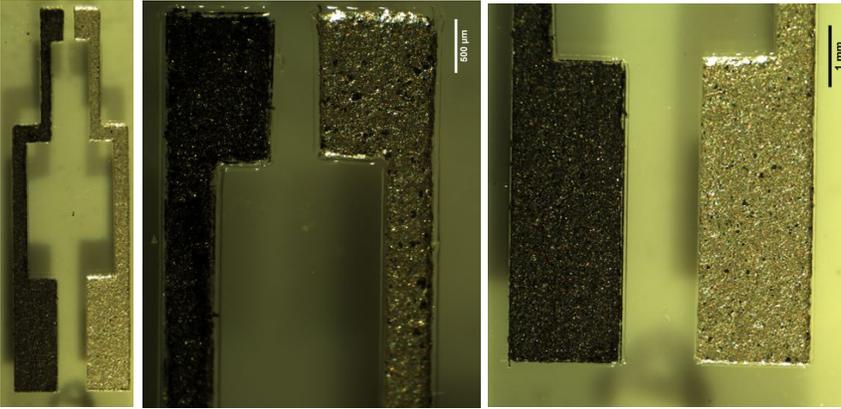
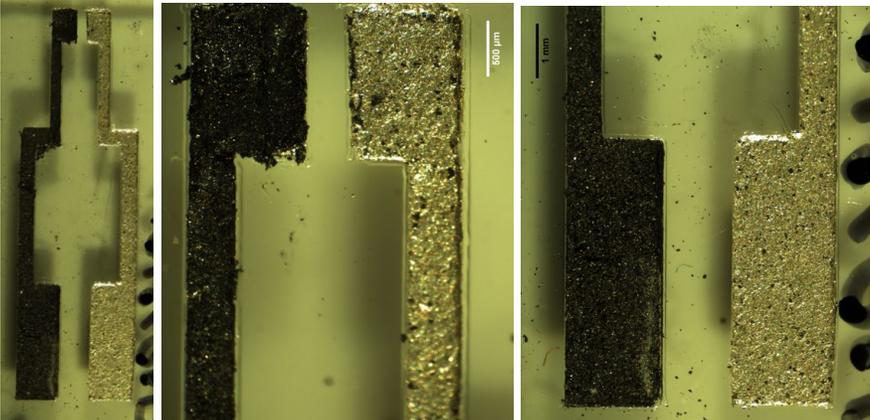
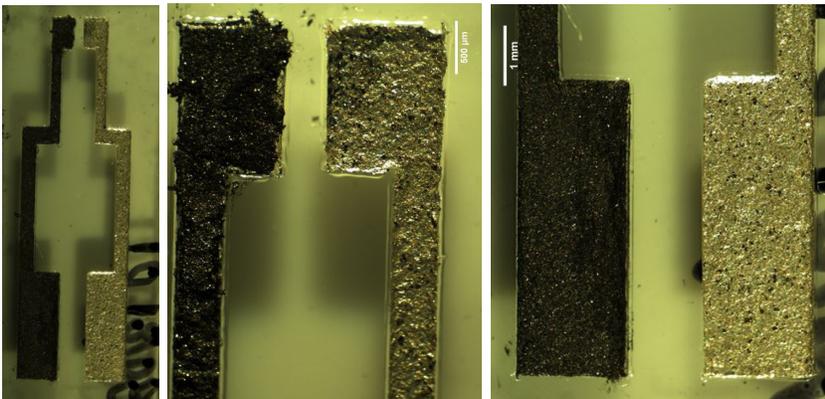
| Fotografías de la superficie con luz rasante | Tabla de valor promedio de Z | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---|-------------|---------------|-------------|---------------------|----------|---------|-----------------------|----------|---------|-----------------------|-------|-------|--|--|
|  | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Material</th> <th>Pista Grafito</th> <th>Pista Plata</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> Z promedio</td> <td>40.68 kΩ</td> <td>7.10 Ω</td> </tr> <tr> <td>Desv. estándar</td> <td>0.140 kΩ</td> <td>0.193 Ω</td> </tr> <tr> <td>%Des. estándar</td> <td>0.3%</td> <td>2.7%</td> </tr> </tbody> </table> | Material | Pista Grafito | Pista Plata | Z promedio | 40.68 kΩ | 7.10 Ω | Desv. estándar | 0.140 kΩ | 0.193 Ω | %Des. estándar | 0.3% | 2.7% | | |
| Material | Pista Grafito | Pista Plata | | | | | | | | | | | | | |
| Z promedio | 40.68 kΩ | 7.10 Ω | | | | | | | | | | | | | |
| Desv. estándar | 0.140 kΩ | 0.193 Ω | | | | | | | | | | | | | |
| %Des. estándar | 0.3% | 2.7% | | | | | | | | | | | | | |
|  | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Material</th> <th>Pista Grafito</th> <th>Pista Plata</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> Z promedio</td> <td>18.02 kΩ</td> <td>5.09 Ω</td> </tr> <tr> <td>Desv. estándar</td> <td>0.020 kΩ</td> <td>0.051 Ω</td> </tr> <tr> <td>%Des. estándar</td> <td>0.1 %</td> <td>1.0 %</td> </tr> </tbody> </table> | Material | Pista Grafito | Pista Plata | Z promedio | 18.02 kΩ | 5.09 Ω | Desv. estándar | 0.020 kΩ | 0.051 Ω | %Des. estándar | 0.1 % | 1.0 % | | |
| Material | Pista Grafito | Pista Plata | | | | | | | | | | | | | |
| Z promedio | 18.02 kΩ | 5.09 Ω | | | | | | | | | | | | | |
| Desv. estándar | 0.020 kΩ | 0.051 Ω | | | | | | | | | | | | | |
| %Des. estándar | 0.1 % | 1.0 % | | | | | | | | | | | | | |
|  | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Material</th> <th>Pista Grafito</th> <th>Pista Plata</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> Z promedio</td> <td>24.20 kΩ</td> <td>12.62 Ω</td> </tr> <tr> <td>Desv. estándar</td> <td>0.030 kΩ</td> <td>0.151 Ω</td> </tr> <tr> <td>%Des. estándar</td> <td>0.1%</td> <td>1.2 %</td> </tr> </tbody> </table> | Material | Pista Grafito | Pista Plata | Z promedio | 24.20 kΩ | 12.62 Ω | Desv. estándar | 0.030 kΩ | 0.151 Ω | %Des. estándar | 0.1% | 1.2 % | | |
| Material | Pista Grafito | Pista Plata | | | | | | | | | | | | | |
| Z promedio | 24.20 kΩ | 12.62 Ω | | | | | | | | | | | | | |
| Desv. estándar | 0.030 kΩ | 0.151 Ω | | | | | | | | | | | | | |
| %Des. estándar | 0.1% | 1.2 % | | | | | | | | | | | | | |

Tabla 3. Promedios de la magnitud de impedancia para cada tipo de pista.

| Datos de todas las pistas de plata fabricadas con el “protocolo 3” | | Datos de todas las pistas de grafito fabricadas con el “protocolo 3” | |
|--|---------|--|----------|
| Z Promedio | 6.50 Ω | Z Promedio | 27.51 kΩ |
| Desv.Est | 1.920 Ω | Desv.Est | 6.067 kΩ |
| %Desv | 29.53 % | %Desv | 22.05 % |

De los resultados de la tabla 3 se destaca que:

- La desviación del valor promedio es similar entre los dos casos a pesar de que en la caracterización geométrica los electrodos de plata tenían menos variabilidad que los de grafito.
- Es un error mucho mayor a los comúnmente tolerados en “buenas prácticas de laboratorio” ($<5\%$). En suma con los resultados de la caracterización geométrica, esto quiere decir que aun se debe trabajar en el protocolo de fabricación para lograr resultados reproducibles.

En este capítulo se mostró la caracterización eléctrica que se hizo a los arreglos plata-grafito fabricados mediante el “Protocolo 3. Electrodo por Doctor Blading”, los resultados apuntan a que se debe poner más esfuerzo en la optimización del protocolo, y verificar los resultados cuantitativamente y no sólo por observación, siguiendo esta idea, se deben realizar también las caracterizaciones geométrica y eléctrica de los arreglos resultantes de los demás protocolos, aprovechando que los diseños ya fabricados tienen las mismas dimensiones 2D.

Capítulo 6. Validación de la funcionalidad de los arreglos fabricados

Algunas de las pruebas de validación mostradas se realizaron siguiendo el orden de los objetivos, es decir, antes de proceder a la fabricación estandarizada de los arreglos, realizadas con la finalidad de comprobar si la combinación de materiales y el acomodo de éstos tenía un comportamiento electroquímico deseable. De este tipo se muestran las gráficas para un arreglo de plata-grafito fabricado con el protocolo 3; uno de oro-paladio depositado por sputtering, otro de cobre depositado por evaporación, fabricados con el protocolo 2; y finalmente la prueba con un arreglo de cobre fabricado con el protocolo 1. Otras pruebas se realizaron con los arreglos de grafito-plata que se presumía estaban estandarizados, y que ya se habían caracterizado, con soluciones de ácido ascórbico.

Al final se presenta una prueba preliminar de inmovilización de glucosa oxidasa en la tinta de grafito. Para corroborar la presencia y actividad de la enzima se llevaron a cabo pruebas de cronoamperometría con soluciones de glucosa en PBS a pH ajustado en 7.4.

6.1 Pruebas de validación de aplicabilidad en electroquímica

En general, de estas pruebas se esperaba observar picos de corriente como los que se muestran en las gráficas de la sección *Voltamogramas*. Un comportamiento congruente con lo esperado es una señal de que:

- El arreglo de electrodos se polarizó adecuadamente tal que provocó la reacción redox en el analito estudiado, que se detecta como un aumento de la corriente proveniente del electrodo de trabajo.
- La corriente de cargas generada tras la reacción redox fue adecuadamente conducida desde el electrodo hacia el sistema de medición.
- La reacción redox fue uniforme, es decir, ocurrió “al mismo tiempo” en toda la superficie del electrodo de trabajo.
- La corriente tuvo un comportamiento cinético $I(t)$ como esperado según los procesos de limitación por efectos de difusión (ver 2.2.3.2 *Voltamogramas*).
- Se alcanza el estado de corriente de estado estable, como se espera para las dimensiones que se están manejando.

El que se cumplan estas características indica que los arreglos de electrodos son aplicables como sensores electroquímicos. Encima, mostrando que los arreglos fabricados en este trabajo pueden sensar concentraciones de peróxido de hidrógeno y ácido ascórbico similares a las que están involucradas en los procesos fisiológicos, podemos estar más cerca de decir que los arreglos son funcionales como biosensores.

Las pruebas electroquímicas se implementaron usando una “unidad fuente y de medición” SMU 2450 de la marca Keithley, cuyo software fue actualizado con el kit *EC-UPGRADE*, de la misma marca, para poder ser utilizado como un potenciostato. La actualización permite implementar las rutinas que nos interesan, Cronoamperometría y Voltametría Cíclica (figura 65). Las mediciones se hicieron con un conector tipo peine como el que se muestra de nuevo en la figura 66. Este se obtuvo del “Kit de Voltametría Cíclica” de la marca PINE Research.

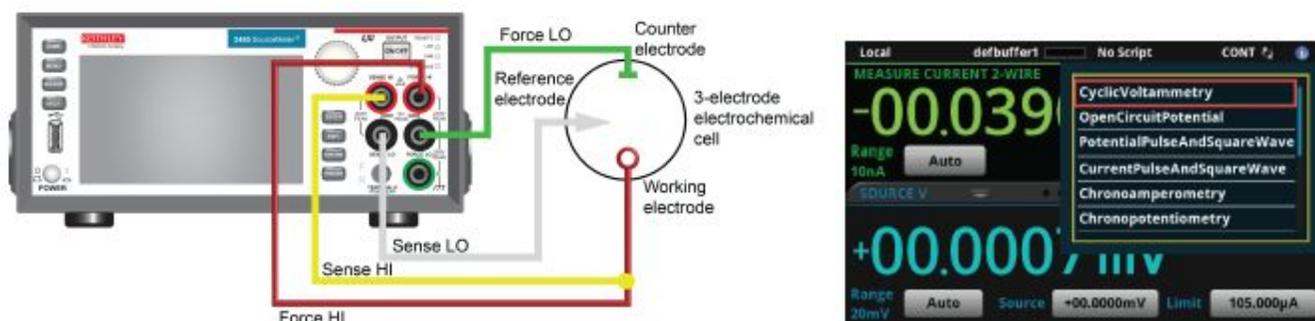


Figura 65. Esquema de la unidad fuente y de medición SMU 2450 de la marca Keithley. Pantalla principal con menú de Scripts desplegado para seleccionar las rutinas electroquímicas.

