



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

PLATAFORMA MICROFLUÍDICA PARA LA CARACTERIZACIÓN ELÉCTRICA
DE CÉLULAS BIOLÓGICAS

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

PRESENTA:
M. en I. ALMA DELHI DE LEÓN HERNÁNDEZ

TUTORA
DRA. CELIA ANGELINA SÁNCHEZ PÉREZ, INSTITUTO DE CIENCIAS APLICADAS Y
TECNOLOGÍA
COMITÉ TUTOR
DRA. HERLINDA MONTIEL SÁNCHEZ, INSTITUTO DE CIENCIAS APLICADAS Y
TECNOLOGÍA
DR. LUIS OLGUÍN CONTRERAS. FACULTAD DE QUÍMICA

NOVIEMBRE DE 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO

Presidente: Dr. García Valenzuela Augusto

Secretario: Dra. Ramón Gallegos Eva

1er. Vocal: Dra. Sánchez Pérez Celia Angelina

2do. Vocal: Dr. Qureshi Naser

3er. Vocal: Dr. Hernández Gallegos Miguel Ángel

Esta tesis se realizó en el Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT) de la UNAM en Ciudad Universitaria, Ciudad de México.

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Celia Angelina Sánchez Pérez

FIRMA

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de realizar un doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico durante los 4 años del doctorado.

A la Dra. Celia Sánchez por sus enseñanzas y apoyo, así como a la Dra. Herlinda Montiel Sánchez y el Dr. Luis Olguín Contreras por sus comentarios y aportaciones como parte del comité tutor.

A la Dra. Eva Ramón Gallegos por sus aportaciones y apoyo para mi formación dentro su curso Cultivo de Células, Tejidos y Órganos Animales del Instituto Politécnico Nacional.

A mi familia por su gran apoyo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	9
RESUMEN	10

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes	12
1.2 Planteamiento del problema	18
1.3 Hipótesis y objetivos	19

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Efecto de un campo eléctrico estático en materiales dieléctricos	21
2.2 Relación de un campo eléctrico armónico y la permitividad eléctrica compleja	22
2.3 Relajación dieléctrica	24
2.3.1 Propiedades de la membrana en la región de la dispersión α	26
2.3.2 Doble Capa Eléctrica (EDL)	27
2.3.3 Modelo Gouy-Chapman-Stern	28
2.3.4 Modelo Bockris-Devanathan-Muller	30
2.4 Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS)	31
2.5 Técnica de circuito eléctrico equivalente para el modelado de la EIS	33

CAPÍTULO III. INSTRUMENTACIÓN DE LA PLATAFORMA

3.1 Biorreactor.....	36
3.1.1 Sensor óptico para el monitoreo de pH	37
3.1.2 Control PID de temperatura	43
3.2 Celda para mediciones de EIS.....	46
3.3 Integración de la plataforma con el biorreactor y la celda EIS	47

CAPÍTULO IV. RESULTADOS DE MEDICIONES DE ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA (EIS)

4.1 Caracterización de la plataforma	48
--	----

4.2 Mediciones de EIS de suspensiones de fantasmas biológicos (partículas de PMMA) en suero fisiológico	49
4.3 Mediciones de EIS de suspensiones celulares en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado	54
CAPÍTULO V. MODELO PARA LA CAPACITANCIA EFECTIVA DE LA DOBLE CAPA ELÉCTRICA	
5.1 Circuito eléctrico equivalente para evaluar suspensiones de fantasmas biológicos y células.	58
5.2 Simulaciones numéricas.....	60
CAPÍTULO VI. ANÁLISIS DE RESULTADOS CON EL MODELO DE CAPACITANCIA EFECTIVA	
6.1 Análisis de las mediciones de EIS de suspensiones de fantasmas biológicos (partículas de PMMA) en suero fisiológico	64
6.1.1 Modelo paramétrico para partículas de PMMA.....	67
6.2 Análisis de las mediciones de EIS de suspensiones celulares en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado.....	69
6.2.1 Modelo paramétrico para células K-562	71
6.2.2 Ensayo de muerte en células K-562 mediante la alteración de pH	71
CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO	74
REFERENCIAS	78

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

Fig. 1. Dispersiones α , β y γ presentes en el espectro de permitividad eléctrica de medios biológicos	25
Fig. 2. Diagrama de la EDL que se forma en una superficie cargada según el modelo Gouy-Chapman-Stern	29
Fig. 3. Impedancia eléctrica de un circuito eléctrico representada en A) diagramas de Bode y B) diagrama de Nyquist	32
Fig. 4. Circuito eléctrico equivalente con a) modelo de Fricke (Damez et al., 2008) y b) modelo considerando la EDL por cada electrodo (L. Wang et al., 2020)	34
Fig. 5. Representación del circuito eléctrico Randles mediante a) elementos eléctricos (Laschuk et al., 2021) y su impedancia eléctrica en b) diagrama de Nyquist.....	35

CAPÍTULO III. INSTRUMENTACIÓN DE LA PLATAFORMA

Fig. 6. a) Esquema del biorreactor instrumentado para el monitoreo de pH (LED-fotodetector) y el control de temperatura (PDMS+grafito-LED plano), con un contenedor de PDMS y b) Fotografía del contenedor	37
Fig. 7. Instrumentación para la calibración del sensor óptico de pH representada en a) diagrama, b) esquema 3D e c) implementación experimental	38
Fig. 8. Espectro de transmitancia de muestras con diferentes pH con rojo fenol como indicador colorimétrico	40
Fig. 9. Curva de respuesta del pH en función del factor de transmitancia en la prueba de concepto	41
Fig. 10. Integración del monitoreo de pH mediante el led-sensor TCS3200 en el biorreactor a) abierto y b) cerrado	41
Fig. 11. Responsividad espectral relativa del sensor TCS3200 (Copyright 2009, TAOS Inc., 2009)	42
Fig. 12. Curva de calibración para el monitoreo de pH con el sensor TCS3200	43
Fig. 13. Delta de temperatura en bloques de PDMS de 1 cm ³ con diferentes concentraciones de grafito excitados con un led plano de luz blanca de 3W de potencia	44

Fig. 14. Contenedor de PDMS con base funcionalizada con grafito y LED plano como fuente de luz para generar el efecto fototérmico	44
Fig. 15. Temperatura del biorreactor controlada a 38°C mediante el efecto fototérmico	45
Fig. 16. a) Esquema y b) fotografía de la celda de PDMS para mediciones de EIS	46
Fig. 17. Celda para las mediciones de EIS integrada con la celda de PDMS, los electrodos y la PCB	46
Fig. 18. Esquema de la plataforma integrada por el biorreactor, la celda EIS, una bomba de infusión y una electroválvula	47

CAPÍTULO IV. RESULTADOS DE MEDICIONES DE ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA (EIS)

Fig. 19. Espectro de impedancia electroquímica de suero fisiológico (SF) representada con su a) magnitud y b) ángulo de fase para tres mediciones y su promedio	49
Fig. 20. Espectros de impedancia electroquímica para suspensiones de partículas de PMMA de $\phi_1 = 6 \mu\text{m}$ en suero fisiológico (SF) representados con su a) magnitud y b) ángulo de fase.	50
Fig. 21. Espectros de impedancia electroquímica para suspensiones de partículas de PMMA de $\phi_2=15 \mu\text{m}$ en suero fisiológico (SF) representados con su a) magnitud y b) ángulo de fase	51
Fig. 22. Espectros de impedancia electroquímica para suspensiones de partículas de PMMA de $\phi_3 =48 \mu\text{m}$ en suero fisiológico (SF) representados con su a) magnitud y b) ángulo de fase	52
Fig. 23. Espectro de impedancia electroquímica de suspensiones de partículas de PMMA en SF, representado como Diagrama de Nyquist para a) ϕ_1 , b) ϕ_2 y c) ϕ_3 (De León-Hernández et al., 2022)	53
Fig. 24. Espectros de impedancia electroquímica para suspensiones de células K-562 en medio RPMI-1640 complementado representados con su a) magnitud y b) ángulo de fase	55
Fig. 25. Espectros de impedancia electroquímica de suspensiones de células K-562 en RPMI-1640 complementado representados como diagrama de Nyquist	55
Fig. 26. Espectros de impedancia electroquímica para suspensiones de leucocitos en medio RPMI-1640 complementado representados con su a) magnitud y (b) ángulo de fase	56
Fig. 27. Espectros de impedancia electroquímica de suspensiones de leucocitos en RPMI-1640 complementado representados como diagrama de Nyquist	57

CAPÍTULO V. MODELO PARA LA CAPACITANCIA EFECTIVA DE LA DOBLE CAPA ELÉCTRICA

Fig. 28. Circuito eléctrico propuesto para analizar los datos de impedancia de partículas o células en suspensión 59

Fig. 29. Espectro de impedancia del circuito eléctrico propuesto representado con su **a)** magnitud, **b)** fase y **c)** diagrama de Nyquist con los valores de $T_s = 0.1 \text{ F} * \text{s}^{P-1}$, $P_s = 0.3$ y $R_d = 10 \text{ k}\Omega$ y los valores para los elementos reportados en la tabla 1 (De León-Hernández et al., 2022)..... 61

CAPÍTULO VI. ANÁLISIS DE RESULTADOS CON EL MODELO DE CAPACITANCIA EFECTIVA

Fig. 30. Espectro de impedancia electroquímica de suspensiones de partículas de PMMA en SF, representado como DM_i para **a)** ϕ_1 , **b)** ϕ_2 y **c)** ϕ_3 (De León-Hernández et al., 2022)..... 64

Fig. 31. a) Índice de medio disperso a 50 Hz y **b)** Capacitancia efectiva en función de la cantidad de partículas de PMMA de ϕ_1 , ϕ_2 y ϕ_3 suspendidas en Suero Fisiológico (De León-Hernández et al., 2022)..... 67

Fig. 32. Espectro de impedancia electroquímica representado como índice de medio disperso para **a)** células K-562 y **b)** leucocitos (De León-Hernández et al., 2022)..... 69

Fig. 33. a) Índice de medio disperso a 50 Hz y **b)** Capacitancia efectiva en función de la cantidad de células suspendidas en RPMI-1640 complementado (De León-Hernández et al., 2022)..... 70

Fig. 34. a) Índice de medio disperso a 50 Hz y **b)** Capacitancia efectiva y **c)** pH en función del tiempo al aplicar 0.05% de ácido acético 72

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO V. MODELO PARA LA CAPACITANCIA EFECTIVA DE LA DOBLE CAPA ELÉCTRICA

Tabla 1. Valores para los elementos del circuito eléctrico (Fig. 6) y su capacitancia efectiva asociada, empleando $R_d = 10 \text{ k}\Omega$ y $T_d = 1 * 10^{-6} \text{ F} * \text{s}^{P-1}$	60
--	----

CAPÍTULO VI. ANÁLISIS DE RESULTADOS CON EL MODELO DE CAPACITANCIA EFECTIVA

Tabla 2. Fracción de volumen para las suspensiones de partículas de PMMA de ϕ_1 , ϕ_2 y ϕ_3	65
Tabla 3. Concentración experimental y obtenida con el modelo paramétrico para las suspensiones de partículas de PMMA de ϕ_2	68
Tabla 4. Concentración experimental y obtenida con el modelo paramétrico para las suspensiones de células K-562.....	71
Tabla 4. Diminución de la población de células K-562 en el tiempo determinada con el modelo paramétrico.....	72

RESUMEN

En este trabajo doctoral se diseñó e implementó una plataforma para la caracterización de suspensiones de partículas y suspensiones celulares mediante espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS por sus siglas en inglés). Este proyecto fue impulsado como una alternativa, dentro de los estudios *in vitro*, para ensayos de muerte celular de células cancerosas. La plataforma está integrada por un biorreactor con control de temperatura y monitoreo de pH y una celda para las mediciones de EIS, permitiendo una caracterización de suspensiones celulares repetibles y en tiempo real, con una instrumentación compacta, sencilla y con un potencial de bajo costo. En la literatura se han reportado trabajos para la caracterización eléctrica de células, en los cuales se emplean marcadores biológicos para funcionalizar los electrodos de medición o se cultivan las células sobre ellos, siendo ambos métodos complejos, consumen mayor tiempo y recursos.

La caracterización eléctrica se enfocó en células de leucemia mieloide crónica (K-562) suspendidas en medio de cultivo RPMI-1640, evitando los procesos para la adhesión de las células en los electrodos de medición, teniendo una caracterización más rápida y en condiciones fisiológicas adecuadas para células no-adherentes. El biorreactor tiene una capacidad de 2 mL y la celda EIS de 100 μ L.

La integridad de la membrana celular puede ser monitoreada a través de señales a bajas frecuencias, siendo una determinación indirecta de la viabilidad celular dentro de ensayos de muerte. En un rango de frecuencias desde mHz hasta unos pocos kHz, se presenta la dispersión dieléctrica llamada dispersión α , en la cual el fenómeno de la doble capa eléctrica (EDL por sus siglas en inglés) es predominante. La EDL se presenta en toda superficie cargada eléctricamente que interactúa con un medio de iones libres (electrolito), por lo que aparece tanto en los electrodos de medición, como en las membranas de las células suspendidas (medio disperso). Los espectros de impedancia son analizados mediante un circuito eléctrico equivalente, caracterizando el fenómeno de la EDL. Se establece que la EDL

de la interfaz electrodo-electrolito se modifica por la formación de múltiples EDLs en el medio disperso, lo que genera una alteración en las propiedades en bulto.

Se analizó la EDL mediante dos enfoques. El primero es un procedimiento simple para calcular un espectro de impedancia eléctrica normalizado llamado índice de medio disperso (DM_i , por sus siglas en inglés). El segundo se basa en la llamada capacitancia efectiva (C_{ef}), que tiene como objetivo unificar los elementos de un circuito eléctrico equivalente que describen los efectos capacitivos de la EDL. Se caracterizaron partículas de polímero de 6, 15 y 48 μm de diámetro, suspendidas en una solución de cloruro de sodio al 0.9%, que imitaron a las suspensiones celulares, como un experimento en condiciones controladas. Se obtuvo un modelo paramétrico con el DM_i y la C_{ef} , obteniendo la concentración del medio disperso, probado para suspensiones con una fracción de volumen de 0.03×10^{-4} a 230×10^{-4} .

En el ensayo biológico, como experimento de control se caracterizaron suspensiones en medio de cultivo (RPMI-1640 suplementado) de células K-562 y leucocitos en un rango de 2500 a 40000 células suspendidas. Al igual que con las partículas, se obtuvieron comportamientos distintos para el DM_i y la C_{ef} , por lo tanto, se obtuvo un modelo paramétrico con ambas variables para las células cancerosas, pudiendo monitorear las distintas concentraciones. Finalmente, se realizó un ensayo de muerte celular para las células K-562 y se probó su modelo paramétrico, logrando monitorear los cambios en la población, asociándolo a una disminución de las células viables. Se probó el potencial de la plataforma para ser una herramienta simple y útil para ensayos de muerte celular, con las ventajas de permitir mediciones in situ y en tiempo real.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

El desarrollo tecnológico enfocado al área médica centra muchos recursos en tratamientos contra el cáncer, enfermedad que a nivel mundial es una de las principales causas de muerte (Organización Mundial de la Salud, 2008). La leucemia es un tipo de cáncer muy frecuente, afectando principalmente a niños. En México en el 2019, la leucemia fue la principal causa de muerte en la población con menos de 15 años, representando para los casos de defunción por cáncer el 51% para hombres y el 56% para mujeres (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2021).

La quimioterapia es un tratamiento común para la leucemia, sin embargo, tiene muchas limitaciones relacionadas con sus efectos secundarios y el desarrollo de resistencia adquirida a los medicamentos. Varias de las células normales del cuerpo; como glóbulos rojos y blancos, plaquetas que coagulan la sangre y células de la mucosa gastrointestinal; también son dañadas por la quimioterapia (Pereira et al., 2014) por estas razones la investigación y desarrollo de agentes terapéuticos aún es de gran relevancia. El impulso de alternativas y mejoras en estudios in vitro se enfocan en probar nuevas terapias, formulaciones y dosis. La sensibilidad de las células cancerosas a una terapia depende específicamente del tipo de cáncer, por lo que las pruebas in vitro tienen ventajas como una buena relación de costo- efectividad, rapidez y con resultados predictivos a nivel de actividad in vivo (Chen et al., 2005).

La técnica de cultivo celular se refiere al proceso por el que células eucariotas o procariotas pueden crecer de manera in vitro en ciertas condiciones fisiológicas, controlando la humedad, temperatura, oxígeno y dióxido de carbono (Segeritz & Vallier, 2017). El cultivo celular permite la investigación de mecanismos bioquímicos que se aplican en la evaluación de la toxicidad de nuevos compuestos farmacológicos. La citotoxicidad se define como la

toxicidad causada por la acción de los agentes quimioterapéuticos sobre las células vivas (Mukherjee, 2019).

Los ensayos de citotoxicidad comúnmente van acompañados de ensayos de viabilidad celular, los cuales indican la proporción de células funcionales existentes en la población celular, después del tratamiento con el agente citotóxico. La medición de viabilidad celular implica determinar la efectividad del tratamiento para matar células cancerosas. Existen diversos métodos de viabilidad celular, por ejemplo, el ensayo de exclusión del colorante azul tripano, el análisis de células individuales por microscopía RAMAN y la citometría de flujo (Stoddart, 2011).