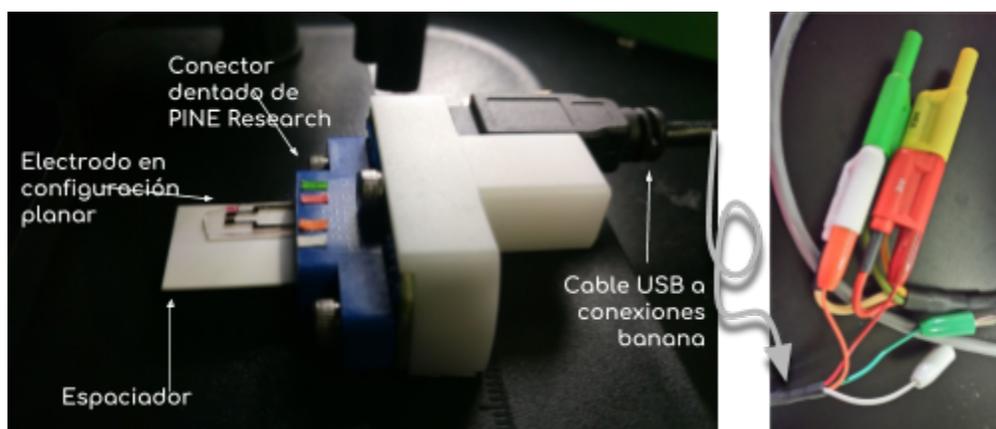


Figura 66. Uso del conector dentado para las pruebas con los electrodos planares fabricados. En la fotografía de la derecha se muestra como ejemplo el ensamble para la medición con dos electrodos.

6.1.1 Pruebas de cronoamperometría

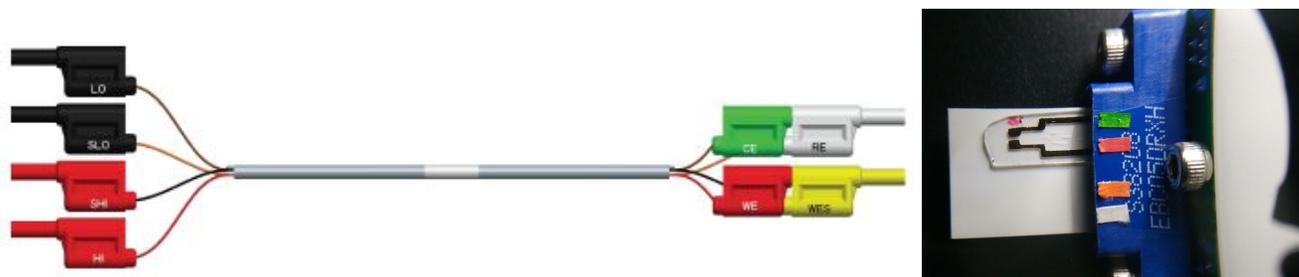
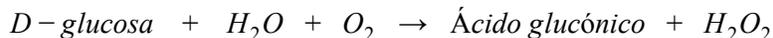


Figura 67. Conexiones a realizarse para hacer pruebas con celdas de dos electrodos. Como ejemplo, el electrodo de referencia se conectó en el diente marcado en verde, y el electrodo de trabajo en el diente marcado en rojo. Lo que es importante es identificar en cuál diente está cada electrodo, para conectar de forma correcta en los cables del SMU (figura 66).

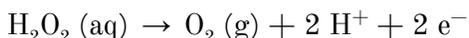
Para las pruebas de cronoamperometría, después de realizadas las conexiones pertinentes (figura 67) se inicia el script “Chronoamperometry” en la unidad SMU. Se seleccionan los parámetros de trabajo (número de escalones de potencial, voltaje, tiempo de polarización y velocidad de adquisición de datos). Se inicia la rutina, se espera de 5 a 7 segundos a que la corriente de fondo se estabilice, y entonces se agrega la gota de analito sobre la zona de reacción, se debe observar un aumento de corriente en la pantalla del equipo. Finalizado el tiempo de polarización, se seca la superficie y se guardan los datos de corriente contra tiempo en un dispositivo USB, identificando las condiciones en el nombre del archivo.

Pruebas con soluciones de peróxido de hidrógeno

Es interesante probar el funcionamiento de los electrodos para la medición de H_2O_2 puesto que esta sustancia es la especie electroactiva, la que sufre una oxidación, en el proceso de detección de la glucosa, sustancia de diagnóstico común. La detección de H_2O_2 se realiza generalmente mediante la técnica de cronoamperetría, utilizando como polarización constante su potencial de oxidación: 0.7 V. La reacción en la que la enzima glucosa oxidasa degrada la glucosa tiene la siguiente estequiometría:



La reacción de oxidación del peróxido de hidrógeno para producir oxígeno es:



En la tabla 4 se enlistan los rangos de concentración de glucosa libre en el organismo, y los correspondientes estados de glucemia.

Tabla 4. Rangos de glucosa en el cuerpo humano

| | |
|-----------------|-------------------------|
| < 70 mg/dL | <i>Hipoglucemia</i> |
| 70 - 100 mg/dL | <i>Niveles normales</i> |
| 100 - 125 mg/dL | <i>Glucosa alterada</i> |
| > 126 mg/dL | <i>Hiperoglucemia</i> |

Se decidió preparar soluciones de peróxido de hidrógeno de 50 mg/dL y 130 mg/dL, los cuáles son valores intermedios en el rango de concentraciones de H_2O_2 (9.4 - 377 mg/dL) estequiométricamente correspondiente al rango de glucosa de 50 - 200 mg/dL. Como solvente se usa una solución de PBS 1X (= 0.01 M), para que los iones de ésta funcionen como electrolito de soporte. Los parámetros de trabajo seleccionados fueron:

*Número de escalones de potencial: 1 *Voltaje de polarización: 0.7 V *Tiempo de polarización: 30 s

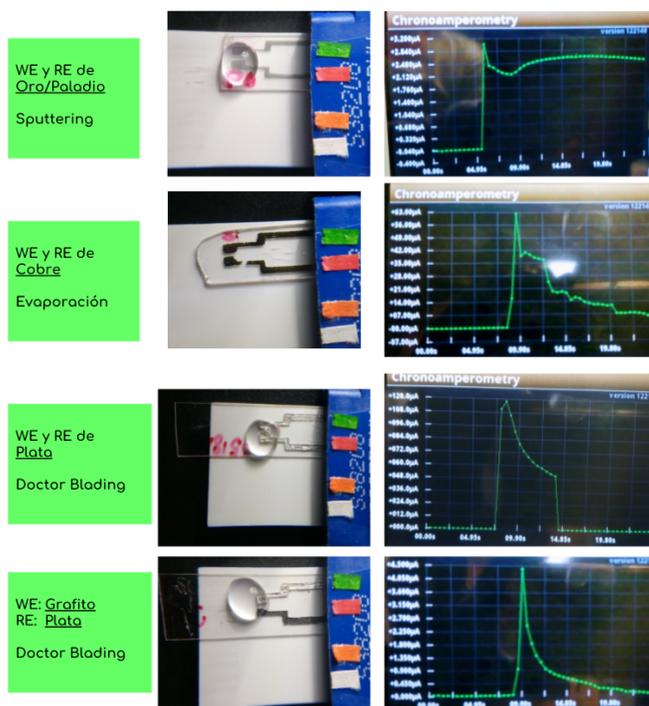


Figura 68. Ejemplos de pruebas de cronoamperetría con peróxido de hidrógeno

En la figura 68 se recopilan ejemplos representativos de la implementación de los electrodos en las pruebas electroquímicas y las gráficas obtenidas para cada tipo de arreglo.

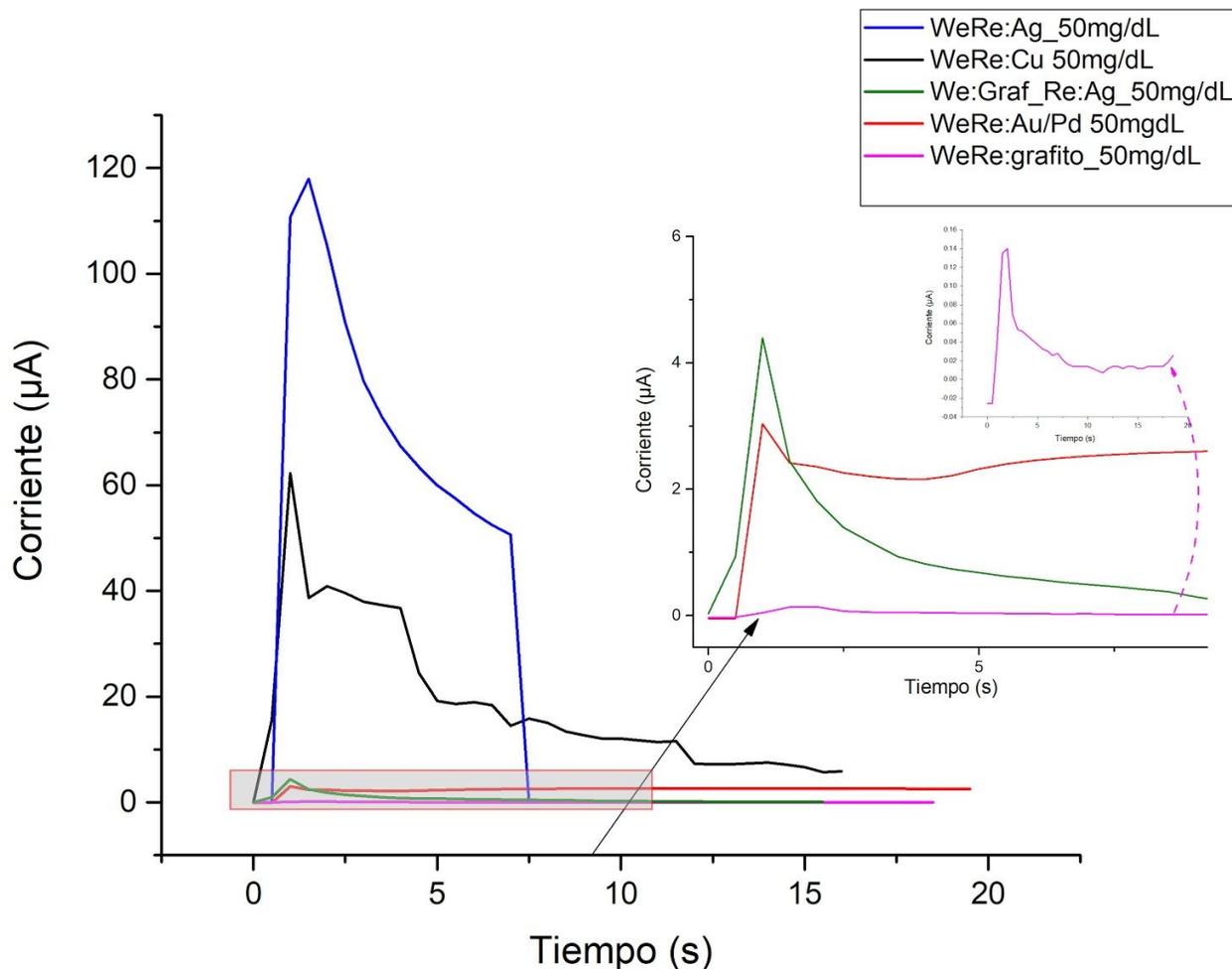


Figura 69. Gráficas de cronoamperometría a peróxido de hidrógeno para todos los arreglos probados.

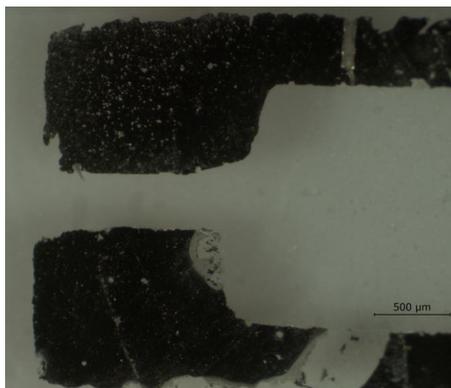


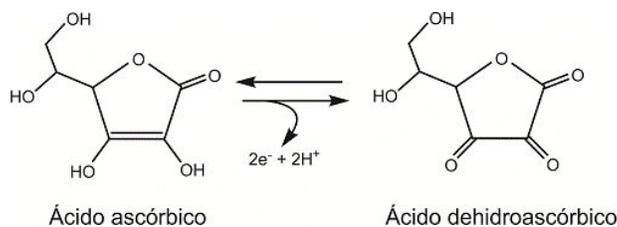
Figura 70. Microarreglo de electrodos de cobre/oro para amperometría, después de haberse implementado en una prueba electroquímica de amperometría a una solución de 100 mg/dL de H₂O₂. La pista que está desgastada (inferior) fungió como electrodo de trabajo, la marca corresponde al límite de la gota de la solución.