El método más rutinario es el ensayo de exclusión del colorante azul tripano, en el cual la viabilidad se determina indirectamente a partir de la evaluación de la integridad de la membrana celular (Strober, 1997). En este ensayo las células con la membrana dañada absorben el colorante y se tiñen de azul, es decir, las células viables tendrían el citoplasma claro y las células no viables el citoplasma azul. Comúnmente para este ensayo se toma una porción de la suspensión celular y se evalúan en la cámara de Neubauer, empleando un microscopio de transmisión para el conteo manual de células teñidas. Mediante extrapolación se obtiene el número total de células con citoplasma azul en toda la suspensión celular. Esta técnica es simple y de bajo costo, sin embargo, no se puede ser efectuada in situ. Asimismo, es posible que una célula ya no sea viable y tener en ese lapso la membrana no permeable, o, por el contrario, puede tener transitoriamente la membrana permeable y posteriormente repararse y ser viable. En este ensayo la valoración visual de la tinción es subjetiva, por lo tanto, células que absorben poco colorante pueden ser descartadas, también puede acarrear errores dados por el conteo manual y la extrapolación.

La citometría de flujo es otro método para determinar viabilidad celular basado en la determinación de células marcadas con un colorante específico. En la citometría de flujo se mide una señal de fluorescencia generada al hacer incidir cierta longitud de onda; el azul tripano al unirse a las proteínas de la albúmina del suero bovino, excitando con una fuente

de luz con picos a 296, 485 y 648 nm, emite a 483 y 660 nm (Avelar-Freitas et al., 2014); el yoduro de propidio es otro colorante impermeable a la membrana y generalmente se excluye de las células viables, se une al ADN de doble cadena y excitando con longitudes de onda entre 400 y 600 nm, emite entre 600 y 700 nm (Crowley et al., 2016). La técnica de citometría de flujo permite tener mediciones muy precisas del número de células muertas, sin embargo, es una técnica que requiere manos especializadas e implica una instrumentación más costosa, por lo tanto, su uso es limitado en este tipo de ensayos.

Las técnicas electroquímicas (TE) son herramientas empleadas para ensayos en células. Algunas aplicaciones de las TE para estudios in vitro son la proliferación celular (Ding et al., 2007; Du, Cai, et al., 2005), la viabilidad (Hur et al., 2020; W. Wang et al., 2019), el monitoreo de morfología (Du, Liu, et al., 2005; Hayashi et al., 2008) y la aplicación de agentes tóxicos (Xing et al., 2005; Yeon & Park, 2005). Para esta última aplicación, el monitoreo de cambios dinámicos inducidos en las células por efectos de un agente tóxico, normalmente se realiza a través de una técnica llamada Sensado de Impedancia Eléctrica de Célula-Sustrato (ECIS por sus siglas en inglés) (Xiao & Luong, 2003). La técnica ECIS implica que las células se siembren, adhieran y formen una monocapa en la superficie de los electrodos de medición, determinando la impedancia eléctrica en el dominio del tiempo. De manera generalizada, los ensayos de citotoxicidad mediante ECIS se llevan a cabo monitoreando el desprendimiento de las células de la superficie de los electrodos, es decir, al ir muriendo las células se van desprendiendo y se rompe la monocapa, lo cual se cuantifica a través de un parámetro denominado índice celular (I_c). El I_c resulta de la normalización de la impedancia eléctrica de la monocapa celular respecto a la impedancia del medio de cultivo. Estos estudios resultan complicados por el tiempo, material y trabajo especializado para llevar a cabo la incubación de las células en los electrodos de medición y evitar factores como la contaminación de la muestra.

Los métodos basados en la formación de una monocapa celular tienen mayores limitaciones en aquellas células que no son adherentes, como las células de la sangre, algunas células cancerosas (por ejemplo las células de leucemia), células madre, etc. El monitoreo de células

no adherentes por técnicas como ECIS, requiere el uso de sustratos elaborados con materiales y procedimientos complejos, como lo es el óxido de grafeno (D. Zhang et al., 2013) o nanotubos de carbono (Chen et al., 2005). Con las condiciones anteriores se tiene como desventaja la evaluación de células no adherentes en condiciones fisiológicas inadecuadas, pues no se permiten interacciones dinámicas y se modifican las interacciones mediadas por iones, proteínas, fosfolípidos, entre otras (Pretini et al., 2019). Por estas razones prevalece la necesidad de métodos específicos para el estudio de células no adherentes según sus propiedades eléctricas.

A diferencia de la técnica ECIS, en la cual se determina la impedancia eléctrica excitando con una señal a una sola frecuencia, la espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS por sus siglas en inglés) implica excitar con una señal de un cierto ancho espectral. La EIS ha sido ampliamente utilizada para estudiar la interacción de un campo eléctrico con diversos materiales y su dependencia con la frecuencia, modelando la respuesta en términos de los mecanismos de conducción y polarización. La EIS permite caracterizar medio biológico debido a su capacidad de dar información sobre las células, la membrana celular, el medio intra y extracelular (Schwan, 1994).

La dispersión dieléctrica suele clasificarse por zonas según el rango espectral, para la zona de bajas frecuencias es conocida como dispersión α . La dispersión α se asocia principalmente con procesos de difusión de especies iónicas y tiene una gran influencia cuando una célula se sumerge en un medio de cultivo celular, ya que al contener iones libres de carga opuesta se forma una doble capa eléctrica (EDL). La EDL implica cierta distribución de iones en la interfaz y otra en la región circundante. El fenómeno de la EDL también ocurre como un efecto no deseado conocido como polarización de los electrodos (EP) (Chassagne et al., 2016). En la caracterización de la dispersión dieléctrica a baja frecuencia es común separar la EDL de los electrodos (EEDL) de la relajación de la EDL del medio. La compensación del efecto EEDL se usa para determinar la constante dieléctrica de la muestra (Jiménez et al., 2002).

Para casi todos los tipos de células, la membrana celular es una superficie cargada negativamente, debido a la predominancia de grupos con cargas negativas como los carboxilatos y fosfatos (Shamoon et al., 2018), lo que resulta en la atracción de cargas positivas a su superficie y la formación de una EDL. La célula al ser excitada con una señal eléctrica a bajas frecuencias, su membrana se comporta como un capacitor, evitando que la corriente eléctrica viaje por el medio intracelular, proporcionando indirectamente información sobre su forma y tamaño (Asami, 2002). Lo anterior implica que, mediante una evaluación de su comportamiento eléctrico, es posible determinar parámetros asociados a sus características fisicoquímicas.

Las células residen en un entorno compuesto por factores solubles, interacciones célula-medio extracelular y contactos célula-célula, haciéndolo mientras viven en un entorno con propiedades fisicoquímicas específicas (pH, tensión de oxígeno, temperatura y osmolalidad). Estos elementos le dan al entorno un carácter fisiológico distintivo y proporcionan un conjunto de señales extracelulares que funcionan para regular la estructura celular, la función, el comportamiento e influyen en la proliferación (Young & Beebe, 2010). Para la caracterización de suspensiones celulares se debe mantener un ambiente que estimule condiciones fisiológicas adecuadas, generalmente la temperatura debe ser mantenida a 37°C, el pH del medio extracelular cerca de 7 y la atmósfera debe contener alrededor de 5% de dióxido de carbono (T. Yao & Asayama, 2017).

En la literatura se ha establecido que la permeabilidad de la membrana celular tiene dependencia con la temperatura (Fang et al., 2017). Todas las células poseen una diferencia de potencial entre el interior y el exterior de la membrana, el cual se denomina potencial de membrana. Este potencial se debe a la presencia de gradientes de concentración iónica entre el medio intra y extracelular, así como a la permeabilidad relativa de la membrana celular a las distintas especies iónicas (Weber et al., 2016). Si la temperatura afecta la permeabilidad de la membrana celular y esta su vez determina la distribución iónica, entonces la temperatura puede modificar, en la región de la dispersión α , la EDL de la célula. La muerte celular también está relacionada con la temperatura: puede ser inducida por un aumento

corto y agudo de la temperatura, o por un aumento constante, apenas unos grados arriba de la temperatura fisiológica (Seger-Sauli et al., 2005). Para evitar exponer a las células a estrés hipertérmico, la temperatura del buffer no debe exceder el valor fisiológico por más de 3°C por tiempos prolongados.

Las células en suspensión siempre están sometidas a las fuerzas asociadas a la dinámica del medio líquido, sufriendo estrés hidrodinámico, el cual genera muerte celular. El estrés hidrodinámico puede originarse, entre otros factores, por choques entre células, células-electrodos y células-paredes, provocando deformaciones en la superficie celular, movimientos de los componentes celulares y cambios en la fluidez de la membrana (Trujillo-Roldán & Valdez-Cruz, 2006). Una manera de reducir el estrés hidrodinámico es teniendo un flujo laminar, el cual se puede generar empleando flujos en la escala micrométrica.

La reducción del estrés hidrodinámico no es la única ventaja de emplear microfluídica, se presentan otras ventajas como el uso de pequeños volúmenes de muestra (microlitros), así como el control rápido de temperatura. Por todos esos beneficios la investigación científica ha puesto un gran enfoque en el desarrollo de dispositivos microfluídicos para la caracterización de células y su combinación con TE (Mansor et al., 2017; T. A. Nguyen et al., 2013; Zór et al., 2014). También se han desarrollado controles de temperatura localizados usando micropatrones de medio conductor embebidos en el dispositivo (Resnik et al., 2011). Asimismo, el control de temperatura global en sistemas de microfluídica se ha desarrollado usando mediciones de temperatura fuera de los microcanales mediante termopares y empleando como fuente de calentamiento celdas Peltier (Adams et al., 2012), o bien, manteniendo el dispositivo en una incubadora de cultivo celular estándar (Jaccard et al., 2014) o en un baño externo con agua termalizada (Soley et al., 2005).

El pH es una propiedad fisicoquímica clave en el microambiente celular, su monitoreo constante y control es fundamental para el mantenimiento del cultivo celular a microescala. La detección de pH extracelular se ha utilizado para detectar perturbaciones en la actividad

metabólica, efectos de fármacos y toxinas o inhibición de enzimas (Young & Beebe, 2010). El monitoreo de pH se ha realizado mediante mediciones potenciométricas (Fuchs et al., 2021; Weltin et al., 2014), usando un ISFET (transistor de efecto campo sensible a iones) (Padmaraj et al., 2014), midiendo intensidad de fluorescencia (Tovar et al., 2020) y mediante la absorción óptica del colorante rojo fenol presente en el medio de cultivo celular (Jang et al., 2010).

1.2 Planteamiento del problema

El desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer sigue siendo de gran relevancia, por lo que los estudios in vitro son de gran utilidad. La técnica de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS), aplicada en ensayos in vitro de suspensiones celulares, permite su caracterización de manera no-invasiva, en tiempo real y sin la necesidad de un marcaje específico de la muestra. La caracterización por EIS en la región de la dispersión α , sigue siendo una tarea desafiante en la evaluación de interfaces a baja frecuencia, donde usualmente se asume como un problema la doble capa eléctrica de los electrodos (EEDL). Por dichas condiciones se evita la evaluación de suspensiones celulares, recurriendo al sembrado y formación de una monocapa celular sobre los electrodos de medición. Con estas premisas la problemática que se propone resolver en este trabajo se divide en tres partes:

- La caracterización mediante técnicas electroquímicas de células no-adherentes usualmente se realiza mediante el sembrado y formación de una monocapa celular sobre los electrodos de medición, implicando condiciones fisiológicas inadecuadas para este tipo de células.
- La caracterización de suspensiones celulares por EIS a bajas frecuencias usualmente se presenta como un problema por la EEDL.
- La EIS y las condiciones fisicoquímicas de las células son dependientes de parámetros ambientales.

1.3 Hipótesis y objetivos

Hipótesis

Se plantea como hipótesis que caracterizando una suspensión celular mediante EIS a bajas frecuencias, la polarización de las múltiples EDL de las células suspendidas modifica la EEDL. Estos efectos pueden ser evaluados mediante una capacitancia efectiva, la cual incrementa entre más células viables estén presentes en la suspensión, esto por el aumento de la superficie neta cargada. Por lo tanto, a través de la capacitancia efectiva es posible monitorear la concentración celular en ensayos in vitro. Finalmente, dicha estimación de concentración celular es repetible y reproducible al ser evaluada en un dispositivo que permita el control de parámetros ambientales.

Objetivo

En este trabajo se propone el desarrollo de una plataforma microfluídica para EIS, que permita el monitoreo in situ y en tiempo real de la concentración celular en un ensayo biológico, realizado bajo condiciones de temperatura controlada y monitoreo de pH. Se estimará la concentración celular a través de la evaluación del fenómeno de la EDL mediante una capacitancia efectiva, obtenida a partir de un circuito eléctrico equivalente. Finalmente, se desarrollará la aplicación de esta plataforma como una medida indirecta para determinar viabilidad celular dentro de ensayos de muerte, realizando la caracterización por EIS de suspensiones celulares, bajo condiciones controladas, empleando instrumentación de bajo costo y como un método libre de marcadores biológicos, no-invasivo y en tiempo real, con un volumen de muestra en microlitros.

Objetivos específicos:

- Desarrollar una plataforma para medición de EIS, instrumentada para el control de temperatura y monitoreo de pH, que permita caracterizar células en condiciones estables y reproducibles.
- Caracterizar suspensiones celulares mediante un modelo eléctrico, con enfoque en el fenómeno de la polarización de la doble capa eléctrica presente a bajas frecuencias, permitiendo evaluar la concentración celular con un método no invasivo.
- Aplicar el modelo eléctrico para el análisis de ensayos de proliferación y muerte celular, buscando ser una alternativa a las técnicas tradicionales en los laboratorios de cultivo celular.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

La impedancia eléctrica representa una medida de la oposición que exhibe un medio al paso de una corriente alterna, dependiendo de la frecuencia de la señal y de la composición del medio. Para ser descrita la impedancia eléctrica de un medio biológico es necesario explicar el efecto de un campo eléctrico en un material dieléctrico.

2.1 Efecto de un campo eléctrico estático en materiales dieléctricos

Cuando a un medio se le aplica un campo eléctrico la distribución de carga se dará en consecuencia con la señal y dependerá de si tiene cargas libres o ligadas. En un medio de iones libres, como lo son los medios electrolíticos, la distribución resultante consiste en las cargas positivas en la dirección del campo eléctrico y las cargas negativas en dirección contraria. Cuando hay dipolos eléctricos en el medio, estos se alinean con el campo eléctrico. Un medio con dipolos permanentes o inducidos se denomina dieléctrico ideal. Al aplicar un campo eléctrico estático (\mathbf{E}) a un medio dieléctrico, cuando los dipolos eléctricos se orientan en la dirección del campo eléctrico, se induce un momento dipolar que se denomina polarización (\mathbf{P}) del medio (Raicu & Feldman, 2015). Para un medio isotrópico y homogéneo \mathbf{P} se define como:

$$\mathbf{P} = \epsilon_0 \chi \mathbf{E}, \quad (2.11)$$

donde $\epsilon_0 = 8.854 \times 10^{-12} \text{ [F m}^{-1}\text{]}$ es la permitividad eléctrica en el vacío y χ es la susceptibilidad dieléctrica del medio. Desde un enfoque macroscópico, el vector desplazamiento eléctrico (\mathbf{D}) se define como el campo eléctrico corregido por la polarización:

$$\mathbf{D} = \epsilon_0 \mathbf{E} + \mathbf{P}. \quad (2.12)$$

Los vectores \mathbf{D} , \mathbf{E} y \mathbf{P} tienen la misma dirección y siendo la susceptibilidad un escalar, resulta:

$$\mathbf{D} = \varepsilon_0(1 + \chi)\mathbf{E} = \varepsilon_0\varepsilon_1\mathbf{E}, \quad (2.13)$$

donde $\varepsilon_1 = (1 + \chi)$ es la permitividad, usualmente llamada constante dieléctrica debido a que es independiente de la intensidad del campo eléctrico. Reescribiendo el campo eléctrico según 2.12 y 2.13:

$$\mathbf{P} = \varepsilon_0(\varepsilon_1 - 1)\mathbf{E} \quad (2.14)$$

Para dieléctricos no homogéneos y con portadores de carga libres, su permitividad es una función compleja, así mismo con un campo eléctrico alterno su permitividad es dependiente de la frecuencia. Los medios dieléctricos se pueden agrupar en polares y no polares. En un dieléctrico polar, existen dipolos permanentes y se presenta un momento dipolar aleatorio dado por la energía térmica, lo que macroscópicamente implica que el dieléctrico no posee una polarización a menos que haya un campo aplicado. En un dieléctrico no polar, las moléculas no poseen momento dipolar a menos que estén sujetas a un campo eléctrico y se presentan por la polarización electrónica y atómica.