En la figura 69 se muestran todas las gráficas obtenidas de la cronoamperometría a una solución de peróxido de hidrógeno de 50 mg/dL. Se indican las diferentes combinaciones de materiales probadas. De esta gráfica se puede concluir lo siguiente:

- El arreglo con dos electrodos de tinta de plata es el que muestra mayor sensibilidad, esto es, para la misma concentración y volumen de analito, y virtualmente la misma área de contacto, detecta mayor carga ($I \cdot t$) que los demás.
- El cobre no es un buen material para hacer electrodos, al menos no para usar con H_2O_2 . Cuando funge como WE se destruye tras la reducción del H_2O_2 , como se observa en la figura 70. Esto puede contribuir a la irregularidad de la curva I vs t .
- El arreglo de dos electrodos de grafito es el que presenta menor sensibilidad, por lo que se debe usar en combinación con otro material que sea mejor conductor, como el oro o la plata.
- El arreglo WE de grafito y RE de plata es el que presenta un comportamiento más cercano al ideal, con un sólo pico detectado y una corriente que decae suavemente en el tiempo.
- En el arreglo de oro paladio la señal se está saturando, por lo que debe aumentarse el espesor del depósito.

Pruebas de funcionalidad con soluciones de ácido ascórbico a electrodos grafito-plata de protocolo “estandarizado”

El ácido ascórbico es una vitamina hidrosoluble necesaria para el crecimiento y desarrollo normales. [66] La concentración más alta de esta vitamina se encuentra en el cerebro, especialmente en la glándula pituitaria (400 mg / kg), y es importante en la síntesis del neurotransmisor dopamina y protegiendo al cerebro contra el estrés oxidativo. Es una señal importante cuando se trata del estudio de neurotransmisores. Se detecta induciendo una polarización al valor de su potencial de oxidación: 0.4 V. La reacción de oxidación del ácido ascórbico para producir ácido dehidroascórbico es:



La preparación de las soluciones se llevó a cabo en dos pasos puesto que las concentraciones eran muy bajas. Se prepararon soluciones de concentraciones 1 mM, 6 mM y 9 mM (valores cercanos a los usados en referencia [67], estudio con fines de detección en diagnóstico y química biomédica). Para cada concentración se cambió el arreglo de de electrodos por uno no usado. Los parámetros de trabajo seleccionados fueron:

*Número de escalones de potencial: 1 *Voltaje de polarización: 0.4 V *Tiempo de polarización: 30 s

En la figura 71 se muestra las señales para todas las concentraciones en un mismo gráfico. La variabilidad que se vio reflejada tanto en las caracterizaciones eléctrica y geométrica se observa también en la falta de proporcionalidad entre la relación corriente-concentración, en estas últimas pruebas (figura 71). Sin embargo, cualitativamente se puede observar que el comportamiento corriente vs tiempo ocurre como se espera (ver , tal como en la prueba de funcionalidad con peróxido de hidrógeno. Lo ideal sería hacer un ajuste de los datos a una curva I vs $(t^{1/2})^{-1}$.

Cronoamperometría solución Ácido Ascórbico Electrodos de Grafito-Plata por Doctor Blade

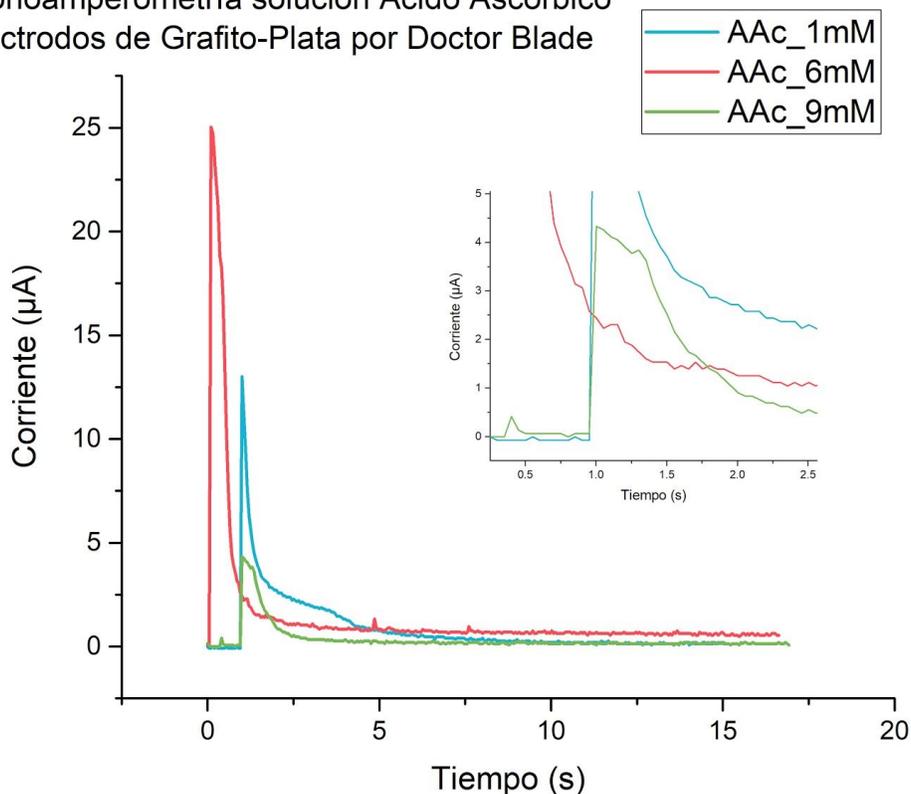


Figura 71. Pruebas de funcionalidad de arreglos fabricados de forma “estándar”, cronoamperometría a soluciones de ácido ascórbico. Se inserta un acercamiento a la región de la curva correspondiente a la concentración 9 mM.

6.1.2 Pruebas de voltametría cíclica

Se deseaba comprobar la funcionalidad de los arreglos de tres electrodos como celdas para aplicar técnicas voltamperométricas. Por su facilidad de aplicación e interpretación, en este caso se aplicaron rutinas de voltametría cíclica. Se hicieron pruebas con sulfato de cobre puesto que la reducción del ión Cu^{2+} es un proceso ya caracterizado bajo la técnica de voltametría cíclica[68], y es una sustancia fácil y segura de manipular. Se preparó una solución 2 mM de sulfato de cobre (CuSO_4) en una solución 0.2 M de cloruro de potasio (KCl) como electrolito de soporte.

Para las pruebas de voltametría cíclica, primero se hacen las conexiones pertinentes (figura 72), lo que es importante es identificar en cuál diente está cada electrodo, para conectar de forma correcta en los cables del SMU. A continuación, se inicia el script “Cyclic voltammetry” en la unidad SMU. Se seleccionan los parámetros deseados, en este caso fueron:

- Ventana de potencial: -800 mV a 650 mV
 - Número de vértices: 3
 - Potencial de los vértices: -800 mV, 650 mV, -800 mV
- Voltaje de referencia: Eref que significa relativo al potencial del electrodo de referencia
- Velocidad de escaneo: 100 mV/s
- Número de ciclos: 2

Finalizado el número de barridos seleccionado, se seca la superficie y se guardan los datos (tiempo, voltaje, corriente).

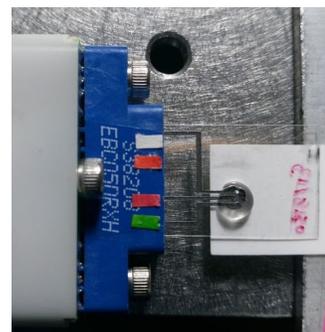


Figura 72. Conexiones a realizarse para hacer pruebas con celdas de tres electrodos. WE=rojo, RE=verde, CE=blanco. Derecha: Se muestra arreglo de tres electrodos de grafito.

En la figura 73 se muestra un voltamograma obtenido con un arreglo de tres electrodos de grafito (figura 72, derecha) de tras las pruebas de voltametría cíclica. Se compara con un resultado mostrado en la literatura. Se marcan del mismo color los picos de corriente que podrían corresponder al mismo proceso de oxidación o reducción. Se puede decir que los arreglos fabricados son aptos para aplicarse en técnicas voltamétricas como la voltametría cíclica, lo que sigue es una revisión de la reproducibilidad y de las propiedades de las curvas según lo esperado.

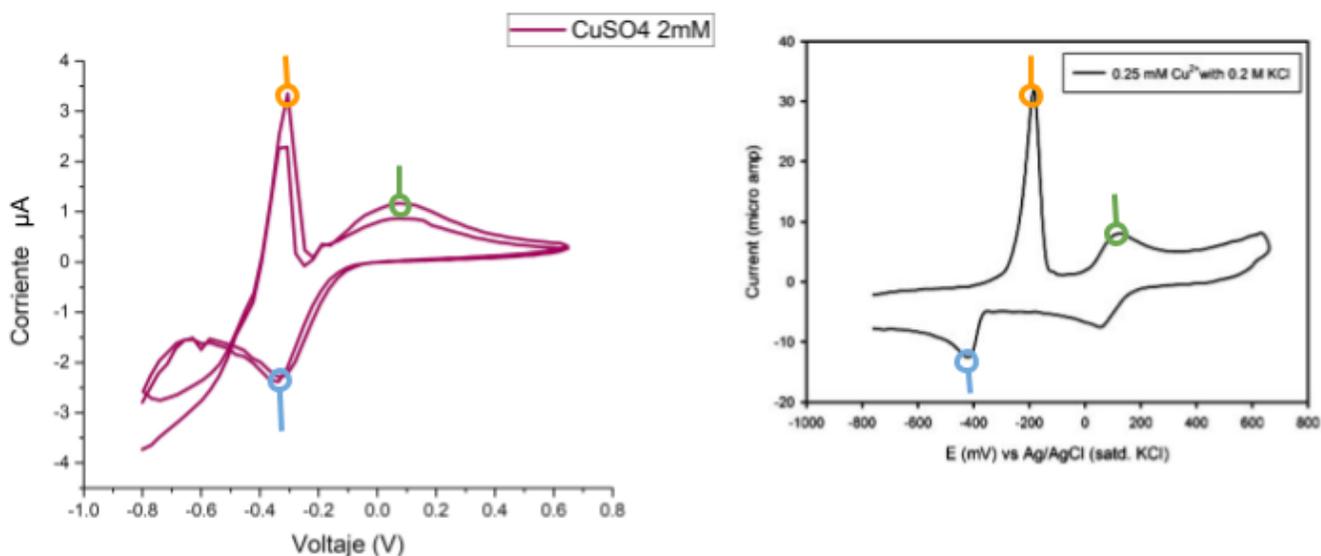


Figura 73. Izquierda: Resultado experimental de prueba de voltametría cíclica con arreglo de electrodos de grafito. Derecha: Resultado de la referencia [69], obtenido usando electrodos de carbono vítreo y electrodo de referencia comercial.

En pruebas futuras de funcionalidad de los arreglos de electrodos se debe utilizar una sustancia cuyo comportamiento sea más conocido, como es el hexacianoferrato de potasio. Generalmente, las pruebas de voltametría cíclica con este compuesto son las más comunes para estudiar el buen funcionamiento de un arreglo de electrodos, porque se sabe que este sistema exhibe un comportamiento redox reversible casi ideal, lo que permite distinguir los efectos causados por los electrodos de la respuesta del par redox. La corriente de este proceso obedece la ecuación Randles-Sevcik: $i_p = (2.68 \times 10^{-5}) n^{3/2} A C (D\nu)^{1/2}$ donde i_p es la corriente pico en amperios, n es el número de electrones transferidos en la reacción, A es el área del electrodo en m^2 , C es la concentración del analito en mol/L, D es el coeficiente de difusión en m^2/s , y ν es la velocidad de escaneo en V/s.[42] Entonces, se hacen escaneos a diferentes velocidades y se hacen calibraciones entre el valor de la corriente pico y $\nu^{1/2}$. Si resulta una recta es que el electrodo trabaja como se espera.

6.2 Pruebas de sensibilización y validación con sustancias de interés: glucosa

Se probó un método para inmovilizar glucosa oxidasa en la tinta de grafito del *Protocolo 3*. Esto, con la finalidad de adentrarnos en el área de sensibilización de los electrodos, para aumentar su respuesta específica a sustancias de mayor interés biomédico, como se menciona en los objetivos iniciales. El procedimiento tiene como antecedentes la fabricación de electrodos para detectar glucosa que se hacía con la pasta Lasercon. En tal protocolo se logró, con una mezcla en proporción 10:1 de la pasta de lasercon : glucosa oxidasa, hacer una curva de calibración corriente vs concentración de glucosa (figura 74).

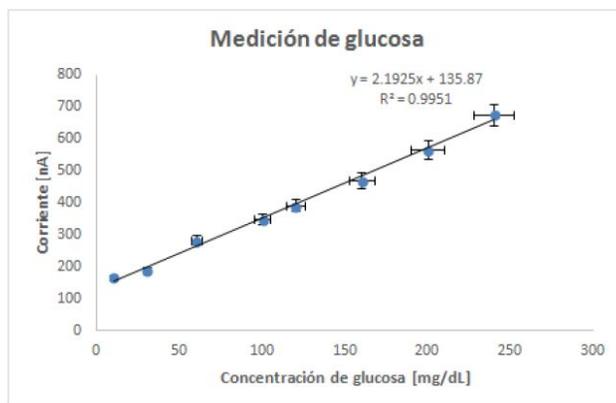


Figura 74. Mediciones de glucosa con WE de pasta LaserCon sensibilizada con GOX. Tomado de [70]

6.2.1 Cronoamperometría a solución de glucosa

En este experimento se logró una mezcla de “tinta de grafito ahulada” con glucosa oxidasa en proporción 15:1 en masa. Para fabricar las pistas de grafito/glucosa oxidasa (GOX), se siguieron los mismos que para las pistas de grafito, sin embargo, se descubrió más difícil fabricar pistas de grafito con esta tinta sensibilizada puesto que se seca más rápido al contener una proporción menor de solvente. Como analito se utilizó una solución de glucosa de 200 mg/dL y pH=7.4 preparada previamente. Se implementó la técnica de cronoamperometría con un voltaje de polarización de 0.7 V. Se muestra en la figura 75 un ejemplo de las gráficas I vs t obtenidas.

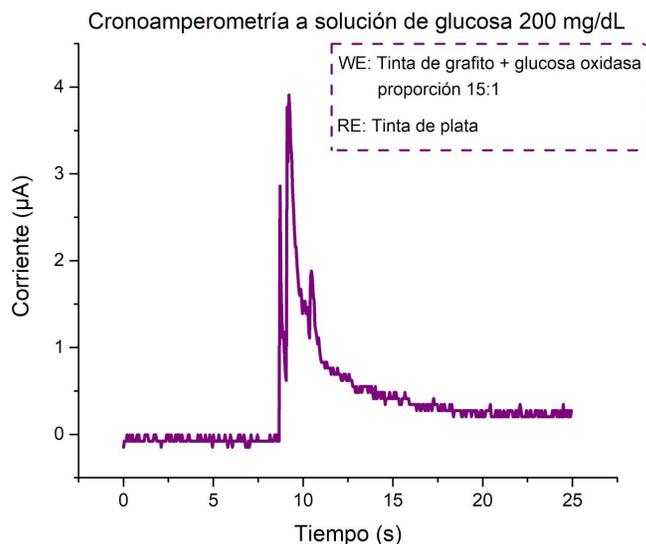


Figura 75. Ejemplo de detección de glucosa con electrodo de grafito sensibilizado con glucosa oxidasa (GOX).

Se logró detectar glucosa utilizando los electrodos de grafito-glucosa oxidasa, pero la sensibilidad de nuestros electrodos está todavía muy lejos de la de los electrodos comerciales, por ejemplo, con las tiras reactivas FreeStyle Lite se detecta un pico de corriente de alrededor de 140 μA para soluciones de 200 mg/dL, mientras que en este caso el valor máximo estuvo por debajo de los 4 μA . Comparando con el funcionamiento de este mismo tipo de arreglo (grafito-plata) se pueden destacar dos puntos. El primero es que la forma de la curva resultante del arreglo sensibilizado es más irregular, lo que es un indicio de que se debe mejorar la homogenización de la pasta grafito-GOX. El segundo punto es que el valor de la corriente pico obtenida no es un valor tan distante de lo que se obtuvo al reducir directamente peróxido de hidrógeno, por ejemplo, para la reducción de una solución de H_2O_2 50 mg/dL se obtuvo un pico de corriente de 4.4 μA .

Ya presentada las pruebas electroquímicas representativas realizadas, es importante mencionar que muchos de los parámetros y metodologías de experimentación y medición se pueden mejorar, por ejemplo, aumentar la velocidad de adquisición de datos, o buscar la manera de aislar las zonas de los electrodos que no deben entrar en contacto con la solución del analito. Para esto último se propone un método que se describe en el anexo A4.

Como extra, se realizaron calibraciones carga detectada vs concentración de glucosa utilizando electrodos comerciales. Esto, con varios fines:

Primero, para comparar la sensibilidad de nuestros electrodos con los comerciales

- Segundo, para validar el funcionamiento de un potencióstato “de bajo costo”, que es producto de otro proyecto del laboratorio (sección 7.2.2.1). Este potencióstato se desea integrar en un futuro como instrumento de medición principal en este proyecto de biosensores electroquímicos.
- Tercero, entender el proceso a ejecutar para generar una ecuación de calibración y establecer la comunicación entre la reacción química y la electrónica.
- Cuarto, hacer una prueba de concepto de integración de los electrodos planares a plataformas microfluídicas de PMMA como tiras insertables

Además, se implementó un circuito de potencióstato casero para comprobar la calidad de la calibración con las tiras comerciales. El buen funcionamiento de este circuito es un pilar para que este proyecto pueda cumplir con los requisitos de portabilidad y bajo costo de los dispositivos que se esperan aplicar en el área de diagnóstico PoC. Estas pruebas se detallan en el anexo A5.

Capítulo 7. Conclusiones y trabajo a futuro

En este trabajo se presentó la planeación e implementación de cuatro métodos de fabricación de arreglos de electrodos planares miniaturizados. Estos métodos se basan en las técnicas de estructuración de películas delgadas “grabado” y “lift-off”, y de película gruesa “screen-printing”. Los arreglos fabricados fueron evaluados como electrodos de celda para aplicar las técnicas de cronoamperometría y voltametría cíclica. Por los resultados de estas pruebas se descartaron algunos materiales y se optó por someter a estandarización sólo un protocolo de fabricación. Los arreglos resultantes de esta estandarización se sometieron a procesos de caracterización geométrica (perfilometría) y eléctrica (espectroscopía de impedancias) para evaluar la reproducibilidad.

En el primer método (“Protocolo 1. Electrodos por grabado de cobre”) se lograron generar grabados en cobre sobre baquelita con anchos de hasta $20\ \mu\text{m}$ (figura 43), sin embargo, en ninguna de éstas se logró resolver el arreglo de tres electrodos. Posteriormente en otras pruebas en las que se diseñaron electrodos de mayor tamaño, sí se logró resolver cada uno de los tres electrodos, se obtuvo una resolución máxima de aproximadamente $175\ \mu\text{m}$ (figura 45). La falta de resolución en los diseños más pequeños es atribuida a la presencia de fuerzas de tensión superficial entre las pistas de Loctite contiguas. Dicho fenómeno restringe la penetración de la solución de cloruro férrico en tales zonas. Para solucionarlo, se sugiere agregar sustancias tensoactivas o se aplique un movimiento de sonicación durante el ataque químico. Con este resultado se validó el método de fabricación con un material de bajo costo como el cobre, sin embargo, este no es un material adecuado para la fabricación de electrodos debido a su bajo potencial de oxidación. Por tales motivos no se realizaron las pruebas de funcionalidad, además de por la falta de estructuras definidas. El siguiente paso para este procedimiento es su implementación para la fabricación de arreglos de alta resolución de oro y plata. La transferencia de la técnica a estos materiales, u otros, se prevé sencilla una vez que se promueva la adhesión entre oro y plata y los sustratos orgánicos o de base de silicio.

Con el segundo método presentado (“Protocolo 2. Electrodos por sputtering o evaporación”) se logró fabricar electrodos de película delgada de oro, oro/paladio y cobre, sobre sustratos de PET y PS. Aunque la resolución lograda con este protocolo queda determinada por la resolución del plotter de corte ($\sim 165\ \mu\text{m}$), se fabricaron arreglos con electrodos rectangulares de $1\text{mm} \times 1.4\text{mm}$, debido a que las estructuras fabricadas presentaron imperfecciones en los bordes de tamaño comparable a tal resolución, debido a efectos de delaminación. De las pruebas de funcionalidad, se encontró que los electrodos de oro/paladio no mostraron el comportamiento esperado de la corriente en función del tiempo, lo que se atribuye a que la película era muy delgada (aproximadamente $15\ \text{nm}$) y por lo tanto la señal se veía saturada. Las pruebas con los electrodos de cobre fabricados por evaporación confirmaron que éste no es un material útil para fabricar electrodos, al observarse el desprendimiento del electrodo de trabajo al momento de ocurrir la reacción con el peróxido de hidrógeno. Una posible optimización de este protocolo es aumentar el espesor de los depósitos de películas metálicas mediante sputtering y promover la adhesión de éstos al sustrato mediante la limpieza y funcionalización de las superficies con grupos tiol, como el que se usó para promover la adhesión de la película de oro al PDMS.

Con el método 3 (“Protocolo 3. Electrodos por Doctor Blading”) se lograron fabricar arreglos de dos y tres electrodos con tintas de grafito y plata. Por las mismas razones que antes, aunque la resolución depende de la máscara, se diseñaron electrodos rectangulares de $1\ \text{mm} \times 1.4\ \text{mm}$. En este caso, los defectos de borde eran grumos de tinta generados al desprender la máscara. De las pruebas de cronoamperometría, resultó que la combinación electrodo de trabajo de grafito/electrodo de pseudoreferencia de plata mostraba el

comportamiento $I(t)$ más cercano al ideal de entre todos los arreglos. Por lo tanto, se decidió continuar trabajando más en este protocolo, para lograr su estandarización. Se mejoró la definición de los bordes de las pistas y se disminuyó la rugosidad de las superficies de grafito y plata. Varios arreglos resultantes se caracterizaron por perfilometría y por espectroscopía de impedancia. De la perfilometría resultó que la fabricación de los electrodos de plata (espesor promedio: 18.9 μm , desviación estándar: 2.47%) es más reproducible que la de los electrodos de grafito (espesor promedio: 41.3 μm , desv.est.: 19.18%). Finalmente, se aplicaron estos arreglos en otras pruebas electroquímicas. Se comprobó la funcionalidad de un celda de tres electrodos de grafito para aplicar la técnica de voltametría cíclica con sulfato de cobre. Finalmente, se logró inmovilizar glucosa oxidasa en los electrodos de grafito y se probó su viabilidad para la detección de glucosa por cronoamperometría a una solución de 200 mg/dL. Como mejora al protocolo, se sugiere que en un futuro se fabrique cada tipo de electrodo (grafito o plata) por separado para posteriormente ensamblarse de forma coplanar en un mismo sustrato. Además, se sugiere sustituir la cinta invisible por vinilo que se adhiera por estática, para que el desprendimiento del stencil sea más fácil y se disminuya el tiempo de manufactura.

Con el método 4 (“Protocolo 4. Electrodos de superficie estructurada”), se lograron fabricar arreglos de dos y tres electrodos de superficie de oro estructurada sobre sustratos de poliestireno y sobre sustratos flexibles de PDMS. Se pudo observar que con este protocolo se logran bordes más suaves que los que se obtienen con el “Protocolo 2. Electrodos por sputtering o evaporación” y el “Protocolo 3. Electrodos por Doctor Blading”, debido a que el proceso de encogimiento disminuye el tamaño de los defectos. Las dimensiones mínimas impuestas fueron de 1 mm x 1.4 mm en la zona de reacción, pero se prevé fácil crear estructuras de tamaños menores (cientos de micrómetros) debido al factor de encogimiento de 2.5. Se lograron superficies uniformes tanto en el PS como en el PDMS, es decir, en las que no hay discontinuidades y con microarrugas del mismo tamaño a lo largo de toda el área. Se espera que la presencia de tales estructuras propicie que este tipo de electrodos presenten mayor sensibilidad que los arreglos fabricados con el resto de los protocolos. En el proceso de estandarización a que se debe someter este protocolo, se debe poner atención en el paso de la remoción del poliestireno gelificado, para evitar desprendimientos de la película ya adherida al PDMS.

El “Protocolo 1. Electrodos por grabado de cobre” es el que tiene mayor resolución, sin embargo, el problema de la adhesión de nuevos materiales como oro y plata a los sustratos, puede ser desafiante para su aplicación futura. El “Protocolo 2. Electrodos por sputtering o evaporación” es el que conlleva menos tiempo, sin embargo, la resolución, limitada por el corte de las máscaras, no se puede mejorar de un modo equivalente simple. El “Protocolo 3. Electrodos por Doctor Blading” es el de menor costo y el más accesible de transferirse a otros laboratorios no especializados en microfabricación, sin embargo, el que se realice de modo tan manual y dependiente del usuario disminuye la posibilidad de tener resultados repetibles. Se prevé que el protocolo 4 dé los mejores resultados de resolución, sensibilidad y reproducibilidad, pero esto se ve demeritado por el largo tiempo que conlleva el proceso.