2.2 Relación de un campo eléctrico armónico y la permitividad eléctrica compleja

La intensidad del campo eléctrico para un campo armónico dependiente del tiempo se define como:

$$E^*(t) = E_0 e^{i\omega t}, \quad (2.201)$$

donde E_0 es la amplitud del campo eléctrico, $\omega=2\pi f$ es la frecuencia angular, f (Hz) es la frecuencia e i es la unidad imaginaria. El desplazamiento dieléctrico se puede describir también por la dependencia armónica del tiempo:

$$D^*(t) = D_0 e^{i(\omega t - \delta(\omega))}, \quad (2.202)$$

donde $\delta(\omega)$ es una diferencia de fase con respecto al campo eléctrico. Apoyándonos del caso estático donde $\mathbf{D} = \epsilon_0 \epsilon_1 \mathbf{E}$, según las ecuaciones 2.201 y 2.202, obtenemos la permitividad dieléctrica compleja función de la frecuencia:

$$\epsilon^* = \frac{D_0}{\epsilon_0 E_0} e^{-i\delta(\omega)} \quad (2.203)$$

Escribiendo la ecuación 2.203 usando las relaciones de Euler se obtiene:

$$\epsilon^*(\omega) = \epsilon'(\omega) - i\epsilon''(\omega), \quad (2.204)$$

donde

$$\epsilon'(\omega) = \frac{D_0(\omega)}{\epsilon_0 E_0(\omega)} \cos[\delta(\omega)], \quad (2.205)$$

$$\epsilon''(\omega) = \frac{D_0(\omega)}{\epsilon_0 E_0(\omega)} \sin[\delta(\omega)], \quad (2.206)$$

$$D_0(\omega) = \epsilon_0 E_0(\omega) \sqrt{\epsilon'^2(\omega) + \epsilon''^2(\omega)} \quad \text{y} \quad (2.207)$$

$$\tan \delta(\omega) = \epsilon''(\omega) / \epsilon'(\omega). \quad (2.208)$$

La energía disipada en el dieléctrico por un campo armónico por unidad de tiempo es:

$$\dot{W} = \frac{1}{2} \omega E_0^2 \epsilon_0 \epsilon''(\omega). \quad (2.209)$$

Existe una conductividad (σ_1) que genera una densidad de corriente eléctrica (\mathbf{j}):

$$\mathbf{j}(\omega) = \sigma_1 \mathbf{E}(\omega). \quad (2.210)$$

La corriente eléctrica provoca disipación de energía, de acuerdo con la ley de Joule, la disipación de energía promedio por unidad de tiempo debido a la conducción es:

$$\dot{W} = \frac{1}{2} \sigma_1 E_0^2. \quad (2.211)$$

Comparando la disipación de energía dada por las ecuaciones 2.209 y 2.211 se establece que la energía total absorbida por el dieléctrico está dada por $\varepsilon''(\omega) + \sigma_1/\varepsilon_0\omega$. A bajas frecuencias es importante la contribución de la conductividad del dieléctrico. La densidad de corriente resultante es:

$$\mathbf{j}^*(\omega) = \sigma^* \mathbf{E}^*(\omega), \quad (2.212)$$

donde

$$\sigma^*(\omega) = i\omega\varepsilon_0\varepsilon^*(\omega) = \sigma'(\omega) + i\sigma''(\omega), \quad (2.213)$$

$$\sigma'(\omega) = \omega\varepsilon_0\varepsilon'' \quad \text{y} \quad (2.214)$$

$$\sigma''(\omega) = \omega\varepsilon_0\varepsilon'. \quad (2.215)$$

Siendo σ' la parte de la corriente que está en fase con el campo y que origina absorción de energía. La parte σ'' indica la corriente que está desfasada $\pi/2$ con respecto al campo.

2.3 Relajación dieléctrica

Cuando el campo eléctrico es aplicado la polarización del dieléctrico llega al equilibrio en un periodo de tiempo característico, asimismo cuando se deja de aplicar el campo eléctrico hay una función de relajación o decaimiento. La polarización se divide en:

1. Polarización casi instantánea \mathbf{P}_∞ , debida al desplazamiento de la nube electrónica con respecto al núcleo, con la cual se define la constante dieléctrica a altas frecuencias ε_∞ :

$$\mathbf{P}_\infty = \varepsilon_0(\varepsilon_\infty - 1)\mathbf{E}. \quad (2.31)$$

2. Polarización dependiente del tiempo, $\mathbf{P}(t)$ debida a la orientación de los dipolos. Para un tiempo infinito, se tiene un valor límite de polarización \mathbf{P} , dada en la ecuación 2.14, con la cual se definió la constante dieléctrica a bajas frecuencias ε_1 .

El modelo de Debye establece la permitividad compleja como (Suárez Herrera, 2011):

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_1 - \varepsilon_\infty}{1 + \omega^2\tau^2} - i\left(\frac{\omega\tau(\varepsilon_1 - \varepsilon_\infty)}{1 + \omega^2\tau^2}\right), \quad (2.32)$$

donde τ corresponde al tiempo de relajación característico. En dieléctricos reales aparece la conductividad para bajas frecuencias o un campo estático, denominada σ_1 :

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_1 - \varepsilon_\infty}{1 + \omega^2\tau^2} - i\left(\frac{\omega\tau(\varepsilon_1 - \varepsilon_\infty)}{1 + \omega^2\tau^2} + \frac{\sigma_1}{\varepsilon_0\omega}\right). \quad (2.33)$$

En la **Fig. 1** se muestra el comportamiento eléctrico de un medio biológico que se divide en tres regiones principales, llamadas dispersiones (Martinsen et al., 2002). Desde mHz hasta unos cuantos kHz, se tiene la dispersión α , asociada con procesos de difusión de especies iónicas vinculadas con el potencial de membrana y el desplazamiento de los contraiones que la rodean. En el rango de kHz y hasta decenas de MHz, se presenta la dispersión β , que se genera por la polarización de la membrana como consecuencia de la distribución de carga entre el medio intracelular y el extracelular, creando un dipolo eléctrico. Finalmente, la región γ comprendida entre MHz y GHz, se asocia con las moléculas de agua y algunas proteínas (Heileman et al., 2013).

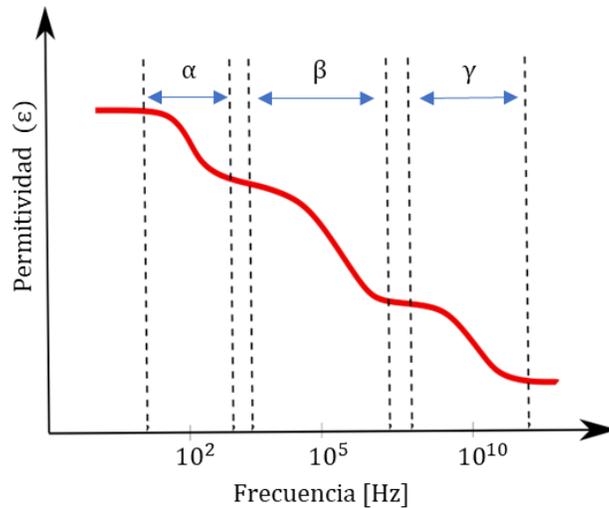


Fig. 1. Dispersiones α , β y γ presentes en el espectro de permitividad eléctrica de medios biológicos (Heileman et al., 2013).

2.3.1 Propiedades de la membrana en la región de la dispersión α

En la literatura se han podido englobar cuatro grandes mecanismos de polarización que generan la dispersión α : la modificación de la nube de iones que forman la EDL, la ruptura de la membrana plasmática, el bloqueo de los canales iónicos y el movimiento de cargas en respuesta al cambio de potencial de membrana (Raicu & Feldman, 2015).

La modificación de la nube de iones que forman la EDL es originada por los iones libres presentes en la suspensión celular. Un electrolito es una solución que contiene iones libres capaces de conducir una corriente eléctrica, pudiendo conformarse por una variedad de especies cargadas y no cargadas. En un electrolito cuyo medio solvente es agua, dado que la molécula de oxígeno es más electronegativa que las moléculas de hidrogeno, se forma un dipolo eléctrico. En estado de equilibrio las moléculas de agua están orientadas arbitrariamente, por lo tanto, la carga neta es cero (McCafferty, 2010).

Los medios de cultivo son líquidos que contienen compuestos que regulan el ciclo celular. Un medio de cultivo típico está compuesto de un complemento de aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, glucosa y suero como fuente de factores de crecimiento, hormonas y factores de adhesión. Además de nutrientes, el medio también colabora en mantener el pH y la osmolaridad (Michl et al., 2019). Cuando las sales inorgánicas se disocian en el solvente, generan los iones libres que rodean a la superficie celular y forman la EDL. Cuando se aplica un campo eléctrico externo se provoca la distorsión de la nube de iones e induce un gran dipolo efectivo, lo que se conoce como polarización de los contraiones. En ciertas células, cuando hay ruptura de la membrana celular, la cual puede tener agujeros transitorios, que se pueden sellar o expandir, se modifica la polarización y se presenta una dispersión dieléctrica peculiar que no se encuentra para las células intactas (Asami, 2012).

La polarización por bloqueo de los canales iónicos implica el desplazamiento de las cargas y la reorientación de los dipolos en aquellas membranas que tienen una corriente de activación cuando los canales iónicos de K^+ y Na^+ se bloquean. Dicha corriente de activación se debe a que los canales iónicos requieren una diferencia de potencial para activarse y por

lo tanto se modifica la capacitancia de la membrana (Jin et al., 2022). Por otra parte, los iones hidrofóbicos adsorbidos en la interfaz de la membrana pueden moverse a través de ella en respuesta al voltaje aplicado, modificando el potencial electrostático de las bicapas lipídicas (Sukhorukov et al., 2001).

2.3.2 Doble capa eléctrica (EDL)

La caracterización de la estructura de la EDL, tanto en condiciones de equilibrio como de no equilibrio, permite evaluar la electrocinética de los medios sobre los que se forma. A su vez, la evaluación de la electrocinética de la EDL permite caracterizar su estructura y extraer información fisicoquímica del medio.

El fenómeno de la EDL ocurre en toda superficie cargada eléctricamente que interactúa con un medio de iones libres. En la presencia del fenómeno de la EDL, cuando se aplica un campo eléctrico externo, la distribución de carga circundante a la interfaz se distribuye en consecuencia con la señal (Raistrick et al., 2005). Como resultado, al aplicar una señal eléctrica a bajas frecuencias se induce un momento dipolar eléctrico debido a la polarización de esta EDL (Zhao & Wang, 2015), dado que esto ocurre en células y partículas (medio disperso) suspendidas en un electrolito (medio líquido), estas muestras pueden producir una dispersión α semejante. Es por esta razón que suspensiones de partículas pueden ser usadas como fantasmas de células en la caracterización eléctrica a bajas frecuencias.

Como se mencionó anteriormente, el fenómeno de EDL también se presenta como un efecto indeseado conocido como “polarización del electrodo” (Chassagne et al., 2016), nombrado EEDL. En condiciones de corrosión libre, la superficie del metal admite procesos anódicos y catódicos locales, y por lo tanto la interfaz metal/solución es un bullicio de actividad (McCafferty, 2010). En la caracterización de la dispersión dieléctrica a baja frecuencia se emplean técnicas para separar los efectos de la EEDL de la relajación de la EDL del medio disperso (Jiménez et al., 2002), lo que resulta muy útil cuando se realiza un análisis a través de la constante dieléctrica, pues la EEDL causa un aumento en dicha variable. Por otra parte, cuando se realiza una caracterización de parámetros físicos como tamaño y concentración

de la muestra mediante impedancia eléctrica, la EEDL también está involucrada con dicha información (Khademi & Barz, 2020). En la literatura se ha establecido una relación entre el tiempo de relajación característico de la EDL con ciertas características físicas del medio disperso, usualmente se ha empleado para caracterizar partículas suspendidas en medios acuosos, estableciendo una conexión entre la concentración de la suspensión y el tamaño de las partículas con dicho tiempo característico (R. G. Ramírez-Chavarría & C. Sánchez-Pérez, 2019; J. Yao et al., 2016; Zhao & Wang, 2015).

Uno de los modelos utilizados para describir la EDL es el Gouy-Chapman-Stern (McCafferty, 2010), el cual establece que se forma una región interna (capa Stern) en la cual los iones se encuentran fuertemente ligados y una región externa (capa difusa) en la cual están menos asociados, generando una perturbación en las propiedades en bulto. La EDL se considera dos capacitores en serie (Lockett et al., 2010), por lo tanto, su capacitancia se puede asociar a características de forma, tamaño y cantidad del medio disperso. Mediante la medición de impedancia eléctrica se ha evaluado la capacitancia de la EEDL en función del potencial de la señal de excitación, el tamaño de los iones y de la temperatura (Lockett et al., 2008; Siinor et al., 2010). La técnica de circuitos eléctricos equivalentes se ha empleado para investigar los comportamientos electroquímicos y dinámicos de capacitores de doble capa con diferentes electrolitos (Kang et al., 2014).

2.3.3 Modelo Gouy-Chapman-Stern

El modelo Gouy-Chapman-Stern establece que la distribución de iones de la EDL se divide en dos regiones, la capa compacta (Capa Stern) y la capa difusa que se extiende hasta la solución en bulto (**Fig. 2**). La capa Stern está formada por el plano interno Helmholtz (IHP), dado por las moléculas de agua y por el plano exterior Helmholtz (OHP), trazado desde el centro del ion solvatado. La capa Stern no depende del potencial en la superficie cargada mientras que la capa difusa varía en función del potencial (Khademi & Barz, 2020). La capa compacta y la capa difusa pueden interpretarse como dos capacitores en serie:

$$\frac{1}{C_{DL}} = \frac{1}{C_S} + \frac{1}{C_{Dif}}, \quad (2.3.31)$$

donde C_{DL} es la capacitancia total de la EDL, C_S es la capacitancia de la capa Stern y C_{Dif} la capacitancia de la capa difusa.

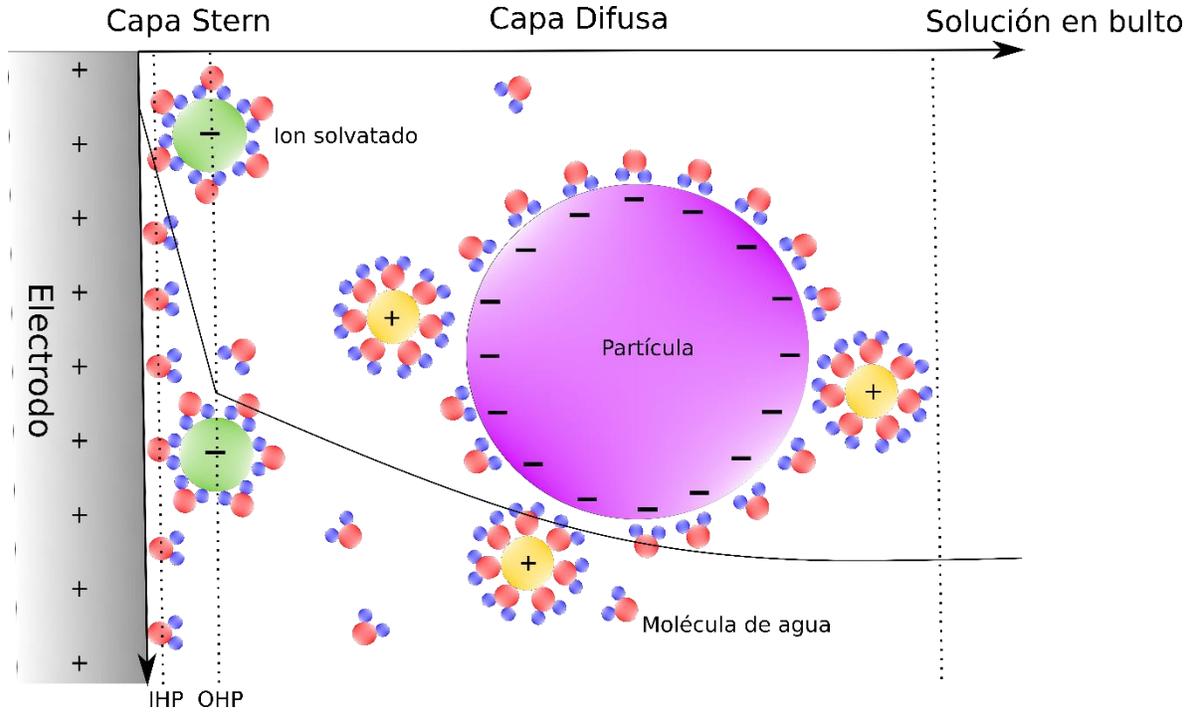


Fig. 2. Diagrama de la EDL que se forma en una superficie cargada según el modelo Gouy-Chapman-Stern (De León-Hernández et al., 2022).

La capacitancia de la EDL según el modelo Gouy-Chapman-Stern está dada por (Bard & Faulkner, 2001):

$$\frac{1}{C_{DL}} = \frac{x_{OHP}}{\epsilon\epsilon_0} + \frac{1}{\left(\frac{2\epsilon\epsilon_0 z^2 e^2 n^0}{k_B T}\right)^{\frac{1}{2}} \cosh\left(\frac{ze\phi}{2k_B T}\right)}, \quad (2.3.32)$$

donde x_{OHP} es la distancia entre la superficie cargada y el plano OHP, ϵ es la permitividad relativa del medio, ϵ_0 es la permitividad de espacio libre, n^0 es la concentración iónica, z es la valencia de los iones, e es la carga eléctrica, k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura y ϕ es el potencial. Este modelo predice que mientras la superficie tenga una carga más grande, la capa difusa será más compacta y la capacitancia total aumentará, asumiendo que ϵ es constante a lo largo de x . Tratar a ϵ como una constante puede ser

incorrecto, ya que los dipolos en la capa Stern están altamente alineados con el campo eléctrico, de modo que la permitividad efectiva puede tener una fuerte disminución (Kilic et al., 2007), en el caso de la capa difusa, los dipolos tienen una disposición menos alineada respecto al campo eléctrico, por lo que la permitividad efectiva tiene una disminución menor, resultando que ϵ varía en la dirección x .

De manera concreta se tiene que en la presencia de un solvente polar en una interfase electrodo-electrolito, hay una capa de solvente adyacente al metal y después iones con su capa de hidratación. Se supone que las únicas fuerzas que actúan sobre la interfaz son de origen electrostático. Estas fuerzas orientan los dipolos del solvente y determinan la distribución de iones con la distancia desde la interfase (Macdonald & Johnson, 2005). Esta teoría ignora los efectos de las interacciones ion-ion en la doble capa y las fuertes interacciones no específicas de los iones con la carga superficial en el electrodo.

2.3.4 Modelo Bockris-Devanathan-Muller

El modelo de Gouy-Champan-Stern considera los efectos electrostáticos que generan excesos de carga y por tanto gradientes de potencial en la solución, tomando en cuenta la magnitud de las cargas de los iones y sus radios, descartando sus propiedades químicas. Sin embargo, es posible que un ion pueda interactuar químicamente con el electrodo, por lo que puede atravesar la capa del disolvente, rompiendo su capa de hidratación, esto se conoce como adsorción específica. La adsorción iónica específica puede alterar el perfil de potencial en la zona interfacial en un grado extremo (Bard & Faulkner, 2001). Este efecto se puede describir como "condensación de iones" en la doble capa eléctrica y se puede tratar mediante un modelo en el que la carga superficial se considera como una "carga superficial efectiva" (Attard, 1995).

El modelo Bockris-Devanathan-Muller toma en cuenta los iones que son adsorbidos de forma específica, siendo el plano que pasa por el centro de estos iones, el plano interno de Helmholtz. Este modelo de doble capa eléctrica reconoce que las moléculas de agua y los iones en solución compiten por sitios en la superficie del metal. La adsorción del ion cloruro,

por ejemplo, puede considerarse una reacción de sustitución en la que los iones Cl⁻ reemplazan las moléculas de agua adsorbidas en la interfase metal/solución. La carga introducida por la adsorción de iones en la superficie del metal se equilibra en parte con contraiones de carga opuesta, estos contraiones no están adsorbidos en la superficie del metal, sino que están en la solución y tienen asociadas su capa de hidratación. El plano que pasa por el centro de estos contraiones es el plano exterior de Helmholtz (McCafferty, 2010).

La complejidad del fenómeno de la EDL dificulta la evaluación de su capacitancia mediante modelos analíticos, pues hay múltiples variables involucradas, como la variación de la permitividad al alejarse de la interfase y la adsorción iónica específica. Por lo anterior, la técnica de EIS, analizada mediante un circuito eléctrico equivalente, es una alternativa para evaluar la EDL.

2.4 Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS)

La impedancia electroquímica representa una medida de la oposición que encuentra la corriente eléctrica alterna al atravesar un medio, siendo dependiente de la frecuencia de la señal. La medición de impedancia eléctrica consiste en aplicar en el medio a caracterizar un voltaje ($V(t)$) y medir la corriente eléctrica inducida ($I(t)$) (Orazem & Tribollet, 2017). La señal de voltaje se define como:

$$V(t) = V_0 \cos(\omega t + \theta_1), \quad (2.41)$$

donde V_0 es la amplitud, ω es la frecuencia angular y θ_1 es la fase de la señal. La señal de corriente se define como:

$$I(t) = I_0 \cos(\omega t + \theta_2), \quad (2.42)$$

donde I_0 es la amplitud, ω es la frecuencia angular y θ es la fase de la señal. La frecuencia angular $\omega = 2\pi f$ de ambas señales es la misma. Empleando funciones de fase definimos la impedancia eléctrica como:

$$Z(\omega) = \frac{V_0 e^{i(\omega t + \theta_1)}}{I_0 e^{i(\omega t + \theta_2)}}. \quad (2.43)$$

La impedancia resultante es una variable compleja:

$$Z(\omega) = |Z|(\cos \theta + i \sin \theta), \quad (2.44)$$

donde $|Z|$ es la magnitud y θ es la diferencia de fase entre la señal de voltaje y corriente. La impedancia al ser un número complejo también se puede representar mediante su componente real e imaginaria:

$$Z(\omega) = Z' + iZ''. \quad (2.45)$$

Al inyectar en el medio a caracterizar una señal a la cual se realiza un barrido de su frecuencia, se tiene como resultado un valor de impedancia para cada frecuencia, la relación de valores de impedancia con la frecuencia se denomina “espectro de impedancias”. La EIS involucra la medición de la impedancia eléctrica en un amplio rango de frecuencias. Existen dos representaciones graficas comunes de la impedancia eléctrica, los diagramas de Bode y el diagrama de Nyquist. En los diagramas de Bode se grafica tanto la magnitud ($|Z|$) como la fase (θ) en función de la frecuencia (**Fig. 3a**). En el diagrama de Nyquist se grafica en el eje de las abscisas la parte real y en el eje de las ordenadas la parte imaginaria de la impedancia (**Fig. 3b**).

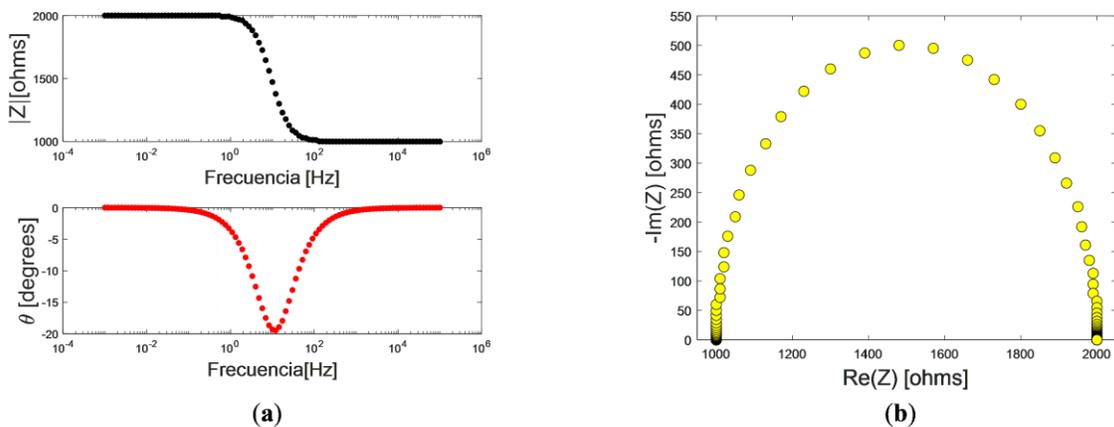


Fig. 3. Impedancia eléctrica de un circuito eléctrico representada en **a)** diagramas de Bode y **b)** diagrama de Nyquist.

Debido a la actividad iónica presente en las suspensiones celulares, la caracterización de células mediante EIS, implica el empleo de técnicas electroquímicas. En estas técnicas se analizan modelos de electrodo-electrolito, es decir, la interacción de electrodos en líquidos iónicos. La electroquímica estudia la interrelación de efectos eléctricos y químicos, por lo tanto, permite analizar las interacciones cuando un potencial eléctrico es aplicado y el movimiento de carga en el electrodo se lleva a cabo por el movimiento de los electrones y en el electrolito el movimiento de carga se debe al movimiento de los iones (Macdonald & Johnson, 2005).

En una celda electroquímica pueden presentarse dos tipos de procesos, faradaicos y no faradaicos. En los procesos faradaicos, dictados por las leyes de Faraday, existe transferencia de carga del electrodo al electrolito, la cual genera reacciones de oxidación-reducción (redox). En el proceso redox, la especie que se oxida pierde electrones y la que se reduce gana electrones. En los procesos no faradaicos no existe transferencia de carga en la interfaz, por lo tanto, no hay reacciones redox sino procesos como la adsorción y la desorción, pudiendo evaluarse la modulación de carga en la interfaz (Eveness et al., 2022). Estos procesos dependen del tipo de electrodos, del potencial aplicado y de la presencia de especies electroactivas en el electrolito.

2.5 Técnica de circuito eléctrico equivalente para el modelado de la EIS

Una celda electroquímica puede considerarse a través de su impedancia eléctrica al excitarse con una señal sinusoidal, por lo tanto, puede ser representada mediante un circuito equivalente de elementos eléctricos pasivos. Estos elementos permiten el paso de la misma corriente (misma amplitud y ángulo de fase) que la celda electroquímica, es decir, se pretende describir la medida de impedancia espectral de la celda mediante elementos eléctricos. Los elementos eléctricos pasivos son aquellos componentes que no generan corriente ni potencial, como resistencias, capacitores e inductores. El objetivo es describir el

espectro de impedancia a través de los elementos eléctricos, buscando representar la respuesta electroquímica del sistema, así como la composición y estructura del medio de estudio.

Existen múltiples circuitos eléctricos equivalentes para describir el comportamiento eléctrico de las células, por ejemplo, el modelo de Fricke (Damez et al., 2008), en el cual el medio extracelular tiene un comportamiento resistivo, que se encuentra en una configuración en paralelo con un arreglo capacitor-resistor que representan la membrana y el medio intracelular (**Fig. 4a**). En otros modelos de circuito equivalente se toma en cuenta el fenómeno de la EDL por cada electrodo y la capacitancia de la membrana celular valorando la entrada y la salida de la señal, por lo tanto, hay dos capacitores separados por una resistencia que modela el citoplasma (**Fig. 4b**) (Wang et al., 2020).

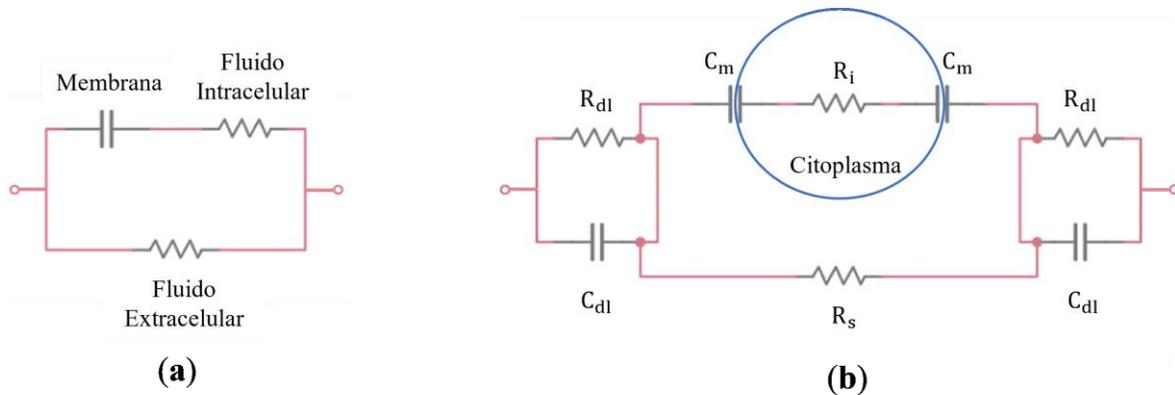


Fig. 4. Circuito eléctrico equivalente con **a)** modelo de Fricke (Damez et al., 2008) y **b)** modelo considerando la EDL por cada electrodo (L. Wang et al., 2020).

Un circuito eléctrico habitual para describir los procesos en la interfase electroquímica es llamado circuito de Randles (**Fig. 5a**). Los elementos de este circuito son una resistencia de la solución en bulto (R_s), debida a la corriente viajando a través de todo el volumen de la solución; un capacitor para la doble capa eléctrica (C_{dl}); una resistencia por la transferencia de electrones de la superficie del electrodo al electrolito (R_e) y un elemento que describe el

transporte de masa desde la superficie del electrodo hacia la solución, llamado impedancia de Warburg (Z_w) (Randviir & Banks, 2013).

A medida que la frecuencia disminuye (**Fig. 5b**), hay una región donde la difusión de carga es predominante, visualizado en el diagrama de Nyquist con una línea oblicua con un ángulo de 45° (caso ideal) conocida como la “región de Warburg” (Laschuk et al., 2021). En esta región el proceso predominante del transporte de masa es la difusión, generada por gradientes de concentración, es decir, cerca del electrodo la cantidad de especie electroactiva será distinta respecto a la solución en bulto, generando difusión de los iones en solución.

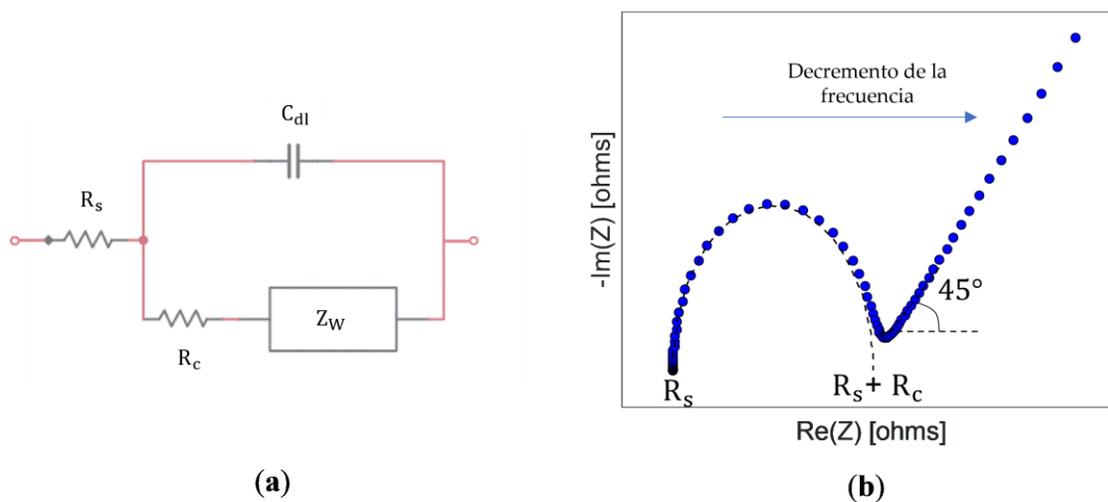


Fig. 5. Representación del circuito eléctrico Randles mediante **a)** elementos eléctricos (Laschuk et al., 2021) y su impedancia eléctrica en **b)** diagrama de Nyquist.

Capítulo III

INSTRUMENTACIÓN DE LA PLATAFORMA

3.1 Biorreactor

Un biorreactor es un recipiente o sistema con parámetros ambientales controlados que mantiene a la suspensión celular activa. Usualmente los biorreactores mantienen los microambientes bien controlados para regular el crecimiento celular, la diferenciación y el desarrollo de tejidos, pudiendo entregar nutrientes y estímulos biomiméticos (Stephenson & Grayson, 2018).

En este trabajo, la primera parte de la plataforma es un biorreactor (**Fig. 6a**) instrumentado para el monitoreo de pH y para controlar temperatura. El pH arroja información del estado de la suspensión celular, mientras que la temperatura controlada mantiene condiciones fisiológicas estables, así como estandarización y reproducibilidad. El contenedor del biorreactor está elaborado de polidimetilsiloxano (PDMS), el cual es un polímero elastomérico con propiedades como biocompatibilidad, estabilidad química, permeabilidad a los gases, transparencia óptica y permite la fabricación mediante moldeo por réplica (Miranda, 2022). El contenedor tiene un área de 2.5 cm² y una altura de 1 cm, resultando una capacidad de 2.5 mL, se presenta en el esquema de la **Fig. 6a** y en la fotografía de la **Fig. 6b**.

El monitoreo el pH se realizó con un sensor óptico, como primer paso se realizó la prueba de concepto empleando una fuente de luz de ancho espectral amplio y un espectrofotómetro, posteriormente se instrumentó mediante un arreglo led-fotodetector (**Fig. 6a**). El control de temperatura se realizó usando el efecto fototérmico para la fuente de calor, para ello la base del contenedor de PDMS se funcionalizó con grafito y se usó un LED plano como fuente de luz (**Fig. 6a** y **Fig. 6b**). En las secciones posteriores se desglosará la instrumentación realizada.

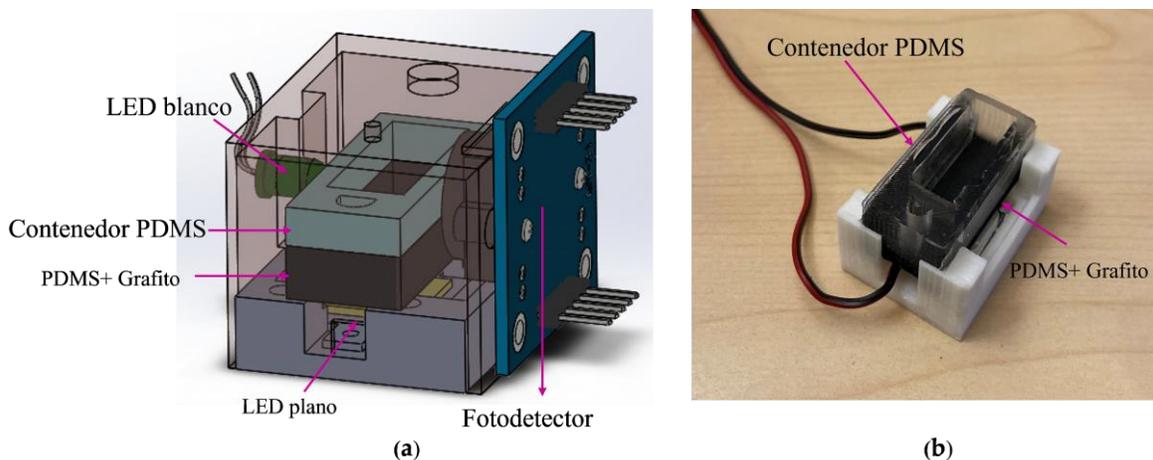


Fig. 6. a) Esquema del biorreactor instrumentado para el monitoreo de pH (LED-fotodetector) y el control de temperatura (PDMS+grafito-LED plano), con un contenedor de PDMS y **b)** Fotografía del contenedor.

3.1.1 Sensor óptico para el monitoreo de pH

El pH es una propiedad fisicoquímica clave en el microambiente celular, su monitoreo constante es fundamental para conocer el estado de la suspensión celular, siendo el pH óptimo, para la mayoría de las células cultivadas, alrededor de 7.4. La mayoría de los medios de cultivo celular disponibles comercialmente contienen rojo de fenol, la molécula de rojo de fenol tiene una forma ácida y otra básica, cambiando así el color del medio de cultivo en función del pH, dadas estas características se han desarrollado diversos sensores ópticos de pH (Liu et al., 2005; Magnusson et al., 2013).

Para la plataforma se implementó un sensor óptico de pH en tiempo real, basado en las propiedades de absorción óptica del rojo de fenol presente en el medio y las del PDMS del contenedor del biorreactor de ser ópticamente transparente, explotando la flexibilidad de un sistema fuente de luz-fotodetector. Para la prueba de concepto se empleó un sistema de fuente de luz de ancho espectral de 400 a 900 nm y un espectrofotómetro, usando fibras ópticas para la propagación de la luz (**Fig. 7**), buscando determinar la longitud de onda (λ) en la que se tuviera mayor sensibilidad, es decir, en la cual la luz colectada tuviera mayores cambios en función del pH.