Como trabajo a futuro, se debe trabajar en la estandarización de los protocolos 1, 2 y 4, y se debe validar su funcionalidad usando sustancias cuyo comportamiento sea mejor conocido, como el hexacianoferrato de potasio. Se debe encontrar la mejor forma, química o física, de inmovilizar los elementos de bioreconocimiento, para que entonces, se puedan tener realmente biosensores electroquímicos. Finalmente, se deberán adaptar los diseños tanto de los arreglos de electrodos, como de las plataformas microfluídicas (fabricadas actualmente en PMMA y PDMS) para crear los dispositivos tipo Lab on a Chip que integren ambas funciones.

Anexos

A1 Métodos potenciométricos, conductimétricos y otros

En esta sección se presentan brevemente otros métodos electroanalíticos, que aunque no se implementen en el presente trabajo, son ampliamente usados como métodos de transducción en los biosensores electroquímicos, como en los ejemplos mencionados.

Potenciometría

En los dispositivos potenciométricos se mide la acumulación de cargas en el electrodo de trabajo o indicador, y por tanto una diferencia de potencial respecto al electrodo de referencia, en una celda en la que no circula la corriente. Se pueden distinguir dos tipos de electrodos indicadores: metálicos y de membrana. Los metálicos se han usado para detectar haluros, aniones pseudohaluro, anión Y^{4-} del EDTA, calcio, Ce (III), Ce(IV), etc. En la actualidad, es más usual que el método se combine con el uso de *electrodos selectivos de iones* (ISE por su nombre en inglés), como los de membrana. Éstos tienen límites de detección en el rango de 10^{-8} a 10^{-11} M. Se han usado para detectar F^- , S^{2-} , Ag^+ , Na^+ , H^+ , Ca^{2+} , NO_3^- , etc. La relación entre la concentración y el potencial está dada por la ecuación de Nernst para el potencial de celda o fuerza electromotriz:

$$EMF = E_{celda} = E^{\circ}_{celda} - \frac{RT}{nF} \ln Q \quad \dots Ec. 21$$

donde Q es la razón de la concentración de iones en el ánodo contra la concentración en el cátodo. La determinación directa de la concentración del analito a partir de la ecuación de Nernst se conoce como *potenciometría directa*. Un ejemplo importante de *biosensor potenciométrico* es el de Shishkanova et al., cuyo principio de detección se basa en el proceso de hibridación de oligonucleótidos monocatenarios en la vecindad de una membrana de PVC, que induce una redistribución medible de la concentración de los iones en la región intermolecular. [17]

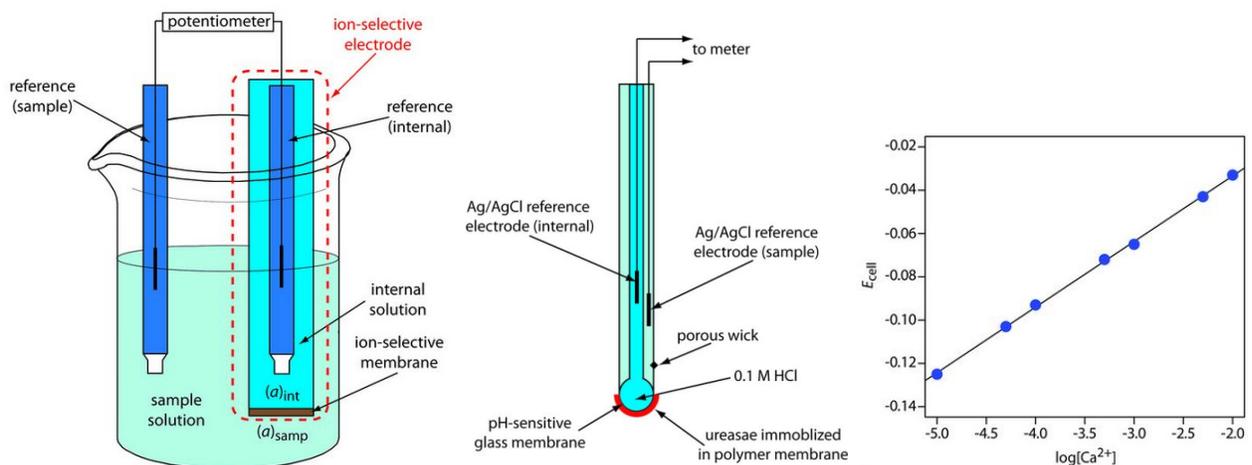


Figura 76. a) Esquema mostrando una típica celda potenciométrica con un electrodo selectivo de iones. b) Esquema de un biosensor potenciométrico basado en enzimas, para la medición de urea. c) Ejemplo de una curva de calibración E_{celda} vs $\log[A]$ en un ensayo potenciométrico. Tomado de [71]

Conductimetría

Los dispositivos conductimétricos miden la capacidad de un analito o un medio, de conducir la corriente eléctrica entre dos electrodos o nodos de referencia. Éstos se han asociado a los casos en los que la fuerza

iónica, y por tanto, la conductividad de la solución entre dos electrodos cambia como resultado de una reacción enzimática. En las muestras clínicas se tiene una alta concentración intrínseca de iones, y a su vez la necesidad de medir cambios muy pequeños de conductividad. Por esto, la aplicación de los dispositivos conductimétricos se ha visto limitada en este campo.

Aunque la implementación de los sensores conductimétricos no ha sido extensiva, existen algunos ejemplos de éxito, como la detección de drogas en la orina humana, y la detección de contaminantes en muestras ambientales. También se han inmovilizado células como elementos de bioreconocimiento, para análisis de toxicidad. Actualmente, existe un aumento en el interés por inmunosensores conductimétricos en los que se usan nanoestructuras, en particular nanoalambres.

Espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS)

Este método consiste en la aplicación de una señal de potencial variable, de forma sinusoidal, mientras se mide la corriente resultante. Para obtener un “espectro”, se varía la frecuencia f de la señal de voltaje en un rango de frecuencias, y se estudia el comportamiento de la impedancia compleja, que es la suma (vectorial) de las componentes real e imaginaria, que son la resistencia eléctrica y la reactancia (capacitiva o inductiva) respectivamente.

Los resultados que arroja la EIS son reflejo de las propiedades intrínsecas del material o de procesos específicos que pudiesen influenciar el sistema electroquímico. Así, se presenta como una herramienta útil en el desarrollo, análisis y caracterización de materiales para los biosensores y para las formas de transducción. Por otro lado, las técnicas de impedancia sirven para monitorear cambios en las propiedades eléctricas de un sustrato o electrodo, debido a eventos de bioreconocimiento. Por ejemplo, cambios en la conductancia debidos a la inmovilización de proteínas o a reacciones antígeno-anticuerpo. Otra aplicación interesante es la detección del estado de enlazamiento del ADN, por Hang et al., en ésta, inmovilizan ADN monocatenario (ssDNA), asociado a su vez a cationes, entre electrodos interdigitados; los cationes inicialmente permiten la conductividad iónica, pero tras la hibridación, con la cadena de ADN complementaria, se da una reducción en la densidad de los cationes, y por lo tanto un aumento en la impedancia.

Sensores FET

Un FET (Transistor de efecto de campo) es un tipo de transistor que usa el campo eléctrico para controlar la conductividad en un canal, es decir, una región de portadores de carga, entre dos electrodos (*fuelle* y *drenador*), en un material semiconductor. El control de la conductividad se logra al variar el campo eléctrico en un tercer electrodo (*puerta*), respecto a los otros dos. Dependiendo de las propiedades del material semiconductor, la presencia de un potencial suficientemente positivo, o negativo en el tercer electrodo, puede atraer o repeler a los portadores de carga (electrones o huecos) al canal de conducción, modificando las “dimensiones eléctricas” de dicho canal. Para su aplicación como biosensores, normalmente se reemplaza el electrodo metálico “puerta” por una superficie sensible a analitos bioquímicos (por ejemplo, membrana selectiva de iones, solución conductiva de iones, sustancias de bioreconocimiento inmovilizadas, etc.), la cual es puesta en contacto con la solución que contiene al analito.

Uno de los biosensores FET más populares es el que usa la inmovilización de enzimas en la superficie de dispositivos ISFET (FET selectivos de iones), creando así los EnFET. Los portadores de carga se acumulan en la superficie del electrodo “puerta” de forma proporcional a la concentración original de analito. Esto produce una corriente medible que a su vez se relaciona con la cantidad de portadores de carga. Los EnFET se han involucrado en el análisis de penicilina, glucosa y urea, pero es uno de los modos de biosensado con mayor crecimiento en la actualidad. [17]

A2 Anexo a Protocolo 3. Estudio de la influencia de un post-tratamiento de los electrodos (Aplicación de Presión y Temperatura)

Se sometió a algunos arreglos fabricados con este método a rutinas de presión y temperatura aplicadas con un equipo de litografía por nanoimpresión. Esto, para evaluar para evaluar si se lograba disminuir la rugosidad de los electrodos y aumentar la compacidad de las partículas conductoras en las pistas, disminuyendo así la resistencia.

Este equipo está diseñado para obtener réplicas en termoplásticos a partir de moldes rígidos. A diferencia de la técnica de *Hot embossing* en la que la presión se aplica mecánicamente con una especie de plancha, en este equipo se ocupa la tecnología *SoftPress*® en la que se inyecta aire a la presión de trabajo deseada, el cual deforma una membrana flexible y de alta temperatura de fusión llamada *Polyfoil*, conformando así el termoplástico debajo de esta membrana a las estructuras del molde. En la figura 77 se esquematiza cómo se usó el equipo NIL para aplicar presión y temperatura a los arreglos de plata y grafito sobre PET.

Se utilizaron recetas de presión y temperatura en el rango de **1 a 3 bar** de presión y **50 a 100°C**, respectivamente, por 60 s.

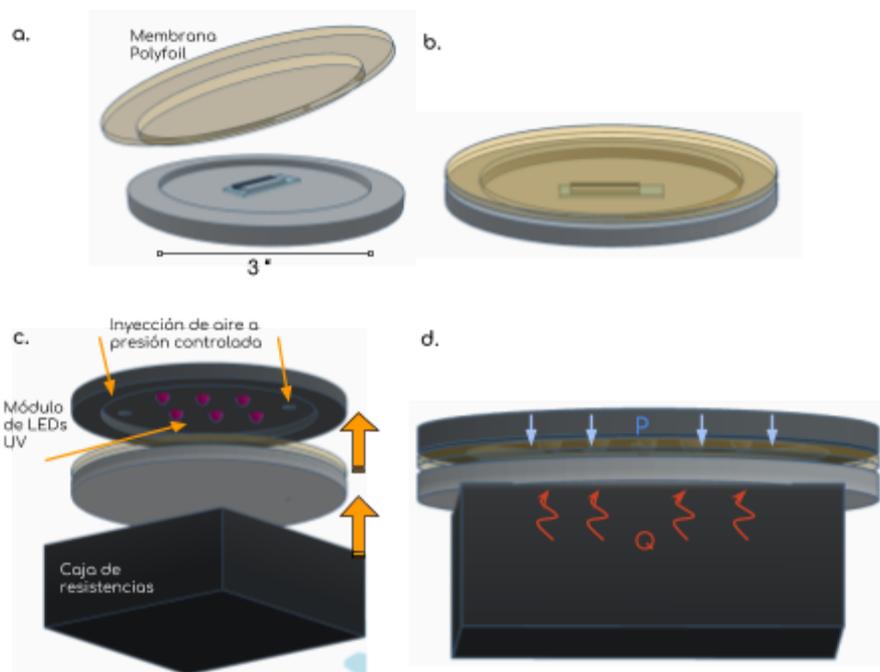


Figura 77. Proceso de aplicación de Ty P en NIL. a. El arreglo de electrodos en sustrato plástico se coloca sobre la plataforma de impresión del equipo NIL. b. Una membrana polyfoil que permite aplicar la técnica de Soft Press se coloca encima del arreglo. c. La base se alinea con los elementos de la zona de impresión. d. Los elementos se compactan y se implementan las recetas de presión y temperatura.

En la tabla 5 se muestran los resultados de estas pruebas. Con este proceso se esperaba disminuir la rugosidad de la superficie de los electrodos de grafito y de plata. Con los resultados de la simple observación óptica no es posible discutir acerca de los cambios en la rugosidad de la superficie. Se deben realizar análisis de perfilometría y observación en microscopio electrónico de barrido antes y después del tratamiento de presión y temperatura.

Tabla 5 Descripción de pruebas de aplicación de rutinas de presión y temperatura a arreglos secos de tinta de grafito y tinta de plata.