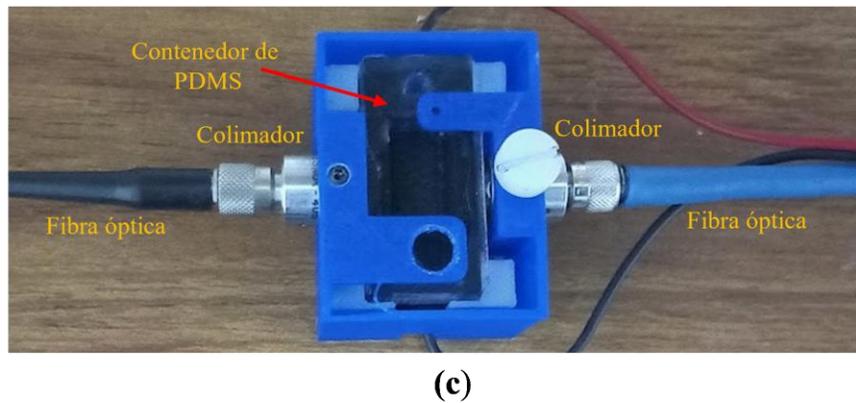
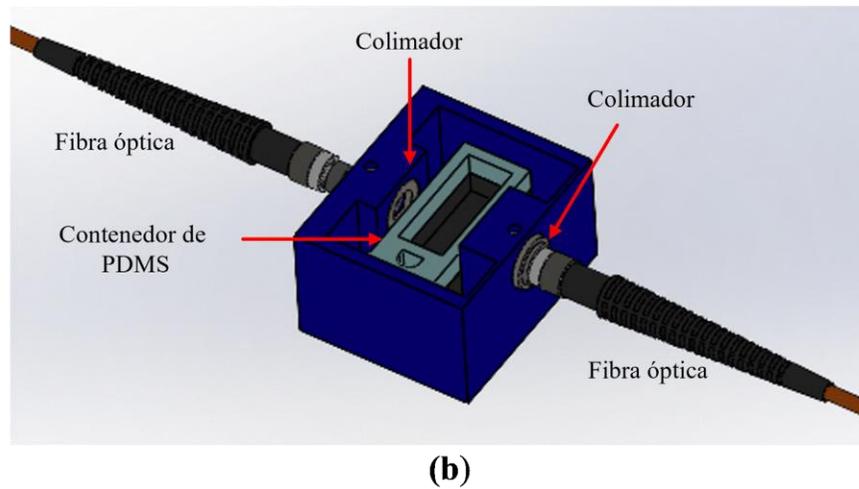
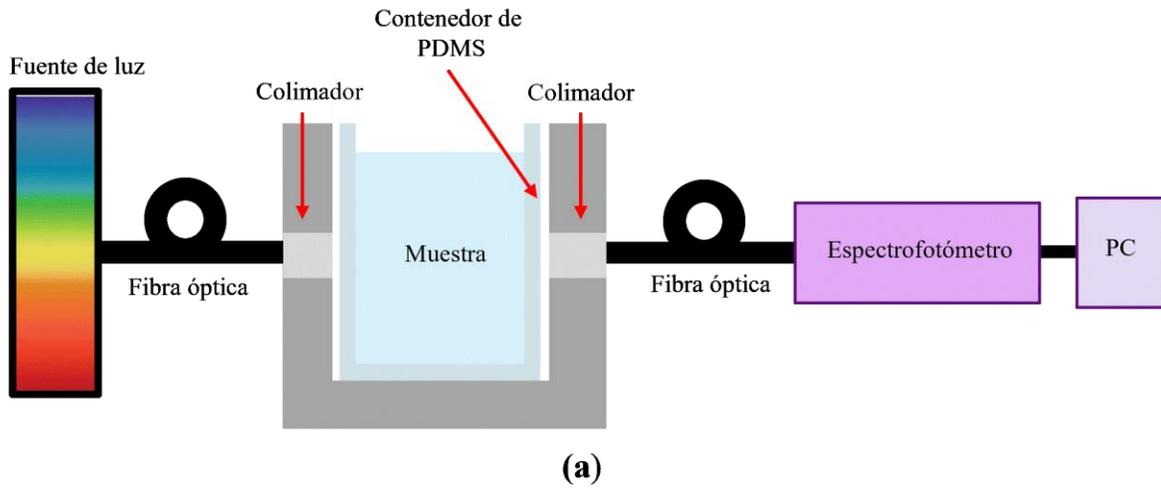


Fig. 7. Instrumentación para la calibración del sensor óptico de pH representada en **a)** diagrama, **b)** esquema 3D e **c)** implementación experimental.

Para realizar la calibración del sensor se emplearon muestras de diferentes pH, para obtener estas muestras se empleó ácido acético (CH_3COOH) para disminuir el pH de una solución alcalina. En solución acuosa, el ácido acético es una mezcla en equilibrio de iones acetato (CH_3COO^-), iones hidrógeno (H^+) y ácido acético no disociado. La reacción en equilibrio puede expresarse como:

$$[\text{H}^+] = k_a + \frac{[\text{CH}_3\text{COOH}]}{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}, \quad (3.1.11)$$

donde k_a es la constante de equilibrio. El pH se define como el logaritmo negativo de la concentración de iones de hidrógeno:

$$\text{pH} = -\log[\text{H}^+]. \quad (3.1.12)$$

Sustituyendo la ecuación 4.1.11 en 4.1.12, se obtiene el pH en una solución acuosa con ácido acético:

$$\text{pH} = -\log k_a - \log \frac{[\text{CH}_3\text{COOH}]}{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}. \quad (3.1.13)$$

La calibración del sensor se realizó con un buffer salino de $\text{pH}=8$ y usando diferentes concentraciones de ácido acético: 0.025%, 0.05%, 0.08%, 0.09% y 0.1%, se obtuvieron muestras con un pH de 7.8, 7.6, 7.4, 7, 6.5, de acuerdo con un instrumento comercial Oakton para medir pH. A cada muestra se les agregó una concentración de 33 μM de rojo fenol.

Empleando la configuración de la **Fig. 7c** se caracterizaron las muestras de diferente pH, para monitorear la luz colectada se determinó la transmitancia porcentual (T):

$$T = \frac{I_\lambda - I_{d,\lambda}}{I_{0,\lambda} - I_{d,\lambda}} * 100, \quad (3.1.14)$$

donde I_λ es la intensidad de la luz que atraviesa la muestra a una λ , $I_{d,\lambda}$ es la intensidad del ruido negro a dicha λ e $I_{0,\lambda}$ es la intensidad de luz incidente a dicha λ . En la **Fig. 8** se presenta la transmitancia porcentual en función de la longitud de onda de las muestras, presentándose un valle a $\lambda = 570 \text{ nm}$.

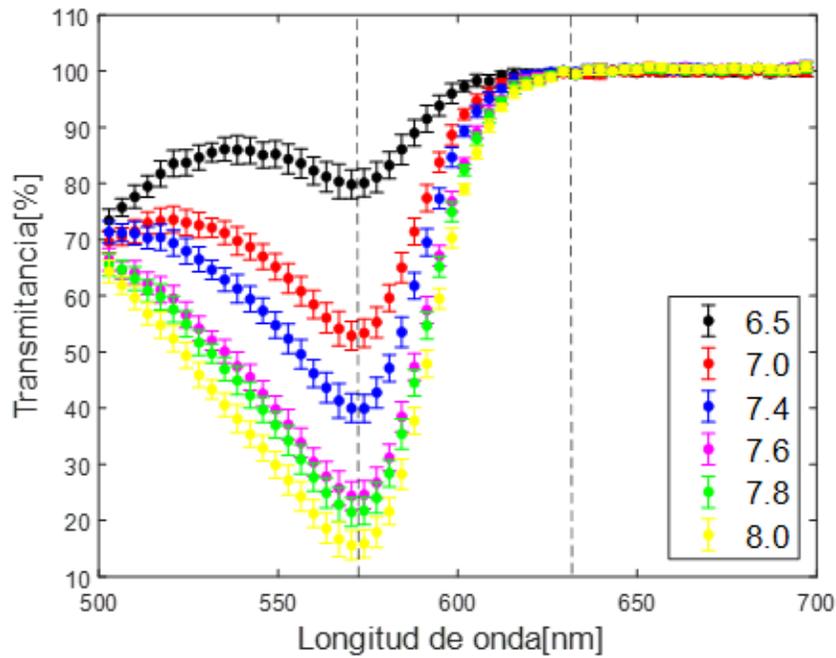


Fig. 8. Espectro de transmitancia de muestras con diferentes pH con rojo fenol como indicador colorimétrico.

Para obtener la curva de respuesta, se obtuvo un factor de transmitancia (F_T) con el valor a $\lambda = 570$ nm, en la cual está el valle de transmisión y a $\lambda = 630$ nm como valor de referencia, en la cual se transmite toda la luz de forma independiente al pH de la muestra:

$$F_T = \frac{T_{630 \text{ nm}} - T_{570 \text{ nm}}}{T_{630 \text{ nm}}}. \quad (3.1.15)$$

En la **Fig. 9** se presenta el pH de las muestras en función de su F_T , mediante mínimos cuadrados no lineales se ajustó a una línea recta con una $R^2=0.99$ y una desviación estándar de 0.04. De acuerdo con lo anterior se concluye que a través del F_T , determinado mediante la transmitancia de la muestra, es posible monitorear el pH.

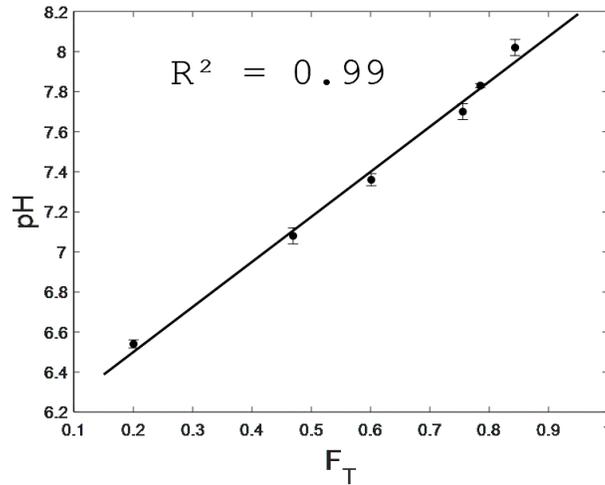


Fig. 9. Curva de respuesta del pH en función del factor de transmitancia en la prueba de concepto.

Para la integración del monitoreo de pH mediante la absorción de un haz de luz, se empleó el sensor TCS3200 (**Fig. 10**), el cual presenta una señal eléctrica de salida con una forma de onda cuadrada, cuya frecuencia es proporcional a la intensidad de un haz de luz incidente. El sensor consta de una matriz de 8×8 fotodiodos de silicio, de los cuales 16 fotodiodos están dedicados a filtrar el color azul, 16 fotodiodos tienen filtro para el color verde, 16 fotodiodos tienen filtro para el color rojo y 16 fotodiodos son sin filtro.

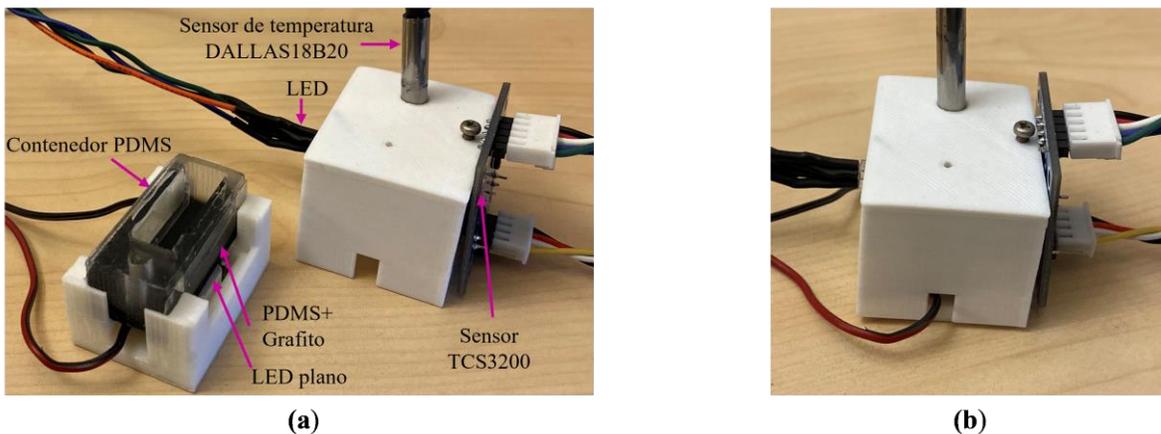


Fig. 10. Integración del monitoreo de pH mediante el led-sensor TCS3200 en el biorreactor **a)** abierto y **b)** cerrado.

La responsividad espectral relativa del sensor se presenta en la **Fig. 11**, resultando que, al aplicar el filtro para azul, se tiene una señal con un primer pico en una $\lambda= 470$ nm; con el filtro para verde, el primer pico de la señal está centrado en una $\lambda=524$ nm y finalmente, aplicando el filtro para rojo, la señal tiene su primer pico en una $\lambda= 640$ nm. La fuente de luz empleada fue un diodo emisor de luz blanco cuyo ancho espectral va de los 400 nm a los 700 nm.

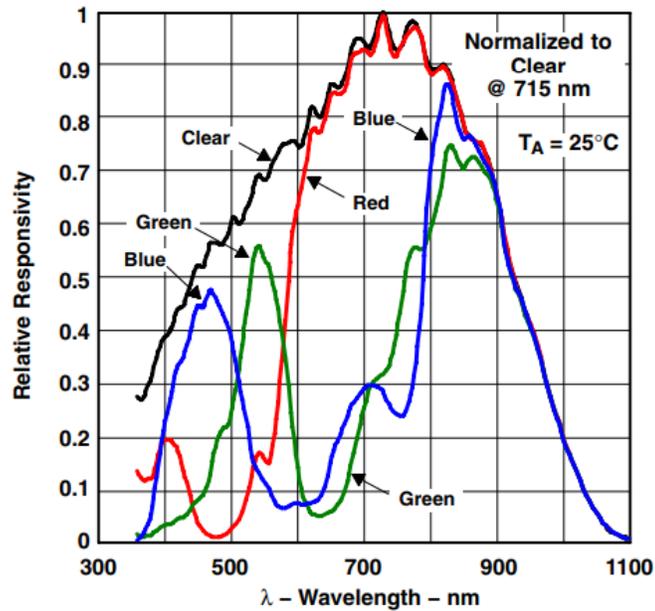


Fig. 11. Responsividad espectral relativa del sensor TCS3200 (Copyright 2009, TAOS Inc., 2009).

Usando el sensor TCS3200 se obtuvo un factor del ancho de pulso (F_{PW}) de la señal de onda cuadrada, proporcional a la intensidad del haz de luz colectado después de propagarse por la muestra, usando los filtros para verde y rojo y ponderando de acuerdo con la responsividad relativa:

$$F_{PW} = \frac{PW_{rojo} - 2 * PW_{verde}}{PW_{rojo}}, \quad (3.1.16)$$

donde PW_{rojo} y PW_{verde} son el ancho de pulso usando el filtro rojo y verde respectivamente.

En la **Fig. 12** se presenta la curva del pH en función del F_{PW} , obtenida al determinar el F_{PW} de las muestras de diferente pH usadas en la prueba de concepto. Se ajustó a una línea recta con una $R^2=0.98$, obteniendo la curva de calibración para monitorear pH.

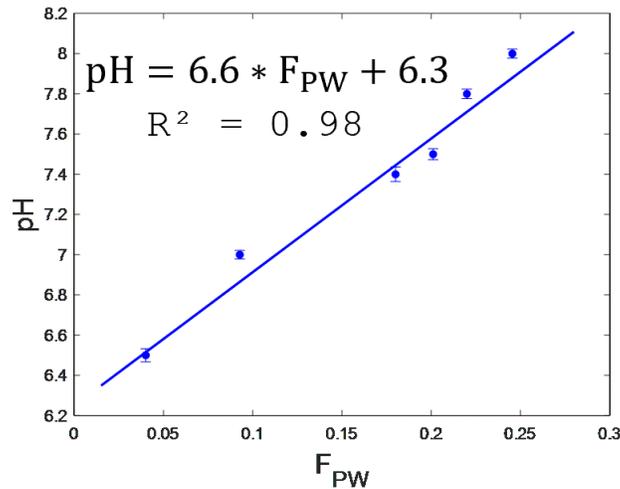


Fig. 12. Curva de calibración para el monitoreo de pH con el sensor TCS3200.

3.1.2 Control PID de temperatura

La temperatura es un factor que afecta tanto las condiciones de las células como los espectros de impedancia electroquímica, por lo que se desarrolló el control de temperatura para la plataforma. Se empleó el efecto fototérmico, el cual consiste en la generación de calor mediante la excitación de un cuerpo con luz, los fotones son absorbidos por el cuerpo y generan vibraciones moleculares, lo que finalmente provoca calor (Sánchez-Pérez et al., 2017).

Para realizar la integración del control de temperatura en el biorreactor de PDMS, que intrínsecamente es un aislante térmico, se le funcionalizó con partículas de grafito, obteniendo un compuesto que, tanto absorbe la luz y la transforma en calor (Fernández, 2011), como es un buen conductor de calor (Shih et al., 2010; Tao et al., 2017). En la **Fig. 13** se presenta el delta de temperatura como función del tiempo para bloques de PDMS de 1 cm^3 con una concentración de 2, 5, y 10 wt% de grafito. Se empleó un led plano de luz blanca.

con una potencia de 3 W, como fuente de luz para generar el efecto fototérmico. Se puede observar que el mayor cambio de temperatura se presenta a bajas concentraciones de grafito, lo cual puede asociarse a la eficiencia de mezclado entre el PDMS en estado líquido y el grafito.

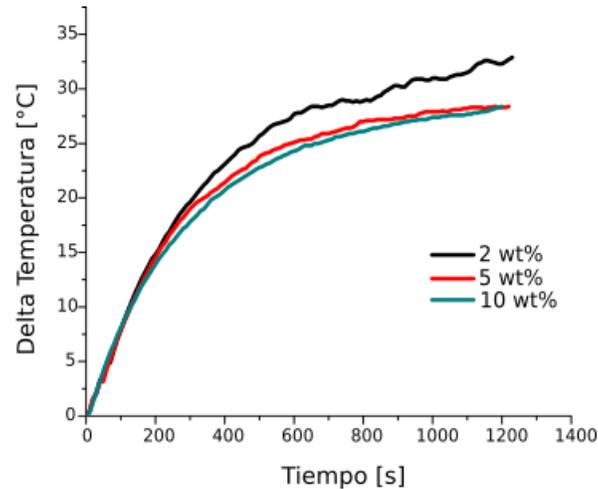


Fig. 13. Delta de temperatura en bloques de PDMS de 1 cm³ con diferentes concentraciones de grafito excitados con un led plano de luz blanca de 3W de potencia.

Por los resultados de la prueba de concepto se funcionalizó la base del biorreactor de PDMS con 2 wt% de partículas de grafito y se empleó el led plano de 3 W como fuente de luz para generar el efecto fototérmico (**Fig. 14**).

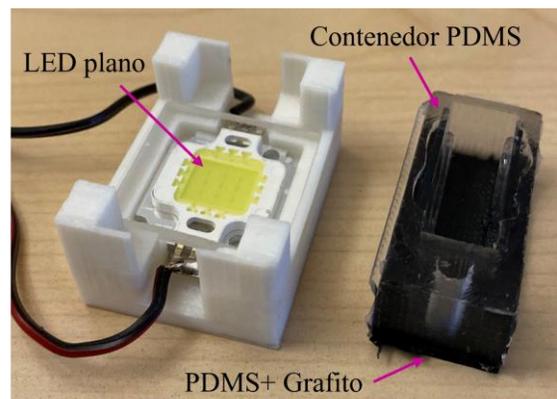


Fig. 14. Contenedor de PDMS con base funcionalizada con grafito y LED plano como fuente de luz para generar el efecto fototérmico.

El moldeo suave se realizó en dos etapas, primero se formó la base del biorreactor depositando en el molde la mezcla PDMS/grafito. Al tener una polimerización intermedia de la mezcla PDMS/grafito, se depositó PDMS para formar el contenedor de la suspensión, buscando mantener la transparencia óptica para el sensor de pH. Se logró que la base y el contenedor al polimerizar formaran el biorreactor en sola pieza (**Fig. 14**).

La temperatura se mantuvo controlada a 38°C usando un controlador proporcional-integral-derivativo (PID). Para realizar la sintonización del controlador se empleó el método de Ziegler-Nichols (Ellis, 2012), el cual se basa en obtener la respuesta al escalón. La implementación fue con un microcontrolador usando modulación por ancho de pulsos (PWM por sus siglas en inglés) y un sensor de temperatura DS18B20, logrando un sobrepaso máximo de 1.5% y un tiempo de asentamiento de 12 minutos (**Fig. 15**).

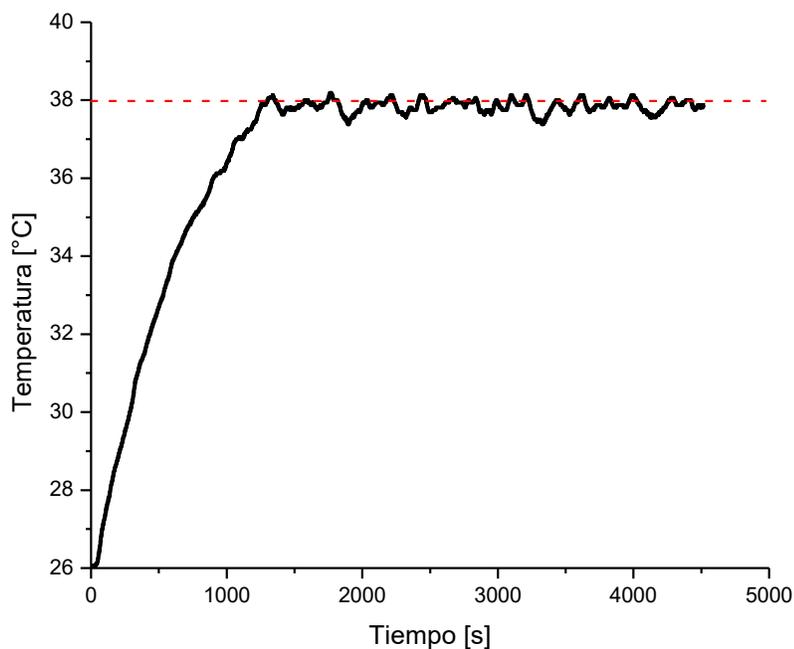


Fig. 15. Temperatura del biorreactor controlada a 38°C mediante el efecto fototérmico.

3.2 Celda para mediciones de EIS

La plataforma para mediciones de EIS está conformada por los electrodos de medición, la tarjeta de conexiones eléctricas (PCB por sus siglas en inglés), la celda para la muestra y un potenciostato (PalmSens4). La celda se elaboró con PDMS por moldeo suave, con un área de 35 mm^2 y una altura de 3 mm, para un volumen de muestra de $100 \mu\text{L}$. La celda se diseñó y fabricó para que los electrodos estén embebidos en ella (**Fig. 16**).

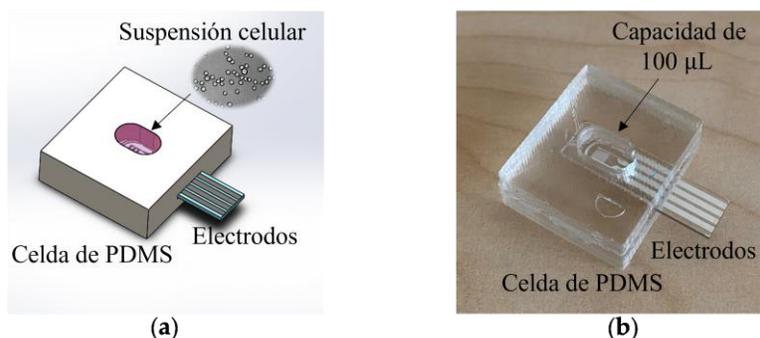


Fig. 16. a) Esquema y b) fotografía de la celda de PDMS para mediciones de EIS.

Los electrodos de medición utilizados fueron de la marca DropSens™ DRP-G-IDE555, elaborados de platino sobre un sustrato de vidrio por tecnología de litografía óptica, conformados por un electrodo de referencia (RE), un contra electrodo (CE) y dos electrodos de trabajo, de los cuales solo se empleó uno (WE) (**Fig. 17**).

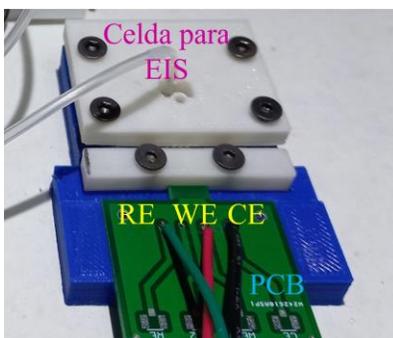


Fig. 17 Celda para las mediciones de EIS integrada con la celda de PDMS, los electrodos y la PCB.

3.3 Integración de la plataforma con el biorreactor y la celda EIS

En la Fig. 18 se muestra el esquema de la integración de los componentes de la plataforma. Para llevar una alícuota del biorreactor a la celda EIS se empleó una bomba de infusión con la capacidad de bombear en dos direcciones y una electroválvula de dos vías de entrada y una de salida. La capacidad del contenedor del biorreactor es de 2.5 mL, la tubería consume un volumen de 0.5 mL que nuevamente se ingresa al contenedor.

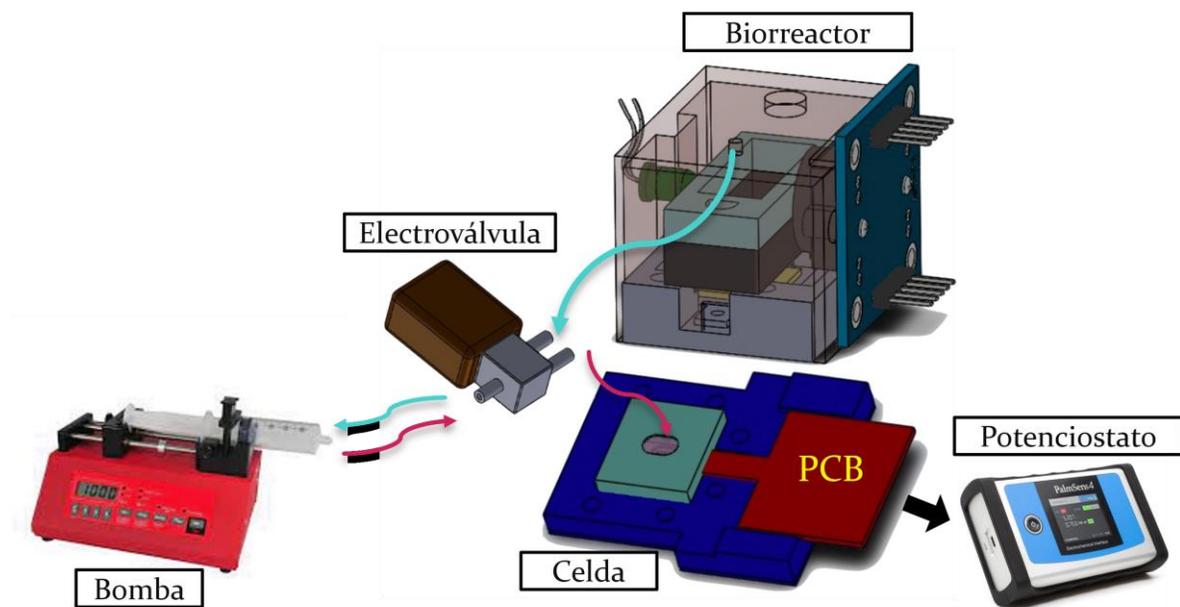


Fig. 18. Esquema de la plataforma integrada por el biorreactor, la celda EIS, una bomba de infusión y una electroválvula.

Capítulo IV

RESULTADOS DE MEDICIONES DE ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA (EIS)

4.1 Caracterización de la plataforma

Las mediciones de impedancia electroquímica se realizaron empleando la celda de la Fig. 17 y el potenciostato comercial PalmSens4 en un rango de frecuencias de 1000-10 Hz, con una señal de excitación de 25 [mV]. Inicialmente se emplearon unos electrodos de la marca DropSens™ G-MEAB555, en los cuales el electrodo de trabajo es una superficie metálica de platino, cubierta por una resina SU-8 que ha sido microperforada en 21 bandas de 10 μm de ancho y distancia entre bandas de 100 μm . En las mediciones con suspensiones un remanente de partículas quedaba dentro de las bandas del electrodo de trabajo, generando que por el proceso de limpieza se degradara rápidamente la capa de SU8. Para tener una respuesta reproducible se emplearon los electrodos DropSens™ DRP-G-IDE555, mencionados en la sección 3.2, los cuales tienen dos electrodos de trabajo interdigitados, por lo tanto, ya no tienen la capa de SU8. Los dos electrodos de trabajo están compuestos por 52 bandas, con una banda prohibida y un ancho de banda de 10 μm . Para las mediciones solo se utilizó uno de los electrodos de trabajo.

La caracterización de la plataforma se realizó mediante mediciones de EIS con suero fisiológico (SF), el cual consiste en una solución salina al 0.9%, correspondiendo a una molaridad de 0.154 mol/L. Empleando una bomba de infusión se inyectó SF a una tasa de $40 \frac{\mu\text{L}}{\text{min}}$ a la celda, se obtuvo su espectro y mediante otra bomba se drenó a una tasa de $150 \frac{\mu\text{L}}{\text{min}}$. Se realizaron tres mediciones consecutivas inyectando y drenando en cada ocasión la muestra. Los diagramas de Bode de las tres mediciones se presentan en la **Fig. 19**. En la

Fig. 19a se muestra la magnitud de la impedancia electroquímica de las tres mediciones y el promedio, teniendo una desviación estándar máxima (δ_m) del 0.3%. Para el caso de la fase (**Fig. 19b**) la δ_m fue del 1%.

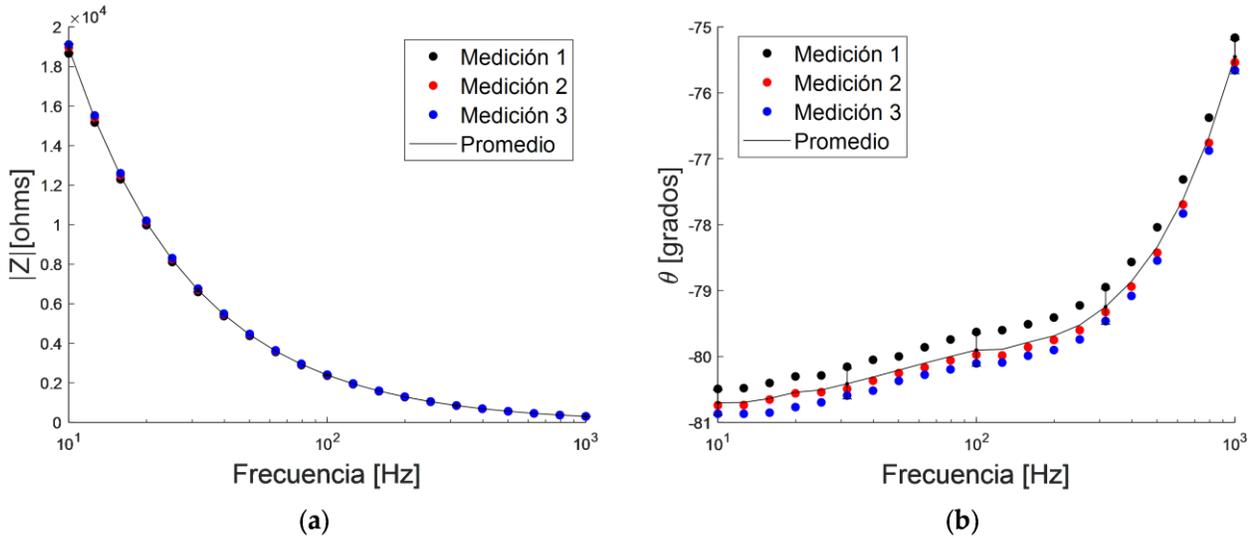


Fig. 19. Espectro de impedancia electroquímica de suero fisiológico (SF) representada con su **a)** magnitud y **b)** ángulo de fase para tres mediciones y su promedio.

4.2 Mediciones de EIS de suspensiones de fantasmas biológicos (partículas de PMMA) en suero fisiológico

El experimento en condiciones controladas se realizó con suspensiones de partículas de Poly ((methyl-methacrylate) PMMA) en suero fisiológico (SF), usadas para simular a las suspensiones celulares. Las partículas (p) utilizadas tienen un diámetro de 6, 15 y 48 micrómetros ($\phi_1 = 6, \phi_2 = 15, \phi_3 = 48 \mu\text{m}$), realizando suspensiones para cada tamaño. Partiendo de una suspensión inicial de 400 p/ μL se realizaron diluciones seriadas, resultando para cada tamaño de partícula cinco concentraciones (c_i para $i = 1,2,3,4,5$): c_5, c_4, c_3, c_2 y c_1 , con una cantidad de 400, 200, 100, 50 y 25 p/ μL , respectivamente.

En la **Fig. 20** se representan los diagramas de Bode de los espectros de impedancia electroquímica promedio de tres alícuotas para las suspensiones con partículas de ϕ_1 , teniendo una δ_m del 2%. En la **Fig. 20a** se presentan los espectros de la magnitud de la impedancia electroquímica ($|Z|$), se observa que, al ir disminuyendo la frecuencia, su valor es menor conforme aumenta la concentración de las suspensiones, sin embargo, para las suspensiones con mayor cantidad de partículas (c_4 y c_5) no se observan diferencias significativas. Respecto a la fase (θ) (**Fig. 20b**), no se observa una tendencia en función de la concentración de la suspensión.

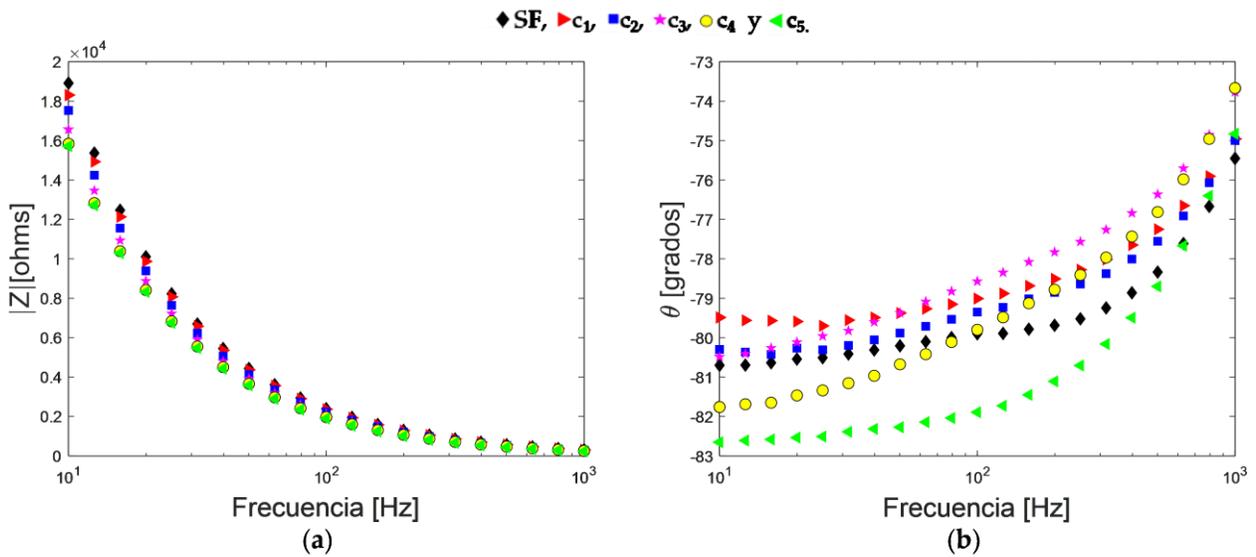


Fig. 20. Espectros de impedancia electroquímica para suspensiones de partículas de PMMA de $\phi_1 = 6 \mu\text{m}$ en suero fisiológico (SF) representados con su **a)** magnitud y **b)** ángulo de fase.