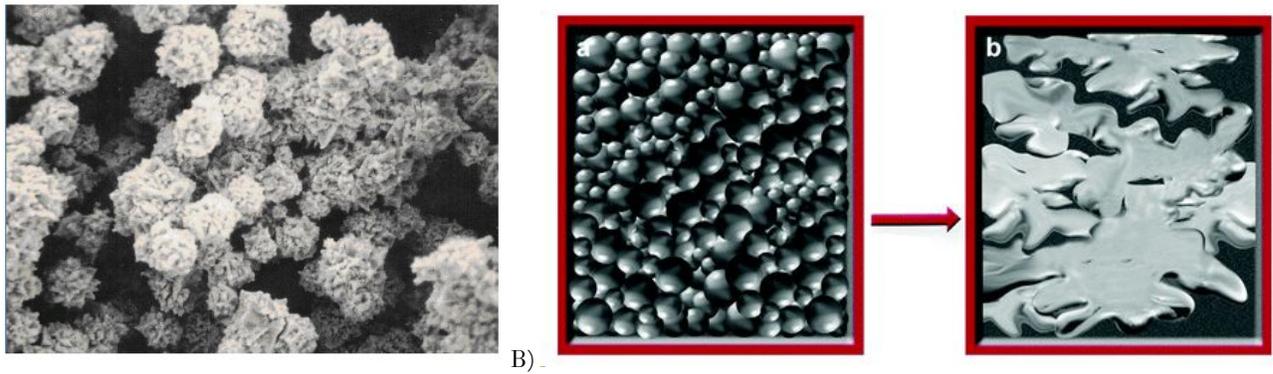
| Presión aplicada | Taplic. Tenfriam | tiempo | Resistencia antes de aplicar T,P | Resistencia después de aplicar T,P |
|------------------|------------------|--------|---|---|
| 1 bar | 80 °C | 60 s | $R_{Plata1} \approx 11.3 \Omega$ $R_{Plata2} \approx 12 \Omega$ | $R_{Plata1} \approx 2.9 \Omega$ $R_{Plata2} \approx 4.4 \Omega$ |
| | | | Aumento en el valor de la resistencia $R_{Plata1} \approx 74\%$ $R_{Plata2} \approx 63\%$ | |
| 2 bar | 100 °C - 30 °C | 60 s | $R_{Plata1} \approx 3.4 \text{ k}\Omega$ $R_{Plata2} \approx 19.7 \Omega$ | $R_{Plata1} \approx 18 \Omega$ $R_{Plata2} \approx 2.9 \Omega$ |
| | | | Aumento en el valor de la resistencia $R_{Plata1} \approx 95\%$ $R_{Plata2} \approx 85\%$ | |
| 2 bar | 100 °C - 30 °C | 60 s | $R_{Grafito1} \approx 38.7 \text{ k}\Omega$ $R_{Grafito2} \approx 40.6 \text{ k}\Omega$ | $R_{Grafito1} \approx 51.2 \text{ k}\Omega$ $R_{Grafito2} \approx 44.2 \text{ k}\Omega$ |
| | | | Disminución en el valor de la resistencia $R_{Grafito1} \approx 24\%$ $R_{Grafito2} \approx 8\%$ | |
| 2 bar | 100 °C - 30 °C | 60 s | $R_{Grafito} \approx 8.3 \text{ k}\Omega$ $R_{Plata} \approx 47.4 \Omega$ | $R_{Grafito} \approx 9.3 \text{ k}\Omega$ $R_{Plata} \approx 2.6 \Omega$ |
| | | | Disminución de $R_{Grafito} \approx 11\%$ | Aumento de $R_{Plata} \approx 95\%$ |

Se encontró que la presión y el aumento de temperatura sí tuvieron un efecto en las propiedades eléctricas de los arreglos conductivos. Se encontró que bajo las mismas condiciones de tratamiento físico:

- La resistencia de las pistas de plata **disminuyó** entre **63% y 95%**.
- La resistencia de las pistas de grafito **aumentó** entre **8% y 24%**.

Según reportes[64], éstas están formadas por partículas conductoras (“filler particles”), siendo las más comunes plata, níquel recubierto con plata, níquel o grafito, distribuidas aleatoriamente en una matriz de un material adhesivo como una resina epóxica. Cuando la pasta está curada, se forma una trayectoria para la conducción eléctrica a través del contacto partícula-partícula dentro del adhesivo[72]. Mencionan que una mayor proporción de las partículas conductoras resulta en una mayor conductividad de la pasta, pero también puede reducir la fuerza y calidad de la unión.

Una posible explicación de estos resultados es que en el caso de las pistas de plata, la presión uniforme y el aumento de temperatura están produciendo un efecto de sinterizado o coalescencia de las partículas dentro de la matriz polimérica (figura 78), aumentando la superficie conductora y por lo tanto disminuyendo la resistencia de la pista. [73] [74]



A) B) **Figura 78.** Mecanismo de tintas conductoras de plata. A) Microfotografía de partículas de plata en un compuesto de resina epóxica. [64] B) Esquema del proceso de sinterizado [74]

En el caso de las pistas de grafito, el mecanismo de formación de los caminos de conducción se basa en el alineamiento de las partículas en la dirección de depósito del compuesto partícula-matriz polimérica, esto es, que las trayectorias de conducción se forman por partículas de grafito en contacto físico entre sí. Es posible que al aplicar presión se esté causando el rompimiento de estas trayectorias alineadas o la fractura de las mismas partículas de grafito (figura 79). Por otro lado también puede ser que las condiciones estén afectando a la matriz polimérica de la tinta de grafito (que es diferente a la de plata) y se esté rompiendo la estructura que mantiene juntas a las partículas de grafito.

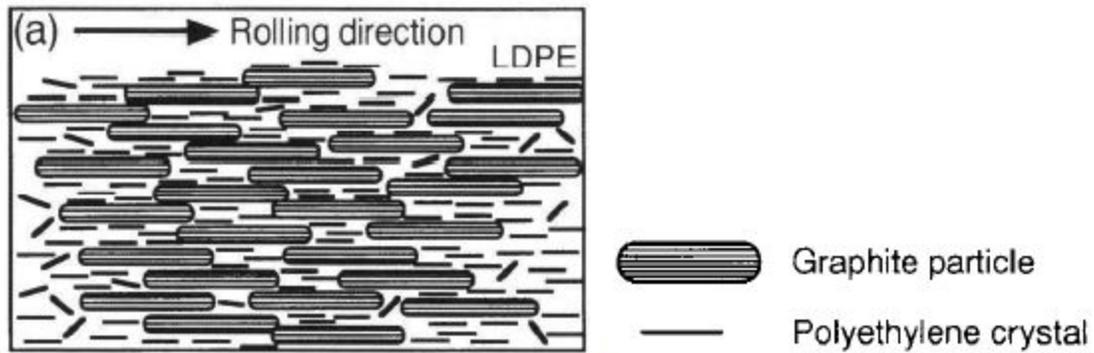
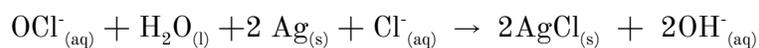


Figura 79. Formación de trayectorias de conducción en compuestos grafito-polímero.

A3 Inmovilización de cloruro de plata sobre electrodos de plata

En la implementación de las técnicas electroquímicas voltamétricas es necesario mantener fijo o controlado el valor de diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo y el de referencia. Para ello, el electrodo de referencia debe tener propiedades que hagan que su potencial de media celda no se vea afectado por los cambios en el analito en cuestión. Uno de los electrodos de referencia más comunes y más fáciles de construir es el electrodo de plata / cloruro de plata en solución saturada de KCl, cuyo valor de potencial estándar de reducción es de 0.22 V. El objetivo de este proceso fue fabricar electrodos de pseudoreferencia de Ag/AgCl con geometrías planares, a partir de arreglos de plata fabricados mediante las técnicas de Screen Printing y de Sputtering.

Este procedimiento se utiliza para hacer la sedimentación de AgCl en superficies de plata mediante la reacción entre hipoclorito de sodio (NaClO), nitrato de plata (AgNO₃) y plata sólida:



- Preparar 20 mL de una solución 0.75 M de NaOCl (hipoclorito de sodio/cloro de lavar) y 0.75 M de AgNO₃
- Verter la solución en un vaso de precipitados de 20 mL o en una nave para pesar
- Introducir parte de la pista de plata (toda menos el área de los pads) a la solución de NaClO/AgNO₃ por menos de 60 s
- Retirar los electrodos de la solución y escurrir en una kimwipe, soplar con aire comprimido

Se observó, como se esperaba, que los arreglos sometidos a la sedimentación cambiaron de un tono gris cromado a un tono más opaco y blanquecino, como se observa en la figura 80. Se debe hacer un análisis de rayos X y de IR para estudiar el cambio en los materiales y asegurar la presencia de partículas de cloruro de plata.

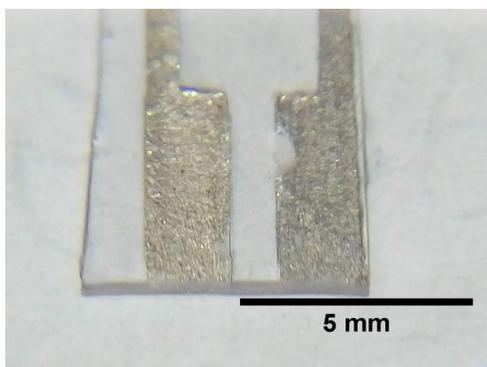


Figura 80. Prueba de concepto, se introdujo toda la pista derecha a la solución de hipoclorito y AgNO₃. Se observa el cambio de coloración a un tono grisáceo más opaco, respecto a la pista de la izquierda.

A4 Delimitando la zona de reacción

Como se describió en la sección 3.3.2 *Ventajas de los microelectrodos*, cuando se trabaja con microelectrodos, y se puede asegurar un estado de corriente estable, ésta dependerá solamente de la superficie reactiva del microelectrodo, y de la concentración del analito. Por lo tanto, es necesario encontrar un método para cubrir las pistas de los electrodos para que así no entren en contacto con el analito al momento de realizar la reacción, y de esta forma quede definida la zona de reacción y la zona de contacto eléctrico (pads).

Se probó con el proceso descrito a continuación:

- Limpiar la superficie de los electrodos soplando aire limpio con la pistola.
- Observando el proceso en el microscopio estereoscópico, adherir una tira de “cinta invisible” Scotch de tal manera que cubra solamente la zona de reacción, y ninguna sección de las pistas. Hacer lo mismo para cubrir los pads.
- Completar el stencil cuadrado colocando cinta en los otros dos extremos del arreglo.
- Colocar una línea de Loctite en uno de los lados del cuadrado, sobre la cinta invisible.
- Con una navaja plana esparcir el adhesivo a lo largo del cuadrado (técnica Doctor Blading), levantar el exceso de adhesivo que la navaja se debió llevar.
- Curar en lámpara UV Cross-linker CL-1000 L por 3 minutos.
- Retirar la cinta del sustrato, debe quedar definido un cuadro de Loctite 3525 sobre las pistas.

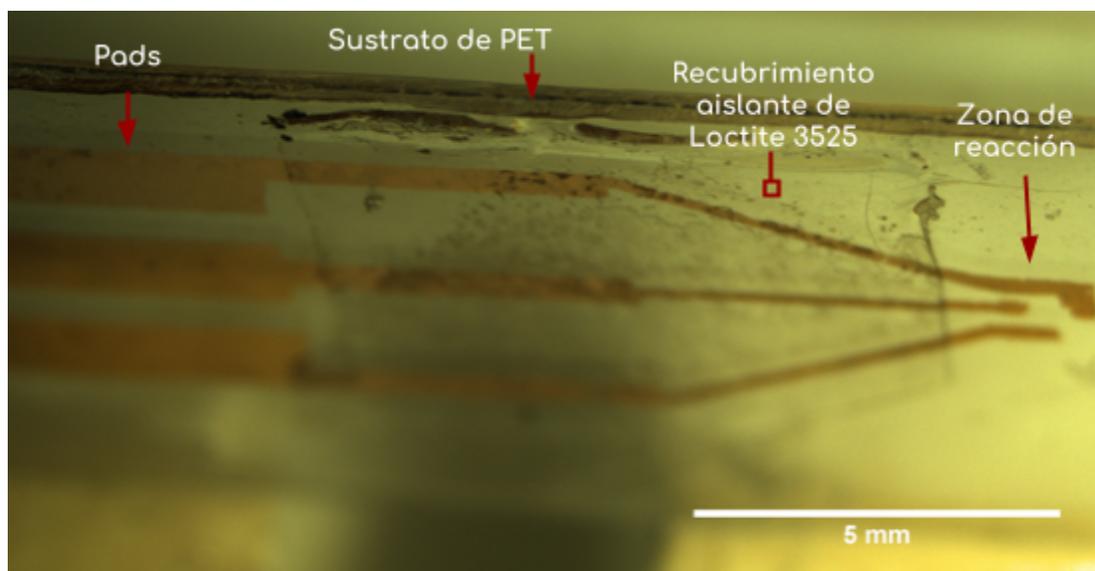


Figura 81. Perfil de un arreglo de cobre con recubrimiento aislante sobre las pistas.