En la **Fig. 21** se representan los diagramas de Bode de los espectros de impedancia electroquímica promedio de tres alícuotas para las suspensiones con partículas de ϕ_2 , teniendo una δ_m del 1%. En la **Fig. 21a** se presenta el espectro de $|Z|$, se observa que, al ir disminuyendo la frecuencia, su valor es menor conforme aumenta la concentración de las suspensiones, solo aplicable para el SF, c_1 y c_2 , pues para c_3 , c_4 y c_5 no se observan diferencias significativas. Respecto a θ (**Fig. 21b**), por arriba de los 500 Hz, hay un aumento en su valor

entre el SF, c_1 , c_2 y c_3 , rompiendo esa tendencia con c_4 y c_5 . Al igual que para las mediciones de ϕ_1 , en ninguno de los espectros es visible un punto de inflexión del que se pueda desprender una frecuencia característica función de la concentración.

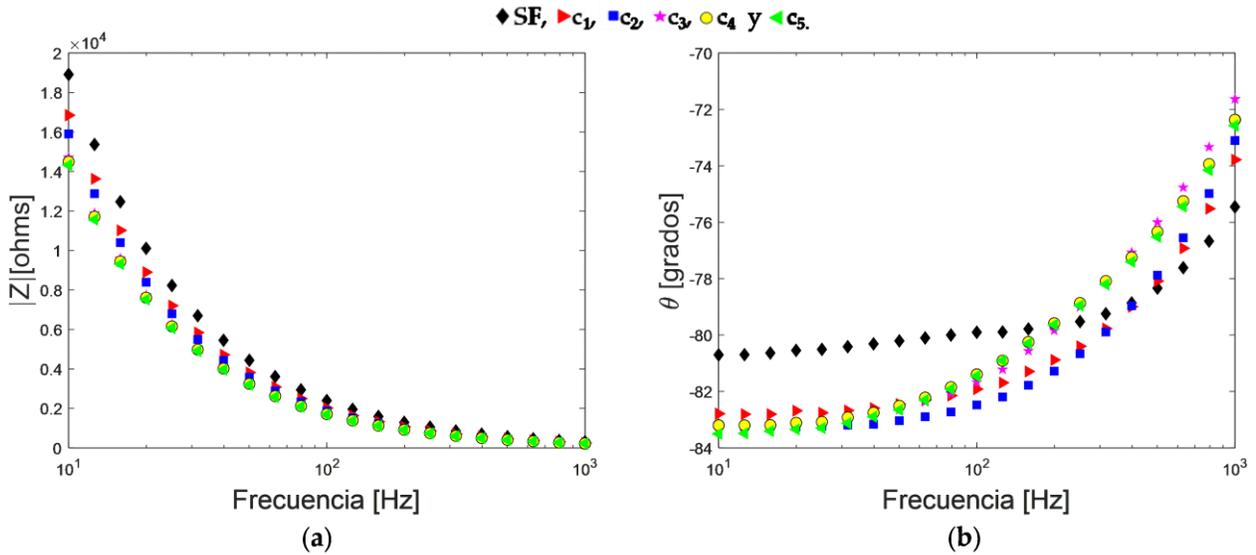


Fig. 21. Espectros de impedancia electroquímica para suspensiones de partículas de PMMA de $\phi_2=15 \mu\text{m}$ en suero fisiológico (SF) representados con su a) magnitud y b) ángulo de fase.

En la **Fig. 22** se representan los diagramas de Bode de los espectros de impedancia electroquímica promedio de tres alícuotas para las suspensiones con partículas de ϕ_3 , teniendo una δ_m del 2%. En la **Fig. 22a** se presenta el espectro de $|Z|$, resultando que no se observan diferencias entre las cinco concentraciones. Respecto a θ (**Fig. 22b**), por arriba de los 500 Hz, hay un aumento en su valor mientras más partículas hay suspendidas.

Del análisis de los diagramas de Bode se desprende que los espectros de impedancia del SF y las suspensiones de partículas son del mismo orden de magnitud, con cambios muy pequeños en sus valores, pero en algunos casos se observa una tendencia en función de la concentración. Dicha tendencia se observa en algunos casos en la amplitud y en otros en la fase.

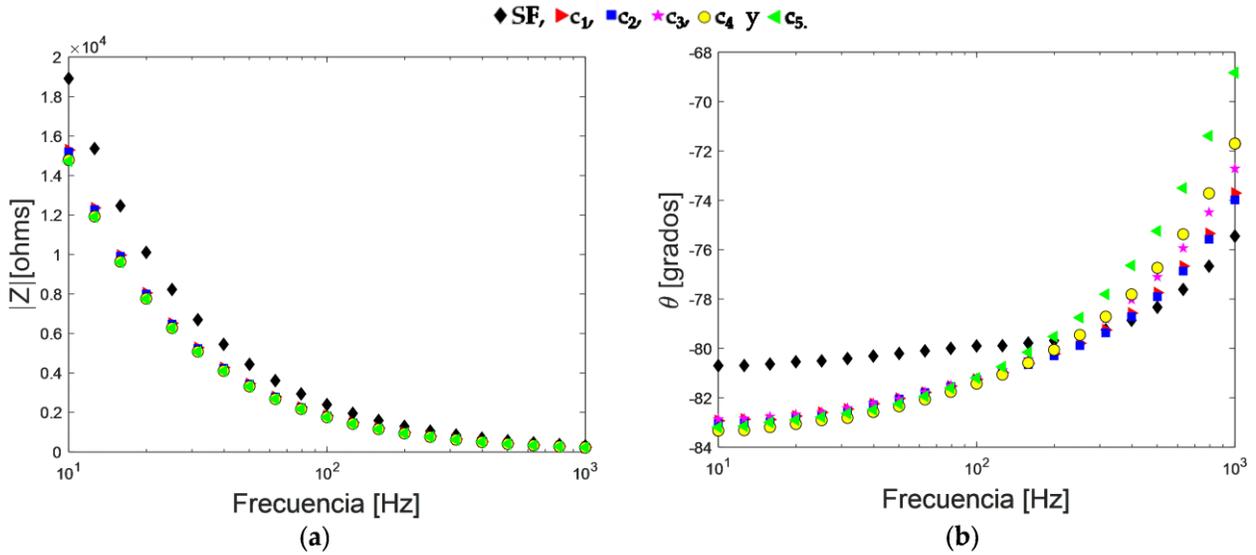


Fig. 22. Espectros de impedancia electroquímica para suspensiones de partículas de PMMA de $\phi_3 = 48 \mu\text{m}$ en suero fisiológico (SF) representados con su **a)** magnitud y **b)** ángulo de fase.

En la **Fig. 23**, incisos **a**, **b** y **c**, se representan los diagramas de Nyquist del espectro de impedancia electroquímica promedio de cada suspensión, para ϕ_1 , ϕ_2 y ϕ_3 respectivamente. Para ϕ_1 , **Fig. 23a**, se observa un decremento de la parte real e imaginaria de la impedancia conforme aumenta el número de partículas. En el caso de ϕ_2 , **Fig. 23b**, se observa un decremento de las componentes de la impedancia entre c_1 y c_2 , sin embargo, para c_3 , c_4 y c_5 el cambio es menor. Respecto a ϕ_3 , **Fig. 23c**, para todas las suspensiones no se observan cambios significativos entre las suspensiones.

De este análisis se desprende que encontrar cambios en los espectros de impedancia, desde su diagrama de Nyquist, en función de la concentración de las partículas, es bastante retardador.

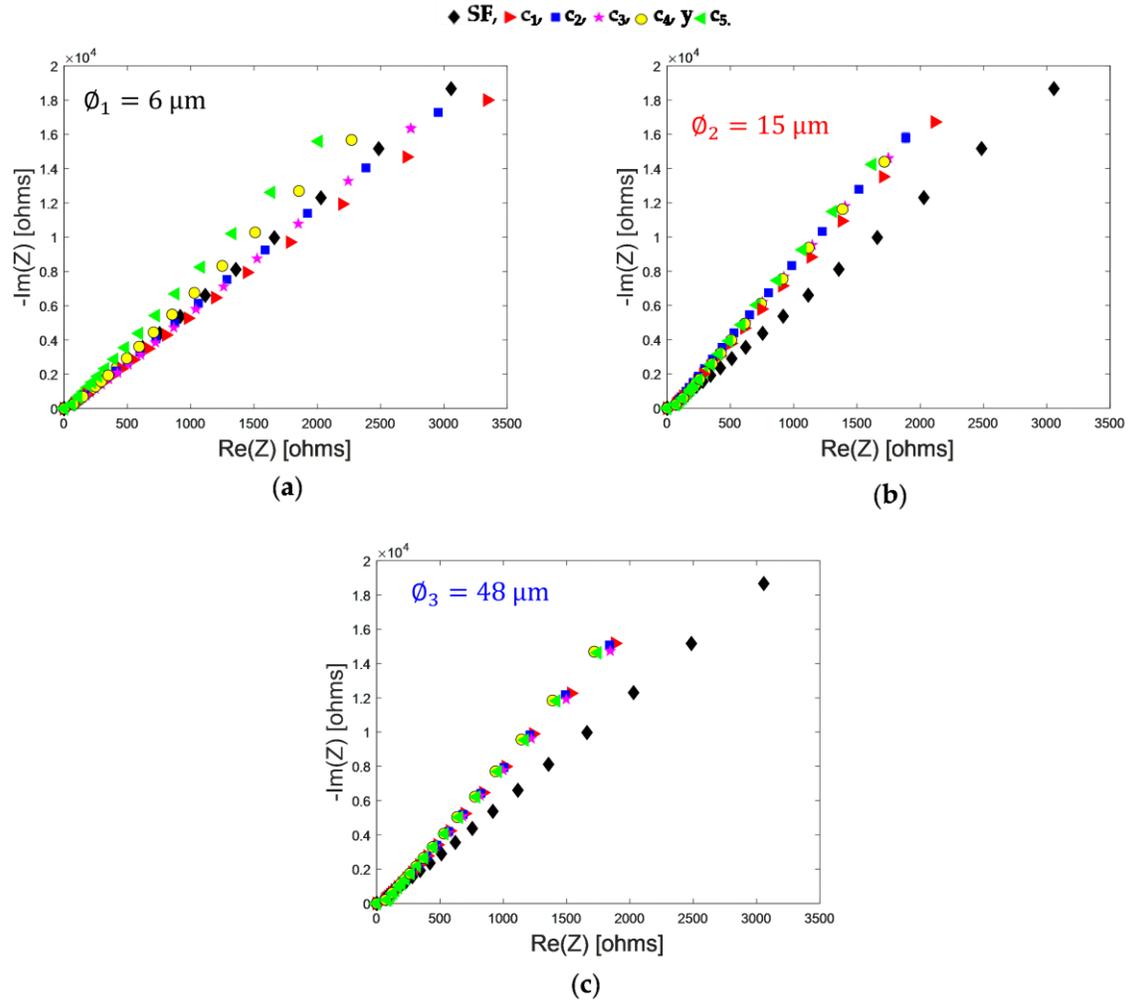


Fig. 23. Espectro de impedancia electroquímica de suspensiones de partículas de PMMA en SF, representado como Diagrama de Nyquist para **a)** ϕ_1 , **b)** ϕ_2 y **c)** ϕ_3 (De León-Hernández et al., 2022).

Los diagramas de Nyquist de las suspensiones de partículas muestran un comportamiento semejante al del circuito Randles, presentado en la sección 2.5, en la zona de bajas frecuencias, por lo tanto, es factible el análisis de los resultados con un circuito eléctrico equivalente basado en dicho circuito.

4.3 Mediciones de EIS de suspensiones celulares en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado

Las suspensiones celulares se realizaron con células no adherentes, las primeras con una línea celular cancerosa y las segundas con leucocitos. La línea celular cancerosa fue leucemia mieloide crónica K-562 (ATCC® CRL-1593.2) que se cultivó en medio de cultivo RPMI-1640 complementado con 10 % de suero fetal de bovino (SFB) y 1 % de penicilina-estreptomina, a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂. Cuando el cultivo alcanzó una confluencia aproximada del 85%, se propagó, renovándose el medio dos veces por semana.

Los leucocitos se obtuvieron de una muestra de sangre periférica humana. Se preparó un buffer de lisis para eliminar los glóbulos rojos (15.5 mM de NH₄Cl, 1 mM de KHCO₃ y 0.01 mM de EDTA). Los leucocitos se suspendieron en medio RPMI-1640 con 10 % de SFB descomplementado y 1 % de penicilina-estreptomina. Se dejaron durante 24 h a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂.

Las células fueron suspendidas en RPMI-1640 complementado con 10% de SFB y 1% de penicilina-estreptomina para la caracterización mediante EIS. Siguiendo la metodología de diluciones seriadas, se partió de una suspensión inicial de 400 cells/μL y se obtuvieron las cinco concentraciones (c_{cell_i}): c_{cell_5} , c_{cell_4} , c_{cell_3} , c_{cell_2} y c_{cell_1} , con una cantidad de 400, 200, 100, 50 y 25 cells/μL, respectivamente.

En la **Fig. 24** se representan los diagramas de Bode de los espectros de impedancia electroquímica promedio de tres alícuotas para las suspensiones de células K-562 en RPMI-1640 complementado, teniendo una δ_m del 3%. En la **Fig. 24a** se presentan los espectros de la $|Z|$, al ir disminuyendo la frecuencia, su valor tiene un ligero decremento conforme aumenta la concentración de las suspensiones. Respecto a θ (**Fig. 24b**), el comportamiento cambia alrededor de los 100 Hz. Entre 10 y 100 Hz, se observa un decremento de θ al aumentar la concentración, mientras que entre 100 y 100 Hz se observa un incremento de θ al aumentar la concentración.

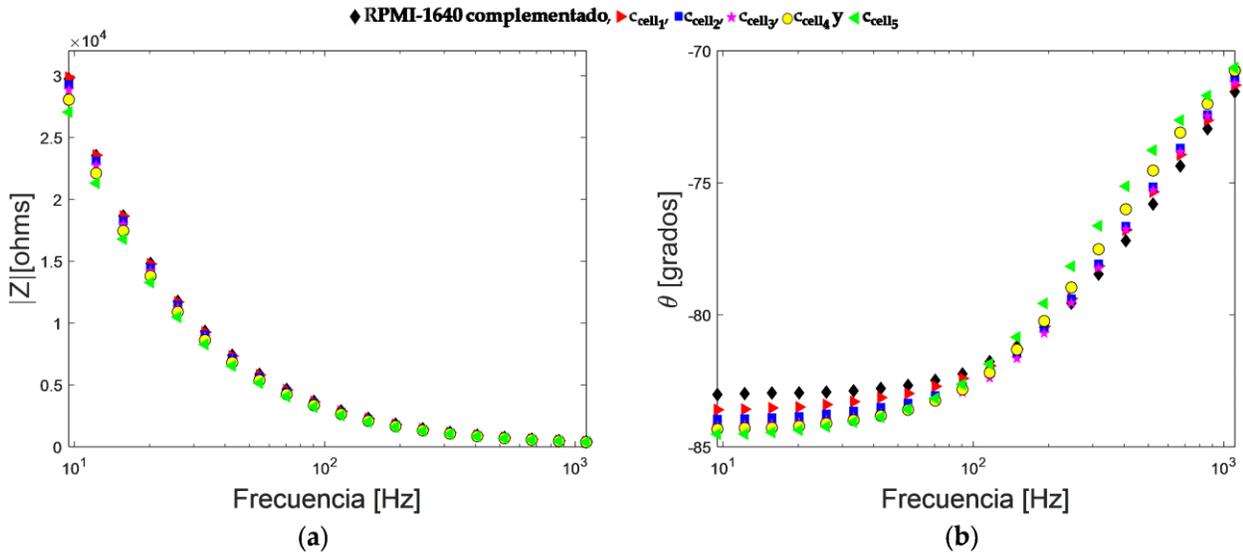


Fig. 24. Espectros de impedancia electroquímica para suspensiones de células K-562 en medio RPMI-1640 complementado representados con su **a)** magnitud y **b)** ángulo de fase.