A5 Calibración usando electrodos comerciales y aplicación de un circuito potencioestado casero.

Las pruebas de calibración se llevaron a cabo con las tiras comerciales para detección de glucosa FreeStyle Lite de la marca “FreeStyle”. Para hacer las mediciones para la calibración se ejecutaron los siguientes pasos:

- Se prepararon soluciones de glucosa con seis concentraciones diferentes: 50 mg/dL, 80 mg/dL, 110 mg/dL, 145 mg/dL, 170 mg/dL y 180 mg/dL.
- Se realizaron mediciones de cronoamperometría, introduciendo el analito a través de un canal microfluídico. Para las mediciones se siguieron los pasos descritos en la sección 7.1.1. Los parámetros de trabajo fueron: 1 step, 700 mV, 30 segundos, y una velocidad de medición de cada 50 ms (asegurar este parámetro, pues determina la resolución de la medición).
 - Se insertó la tira reactiva en un conector extraído de un glucómetro comercial.
 - Se insertó la zona de reacción de la tira dentro del chip de PMMA (figura 82)
 - Con una micropipeta, se agregó la solución de glucosa en cuestión en el “pozo de entrada”. Se pudo observar en la pantalla del SMU el momento en que el analito entra en contacto con los electrodos, como un pico de corriente que luego decae suavemente.
- Los chips tienen una tapa de cinta invisible, por lo que se adhirió una nueva antes de cada medición.

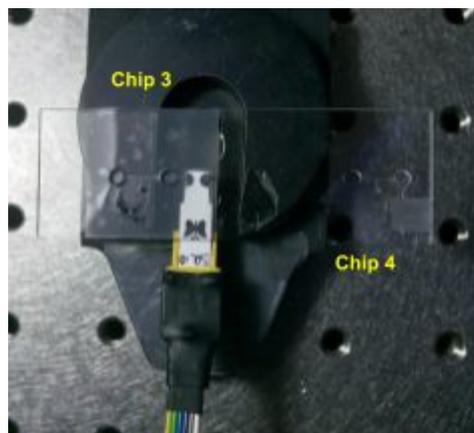


Figura 82. Tira para detección de glucosa dentro de chip de PMMA.

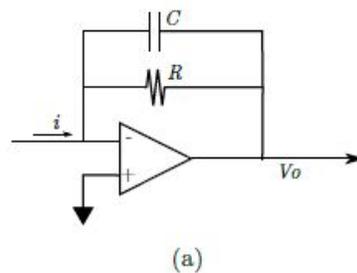


Figura 83. Circuito de transimpedancia

En la figura 84 a), se muestra un ejemplo representativo de las curvas corriente vs tiempo que obtuvieron. Para cada concentración de glucosa se realizaron 4 mediciones con tiras nuevas cada vez. Se calculó el área bajo la curva de todas las gráficas corriente vs tiempo, tomando un intervalo de 20s. Para cada concentración se calculó el área bajo la curva promedio y la respectiva desviación estándar. Con estos valores se construyó la gráfica mostrada en la figura 84 b). A estos datos se les aplicó una regresión lineal que resultó en la ecuación 22.

Ec. 22. Ecuación de la recta resultante

$$A_{bc}[C] = (1.85 \times 10^{-6}) \left[\frac{C \cdot dL}{mg} \right] C \left[\frac{mg}{dL} \right] + 1.15 \times 10^{-4} [C]$$

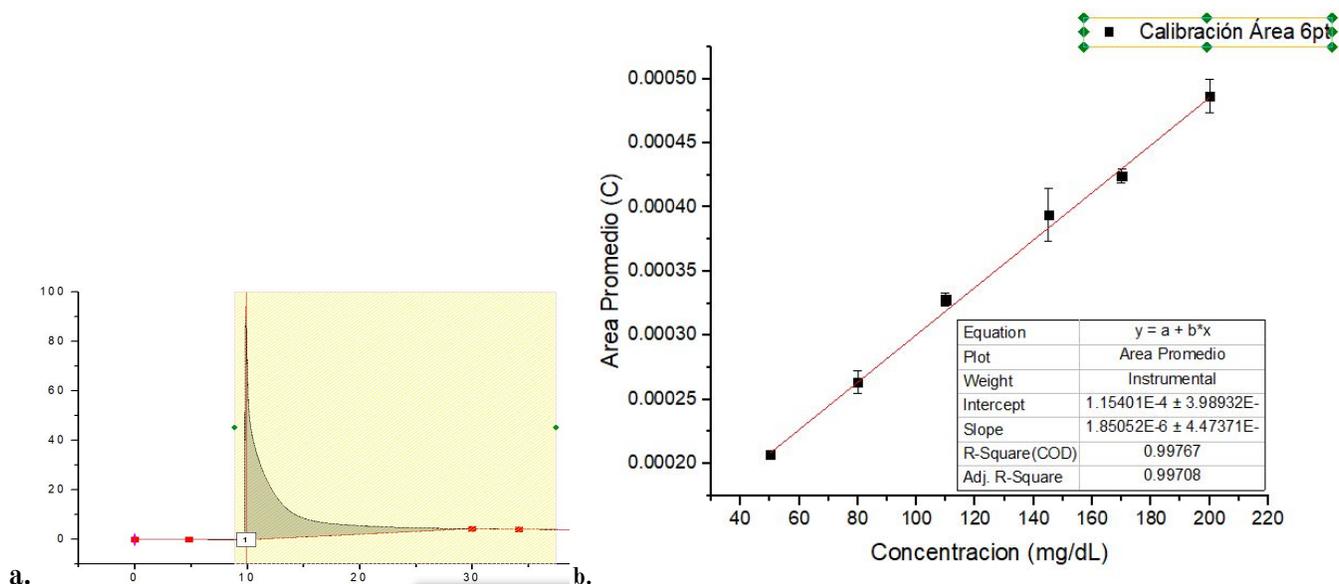


Figura 84.Izq. Ejemplo: Método de integración del área bajo la curva. Derecha: curva de calibración carga vs concentración.

El circuito potencioestado usado se puede dividir en dos, una parte que se encarga de polarizar los electrodos, en este caso con una señal de 0.7 V, y la otra parte que se encarga de convertir las señales de corriente a voltaje, este último se conoce como circuito de transimpedancia (figura 83). La señal de corriente viaja desde el electrodo de trabajo del sensor. Esta corriente se convierte en un valor de voltaje en el rango de 0 a 5 V, para que el valor pueda ser procesado por el microcontrolador. Dependiendo del rango de corrientes en que se esté trabajando, se determina el valor de la resistencia R del circuito, mejor conocida como *Ganancia*. En este caso se calculó que la ganancia debía tener un valor de 36 kΩ, por lo que se escogió colocar una resistencia de 33 kΩ en el circuito.

Así, en el microcontrolador cuando ocurre el pico de corriente, se van registrando valores de voltaje V_i cada cierto intervalo de tiempo Δt . Según la ecuación 22 se necesita calcular el área bajo la curva I vs t del proceso, para ello se aplica:

$$A_{bc}[C] = \frac{\Delta t}{R} \sum V_i \quad \dots \text{Ec. 23}$$

donde la suma se hace en un rango de 20 segundos, igual que como se calculó el área para la calibración. Finalmente, para determinar el valor de la concentración del analito en cuestión, el programa del microcontrolador realiza la operación en la ecuación 24 y despliega el valor calculado en una pantallita (figura 85).

$$C = \left[\frac{\Delta t}{R} \sum V_i - 1.15 \times 10^{-4} \right] / [1.85 \times 10^{-6}] \quad \dots \text{Ec. 24}$$

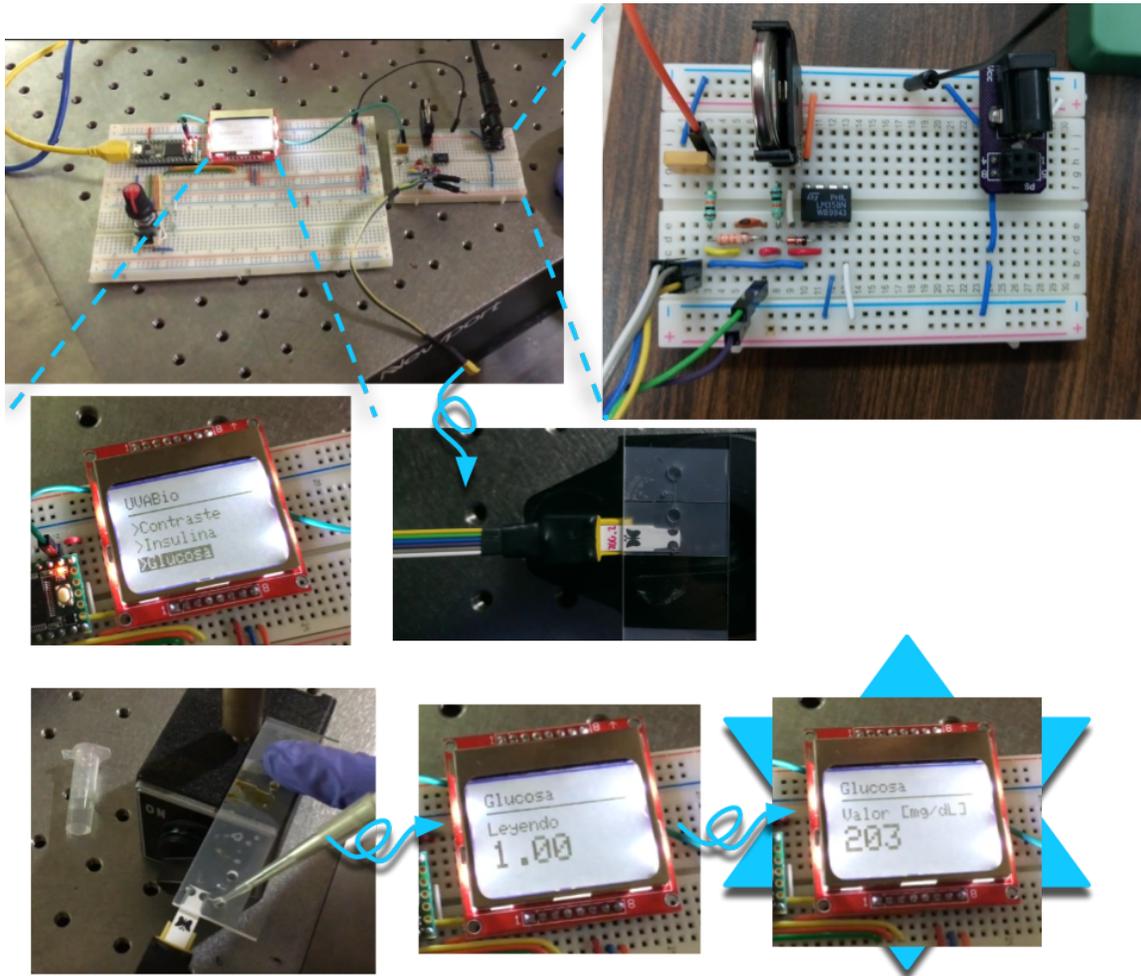


Figura 85. Validación del funcionamiento del potenciostato “de bajo costo”.

Bibliografía

1. Wu J, Dong M, Rigatto C, Liu Y, Lin F. Lab-on-chip technology for chronic disease diagnosis. *npj Digital Med.* 2018;1: 743.
2. Korhonen I, Parkka J, Van Gils M. Health monitoring in the home of the future. *IEEE Eng Med Biol Mag.* 2003;22: 66–73.
3. WHO | A guide to aid the selection of diagnostic tests. World Health Organization; 2017; doi:10.2471/BLT.16.187468
4. Chan CPY, Mak WC, Cheung KY, Sin KK, Yu CM, Rainer TH, et al. Evidence-based point-of-care diagnostics: current status and emerging technologies. *Annu Rev Anal Chem .* 2013;6: 191–211.
5. Lab on chip - CNR Nanotec. En: CNR Nanotec [Internet]. Consultado en: <http://nanotec.cnr.it/research-activities/nano-biotechnology/lab-on-chip/>
6. Abgrall P, Gué A-M. Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem—a review [Internet]. *Journal of Micromechanics and Microengineering.* 2007. pp. R15–R49. doi:10.1088/0960-1317/17/5/r01
7. Oh KW. Lab-on-chip (LOC) devices and microfluidics for biomedical applications. *MEMS for Biomedical Applications.* 2012. pp. 150–171.
8. Manz A, Graber N, Widmer HM. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. *Sens Actuators B Chem.* 1990;1: 244–248.
9. Dimaki M, Okkels F. Design and Simulation of Lab-on-a-Chip Devices. *Lab-on-a-Chip Devices and Micro-Total Analysis Systems.* 2014. pp. 27–51.
10. Ertl P, Sticker D, Charwat V, Kasper C, Lepperdinger G. Lab-on-a-chip technologies for stem cell analysis. *Trends Biotechnol.* 2014;32: 245–253.
11. Castillo-León J, Svendsen WE, editors. *Lab-on-a-Chip Devices and Micro-Total Analysis Systems.* Cham: Springer International Publishing; 2015.
12. Una revisión general sobre los micro y nano sensores y actuadores asi como su rol en los sistemas microfluidicos. En: Scribd [Internet]. Consultado en: <https://es.scribd.com/doc/61316953/Una-revision-general-sobre-los-micro-y-nano-sensores-y-actuadores-asi-como-su-rol-en-los-sistemas-microfluidicos>
13. Truckenmüller R, Rummel Z, Schaller T, Schomburg WK. Low-cost thermoforming of micro fluidic analysis chips. *J Micromech Microeng.* 2002;12: 375–379.
14. Sharma H, Nguyen D, Chen A, Lew V, Khine M. Unconventional low-cost fabrication and patterning techniques for point of care diagnostics. *Ann Biomed Eng.* 2011;39: 1313–1327.
15. Eduardo Torres Ramírez AMA. Biosensores enzimáticos [Internet]. Consultado en:

<http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art97/index.html>

16. Lowe CR. Biosensors. *Trends Biotechnol.* 1984;2: 59–65.
17. Grieshaber D, MacKenzie R, Vörös J, Reimhult E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors* . 2008;8: 1400–1458.
18. Abbott Point of Care | i-STAT System [Internet]. Consultado en: <https://www.pointofcare.abbott/int/en/home>
19. Bard AJ, Faulkner LR. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd Edition. Wiley Global Education; 2000.
20. Rackus DG, Shamsi MH, Wheeler AR. Electrochemistry, biosensors and microfluidics: a convergence of fields. *Chem Soc Rev.* 2015;44: 5320–5340.
21. Califano S. *Pathways to Modern Chemical Physics*. 2012.
22. Thévenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification | International Union of Pure and Applied Chemistry: Physical Chemistry Division, Commission I.7 (Biophysical Chemistry); Analytical Chemistry Division, Commission V.5 (Electroanalytical Chemistry).1. *Biosensors and Bioelectronics.* 2001;16: 121–131.
23. Faraday M. On electro-chemical decomposition [Internet]. 1833. doi:10.5479/sil.389422.mq591023
24. Libretexts. Standard Electrodes. En: *Chemistry LibreTexts* [Internet]. Libretexts; 2 Oct 2013. Consultado en: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Electrochemistry/Electrodes/Standard_Hydrogen_Electrode](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Electrochemistry/Electrodes/Standard_Hydrogen_Electrode)
25. Zhang S. Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. *Biosensors and Bioelectronics.* 2000;15: 273–282.
26. Wang Y, Xu H, Zhang J, Li G. Electrochemical Sensors for Clinic Analysis. *Sensors* . 2008;8: 2043–2081.
27. Skoog DA, James Holler F, Nieman TA. *Principios de análisis instrumental*. 2001.
28. Baeza A. *Sensores y Biosensores Electroquímicos*. UNAM; 2001.
29. Sánchez JLC. Realización de un Potenciostato. Salas XV, tutor. Ingeniería Técnica Industrial, Escola Tècnica Superior Enginyeria - Universitat Rovira i Virgili. 2004.
30. How do I convert my Potentiostat's 3 electrode setup into 2 electrode one? | Kanopy Techno Solutions [Internet]. Consultado en: <http://www.kanopytech.com/question/how-do-i-convert-my-potentiostats-3-electrode-setup-into-2-electrode-one/>
31. Libretexts. 11.4: Voltammetric Methods. En: *Chemistry LibreTexts* [Internet]. Libretexts; 25 Oct 2013 Consultado en: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.0_\(Harvey\)/11_Electrochemical_Methods/11.4%3A_Voltammetric_Methods](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.0_(Harvey)/11_Electrochemical_Methods/11.4%3A_Voltammetric_Methods)
32. *Cyclic Voltammetry; Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms*: David K. Gosser, Jr., VCH,

- New York, N. Y., 1993. XII+ 154 pp, \$65.00. Synth React Inorg Met-Org Nano-Met Chem. 1994;24: 1237–1238.
33. Fang A, Ng HT, Li SFY. A high-performance glucose biosensor based on monomolecular layer of glucose oxidase covalently immobilised on indium–tin oxide surface. *Biosensors and Bioelectronics*. 2003;19: 43–49.
 34. Sutton AP. *Electronic Structure of Materials*. Clarendon Press; 1993.
 35. Libretexts. Reference Electrodes. En: Chemistry LibreTexts [Internet]. Libretexts; 7 Feb 2017. Consultado en:
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Analytical_Sciences_Digital_Library/JASDL/Courseware/Analytical_Electrochemistry%3A_Potentiometry/03_Potentiometric_Theory/04_Reference_Electrodes](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Analytical_Sciences_Digital_Library/JASDL/Courseware/Analytical_Electrochemistry%3A_Potentiometry/03_Potentiometric_Theory/04_Reference_Electrodes)
 36. Askeland DR, Fulay PP, Wright WJ. *The Science and Engineering of Materials*, SI Edition. Cengage Learning; 2011.
 37. Conductive Inks FAQ | Applied Ink Solutions [Internet]. Consultado en:
<https://www.appliedinksolutions.com/faq/faq-conductive-inks.html>
 38. Saem S, Zhu Y, Luu H, Moran-Mirabal J. Bench-Top Fabrication of an All-PDMS Microfluidic Electrochemical Cell Sensor Integrating Micro/Nanostructured Electrodes. *Sensors* . 2017;17. doi:10.3390/s17040732
 39. El Harrad L, Bourais I, Mohammadi H, Amine A. Recent Advances in Electrochemical Biosensors Based on Enzyme Inhibition for Clinical and Pharmaceutical Applications. *Sensors* . 2018;18. doi:10.3390/s18010164
 40. Inzelt G, Lewenstam A, Scholz F. *Handbook of Reference Electrodes*. Springer Science & Business Media; 2013.
 41. Wolff A. Is there a preferred size ratio between electrodes in a 3-electrode system? En: ResearchGate [Internet]. 1 Feb 2005. Consultado en:
https://www.researchgate.net/post/Is_there_a_preferred_size_ratio_between_electrodes_in_a_3-electrode_system
 42. Dryden MDM, Rackus DDG, Shamsi MH, Wheeler AR. Integrated digital microfluidic platform for voltammetric analysis. *Anal Chem*. 2013;85: 8809–8816.
 43. ScienceDirect [Internet]. Consultado en:
<https://www.sciencedirect.com/topics/materials-science/lithography>
 44. Guckenberger DJ, de Groot TE, Wan AMD, Beebe DJ, Young EWK. Micromilling: a method for ultra-rapid prototyping of plastic microfluidic devices. *Lab Chip*. 2015;15: 2364–2378.
 45. Sánchez-Olvera R. Micrograbado láser por absorción en resinas fotosensibles. Hautefeuille M, tutor. Maestría en Ingeniería Eléctrica, Universidad Nacional Autónoma de México. 2018.
 46. LOCTITE AA 3525 [Internet]. Consultado en:
https://www.henkel-adhesives.com/fr/en/product/uv-adhesives-_light-cure-adhesives/loctite_aa_3525.html

47. Banerjee T. Lecture V Nanofabrication. 2015.
48. Evaporacion termica en vacio [Internet]. Consultado en:
http://www.icmm.csic.es/fis/espa/evaporacion_resistencia.html
49. López Aparicio J. Diseño, desarrollo e implementación de un biosensor de glucosa miniaturizado e integración en una plataforma de medición dual para la diabetes mellitus tipo II [Internet]. Hautefeuille M, tutor. PhD, UNAM. 2018. Consultado en:
<http://132.248.9.195/ptd2018/enero/0768882/Index.html>
50. Shrestha B, Profile V my C. Electrochemical series and its use to predict the feasibility of redox reactions [Internet]. Consultado en:
<https://chem-guide.blogspot.com/2010/04/electrochemical-series-and-its-use-to.html>
51. Bull SJ, Balk LJ. Adhesion and delamination of interfaces. *J Phys D Appl Phys*. IOP Publishing; 2010;44: 030301.
52. Batool R. What is the chemistry behind gold titanium and glass interaction ? En: ResearchGate [Internet]. 19 Jul 2012. Consultado en:
https://www.researchgate.net/post/What_is_the_chemistry_behind_gold_titanium_and_glass_interaction
53. Gold etchant, standard 651818. En: Sigma-Aldrich [Internet]. Consultado en:
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/651818>
54. Gabardo CM, Zhu Y, Soleymani L, Moran-Mirabal JM. Electrodes: Bench-Top Fabrication of Hierarchically Structured High-Surface-Area Electrodes (*Adv. Funct. Mater.* 24/2013). *Adv Funct Mater.* 2013;23: 3017–3017.
55. CircuitWorks Conductive Pen [Internet]. Consultado en:
<https://www.chemtronics.com/circuitworks-conductive-pen>
56. Perfilometría Mecánica | Telstar Instruments for Solutions [Internet]. Consultado en:
<https://www.telstar-instrumat.com/productos/metrologia%20de%20superficies/perfilometria%20mecanica.htm>
57. Stylus Profilometry - Nanoscience Instruments. En: Nanoscience Instruments [Internet]. Consultado en: <https://www.nanoscience.com/techniques/optical-profilometry/stylus/>
58. Adhesive Tapes, Single and Double Coated, Nonconductive [Internet]. Consultado en:
https://www.tedpella.com/tape_html/tape.htm
59. Barlag R, Nyasulu F, Starr R, Silverman J, Arthasery P, McMills L. A Student-Made Silver–Silver Chloride Reference Electrode for the General Chemistry Laboratory: ~10 min Preparation. *J Chem Educ.* 2014;91: 766–768.
60. Fried JR. *Polymer Science and Technology*. Pearson College Division; 2003.
61. Rhodes J. The Science of Shrinky Dinks. En: Smithsonian [Internet]. Consultado en:
<https://www.smithsonianmag.com/science-nature/the-science-of-shrinky-dinks-36715644/>
62. Jiménez Díaz E. Desarrollo de plataforma con microflujo para cultivo celular [Internet]. Hautefeuille M, tutor. Licenciatura en Física, UNAM. Consultado en:

<http://132.248.9.195/ptd2016/noviembre/0753193/Index.html>

63. Zhu Y, Moran-Mirabal J. Highly Bendable and Stretchable Electrodes Based on Micro/Nanostructured Gold Films for Flexible Sensors and Electronics. *Advanced Electronic Materials*. 2016;2: 1500345.
64. Website [Internet]. Consultado en: <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=6145>
65. Macdonald JR, Ross Macdonald J. Impedance spectroscopy. *Ann Biomed Eng*. 1992;20: 289–305.
66. Vitamina C: MedlinePlus enciclopedia médica [Internet]. Consultado en: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/002404.htm>
67. Yang B, Wang H, Du J, Fu Y, Yang P, Du Y. Direct electrodeposition of reduced graphene oxide on carbon fiber electrode for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 2014;456: 146–152.
68. Rana MS, Rahman MA, Alam AMS. A Cyclic Voltammetric Studies of Complexation of Copper (II) with Thymine Using Glassy Carbon Electrode in Aqueous Medium. *pak J Anal Environ Chem*. 2014;15.
69. Rana MS, Rahman MA, Shafiqul Alam AM. A CV Study of Copper Complexation with Guanine Using Glassy Carbon Electrode in Aqueous Medium. *ISRN Electrochemistry*. 2014;2014: 1–7.
70. Herrera Dominguez SJ. Elaboración y caracterización de microelectrodos para medir glucosa. Hautefeuille M, tutor. Licenciatura en Física, UNAM. 2017.
71. Libretexts. 11.2: Potentiometric Methods. En: *Chemistry LibreTexts* [Internet]. Libretexts; 25 Oct 2013 Consultado en: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.0_\(Harvey\)/11_Electrochemical_Methods/11.2%3A_Potentiometric_Methods](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.0_(Harvey)/11_Electrochemical_Methods/11.2%3A_Potentiometric_Methods)
72. Nagata K, Iwabuki H, Nigo H. Effect of particle size of graphites on electrical conductivity of graphite/polymer composite. *Compos Interfaces*. 1998;6: 483–495.
73. Hoeng F, Bras J, Gicquel E, Krosnicki G, Denneulin A. Inkjet printing of nanocellulose–silver ink onto nanocellulose coated cardboard. *RSC Adv*. 2017;7: 15372–15381.
74. Magdassi S, Grouchko M, Berezin O, Kamyshny A. Triggering the sintering of silver nanoparticles at room temperature. *ACS Nano*. 2010;4: 1943–1948.