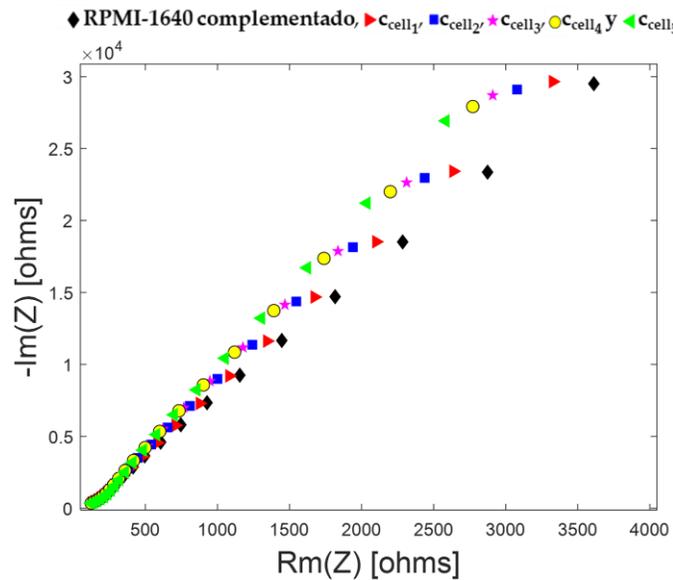


Fig. 25 Espectros de impedancia electroquímica de suspensiones de células K-562 en RPMI-1640 complementado representados como diagrama de Nyquist.

En la **Fig. 25** se representan los diagramas de Nyquist del espectro de impedancia electroquímica promedio de cada suspensión de células K-562 en medio RPMI-1640 complementado. Se observa un decremento de la parte real e imaginaria de la impedancia conforme aumenta el número de células K-562 suspendidas, resultando un comportamiento similar al encontrado para las suspensiones de partículas de PMMA en SF.

En la **Fig. 26** se representan los diagramas de Bode de los espectros de impedancia electroquímica promedio de tres alícuotas para las suspensiones de leucocitos en RPMI-1640 complementado, se obtuvo una δ_m de 36%, 16%, 3%, 6% y 1% para $c_{\text{cell}1}$, $c_{\text{cell}2}$, $c_{\text{cell}3}$, $c_{\text{cell}4}$ y $c_{\text{cell}5}$, respectivamente. En la **Fig. 26a** se presentan los espectros de la $|Z|$, al ir disminuyendo la frecuencia, su valor tiene un ligero decremento conforme aumenta la concentración de las suspensiones. Respecto a θ (**Fig. 26b**), por debajo de los 100 Hz, también se observa un ligero decremento conforme aumenta la concentración de las suspensiones.

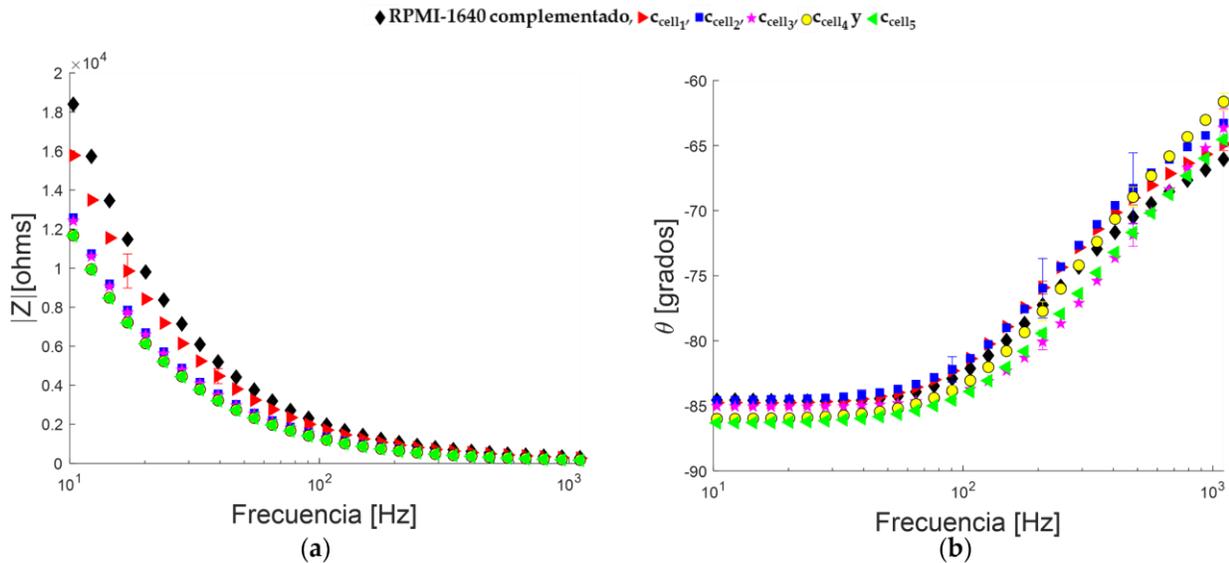


Fig. 26 Espectros de impedancia electroquímica para suspensiones de leucocitos en medio RPMI-1640 complementado representados con su **a)** magnitud y **(b)** ángulo de fase.

En la **Fig. 27** se representan los diagramas de Nyquist del espectro de impedancia eléctrica promedio de cada suspensión de leucocitos en medio RPMI-1640 complementado. Se observa un decremento de la parte real e imaginaria de la impedancia conforme aumenta el número de leucocitos suspendidos. Para las suspensiones de leucocitos, en comparación con los diagramas de Nyquist de las suspensiones de partículas de PMMA, en la zona de más alta frecuencias (lado derecho del diagrama) se observa un claro rompimiento en la tendencia de la línea oblicua.

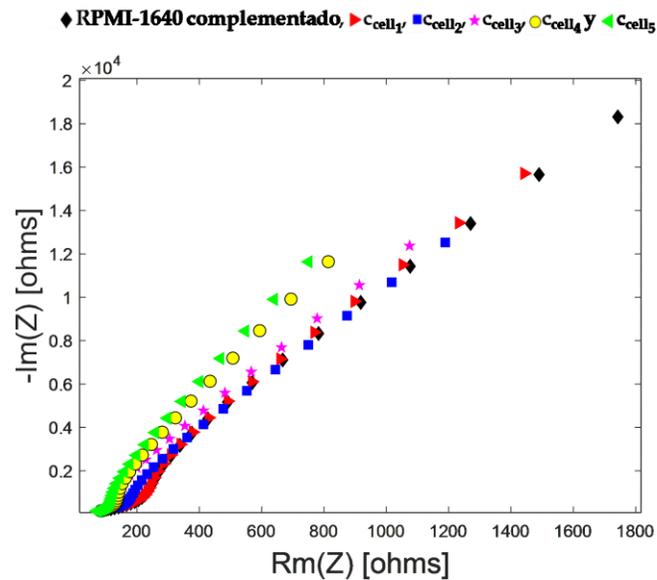


Fig. 27 Espectros de impedancia electroquímica de suspensiones de leucocitos en RPMI-1640 complementado representados como diagrama de Nyquist.

De este análisis se desprende que tanto para las suspensiones de partículas de PMMA, como de células K-562 y leucocitos, hay una tendencia que marca una disminución de la magnitud de la impedancia entre más medio disperso esté suspendido. Respecto a la fase, si bien se reflejan cambios en función de la concentración de la suspensión, para unos casos es un incremento y en otros un decremento, por lo que no sería posible una curva de calibración. De los diagramas de Nyquist, tanto para las partículas como para las células, se puede observar semejanza con el espectro del circuito Randles en la zona de bajas frecuencias.

Capítulo V

MODELO PARA LA CAPACITANCIA EFECTIVA DE LA DOBLE CAPA ELÉCTRICA

5.1 Circuito eléctrico equivalente para evaluar suspensiones de fantasmas biológicos y células

Del análisis de los resultados de las mediciones de EIS con suspensiones de partículas de PMMA y suspensiones de células K-562 y leucocitos, se desprendió que tienen un comportamiento semejante al del circuito Randles (**Fig. 5**, sección 2.5). En este trabajo se usa la base de este circuito para modelar los espectros obtenidos, remarcando que el interés es analizar los efectos capacitivos de la EDL.

La EDL de una superficie cargada puede no tener un comportamiento de un capacitor ideal debido a que la superficie puede ser porosa, rugosa y heterogénea (J. Yao et al., 2016). El paso de la corriente se ve afectado por anomalías en la estructura del límite de grano y por defectos estructurales, así mismo, las especies químicas extrañas adsorbidas influyen en el campo eléctrico local (McKubre & Macdonald, 2005). Un elemento eléctrico llamado elemento de fase constante (CPE por sus en inglés) es usado para modelar este comportamiento no ideal (Córdoba-Torres et al., 2015; Huang et al., 2007). La impedancia eléctrica de un CPE se define como:

$$Z_{\text{CPE}} = \frac{1}{T(i\omega)^P} = \frac{1}{T(\omega)^P} \left(\cos\left(\frac{\pi P}{2}\right) - i * \sin\left(\frac{\pi P}{2}\right) \right), \quad (5.11)$$

donde $T [Fs^{P-1}]$ es la constante del CPE, $i = \sqrt{-1}$ es el número imaginario, ω es la frecuencia angular y la variable P es $0 \leq P \leq 1$. El caso donde $P=1$ describe un capacitor ideal, mientras que el caso donde $P=0$ describe una resistencia ideal.

En la **Fig. 28**, se muestra el circuito eléctrico propuesto para modelar los espectros de impedancia eléctrica para las suspensiones de partículas y células. En el circuito, CPE_s representa las propiedades de la suspensión en bulto. A diferencia del circuito Randles, en el cual la suspensión en bulto se modela como un elemento puramente resistivo; el cual se puede visualizar en el lado izquierdo del diagrama de Nyquist (**Fig. 5**, sección 2.5), correspondiendo a frecuencias mayores; aquí se modela con un CPE. En nuestro caso, de los espectros obtenidos para las suspensiones, se observó un comportamiento diverso por arriba de los 100 Hz. Para tener un circuito eléctrico equivalente que pueda ser aplicable a todas las suspensiones caracterizadas y con ello encontrar curvas en función de la concentración, se empleó en CPE para modelar la suspensión en bulto y abarcar los diversos comportamientos encontrados. Por otra parte, C_e representa la capacitancia asociada con la interfaz electrodo-electrolito, R_d y CPE_d representan la resistencia y capacitancia de la EDL alrededor del medio disperso.

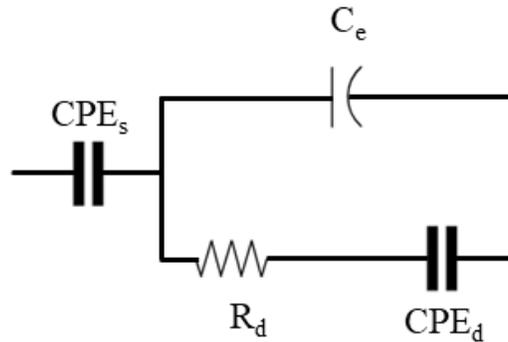


Fig. 28. Circuito eléctrico propuesto para analizar los datos de impedancia de partículas o células en suspensión (De León-Hernández et al., 2022).

Existen diversos métodos que permiten asociar la impedancia de un elemento de fase constante con una capacitancia efectiva. La capacitancia efectiva asociada al medio disperso (C_d) está en paralelo con la capacitancia de los electrodos C_e , resultando una capacitancia efectiva total dada por:

$$C_{ef} = C_e + C_d. \quad (5.12)$$

La capacitancia C_d se determina empleando una analogía con el modelo de Cole-Cole (Brug et al., 1984), resultando la C_{ef} total como:

$$C_{ef} = C_e + (T_d * R_d^{1-P_d})^{\frac{1}{P_d}}, \quad (5.13)$$

donde T_d es la constante y P_d el exponente del CPE_d .

5.2 Simulaciones numéricas

El comportamiento eléctrico de la capacitancia efectiva se analiza a través de simulaciones del circuito eléctrico equivalente propuesto (**Fig. 28**). Se establecieron valores a los elementos eléctricos (Tabla 1), siendo R_d y T_d constantes y probando tres combinaciones de C_e y P_d , siendo los elementos que provocan un mayor cambio en C_{ef} y están involucrados con la EEDL y la EDL del medio disperso.

Tabla 1. Valores para los elementos del circuito eléctrico (Fig. 6) y su capacitancia efectiva asociada, empleando $R_d = 10 \text{ k}\Omega$ y $T_d = 1 * 10^{-6} \text{ F} * \text{s}^{P-1}$.

Caso	C_e [μF]	P_d	C_{ef} [μF]
a	1	0.7	1.1
b	1	0.8	1.3
c	1	0.9	1.6
d	2	0.9	2.6
e	4	0.9	4.6

En los casos a, b y c, se mantiene a C_e constante, aumentando al exponente P_d . Esto implica que un aumento de la cantidad del medio disperso aumentaría C_d y por lo tanto aumentaría C_{ef} . En los casos c, d y e, el exponente P_d es constante y se aumenta C_e . Esto implica que un aumento de la capacitancia de la interfaz electrodo-electrolito, ya sea por un cambio en la

concentración iónica del electrolito o por adsorción específica (Q. Zhang et al., 2014), también provoca un aumento de la capacitancia total C_{ef} .

En la **Fig. 29a** y **Fig. 29b** se presenta el espectro de impedancia de 1000 a 10 Hz para la magnitud y el ángulo de fase, respectivamente. Para los casos a, b y c, un incremento de P_d , provoca un aumento de C_d . A bajas frecuencias el aumento de C_d provoca un decremento de la magnitud. Respecto a la fase, se observa un incremento en el ángulo, teniendo la formación de un pico cuyo valor máximo está alrededor de 25 Hz e incrementa con C_d . Para los casos c, d y e, el aumento de C_e provoca un decremento tanto de la magnitud como del ángulo de fase. El valor máximo del pico del ángulo de fase disminuye cuando aumenta C_e .

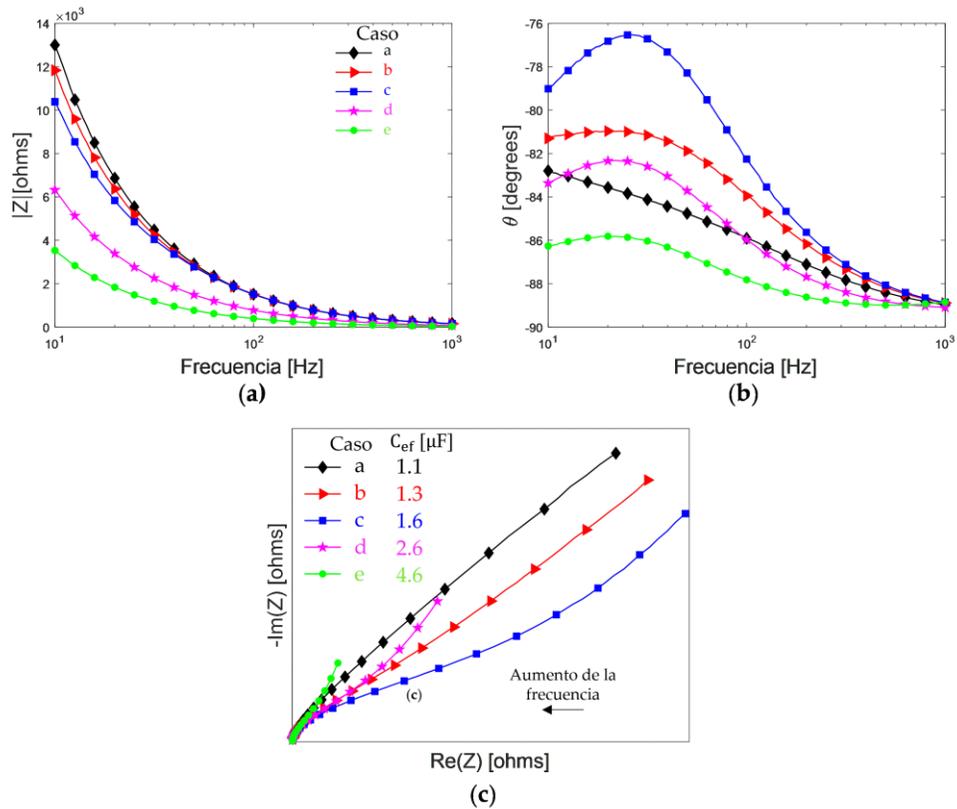


Fig. 29. Espectro de impedancia del circuito eléctrico propuesto representado con su a) magnitud, b) fase y c) diagrama de Nyquist con los valores de $T_s = 0.1 \text{ F} * \text{s}^{P-1}$, $P_s = 0.3$ y $R_d = 10 \text{ k}\Omega$ y los valores para los elementos reportados en la tabla 1 (De León-Hernández et al., 2022).

En la **Fig. 29c**, los diagramas de Nyquist para todos los casos se representan en el primer cuadrante del plano complejo. Para los casos, a, b y c, en bajas frecuencias se observa una pendiente pronunciada que cambia cuando aumenta C_d , resultando un incremento de la parte real y una disminución de la parte imaginaria. Para frecuencias mayores, hay una tendencia a la formación de un semicírculo. Este comportamiento implica que un aumento en la capacitancia asociada con el medio disperso genera una redistribución iónica que se sintetiza como un aumento de C_{ef} . Para los casos c, d y e, a bajas frecuencias se observa un acortamiento de la pendiente pronunciada cuando aumenta C_e , implicando una disminución tanto de la parte real como de la parte imaginaria. Para frecuencias mayores, prevalece la tendencia a la formación de un semicírculo. Por consiguiente, un aumento en la capacitancia asociada al electrodo también se sintetiza como un aumento del parámetro C_{ef} . Los resultados anteriores muestran que mediante C_{ef} se puede unificar al circuito eléctrico y con ello analizar cambios asociados al medio disperso.

Capítulo VI

ANÁLISIS DE RESULTADOS CON EL MODELO DE CAPACITANCIA EFECTIVA

Se presentan dos métodos de análisis para EIS, el primero consiste en un tratamiento directo de los datos, normalizando la magnitud de la impedancia de la suspensión respecto al SF, con la finalidad de observar sólo la respuesta eléctrica del medio disperso. El segundo método es la determinación de una capacitancia efectiva de las múltiples EDLs, a través de los elementos de un circuito eléctrico propuesto. Se muestran las ventajas y desventajas de ambas formas de análisis.

Como se mencionó en el capítulo I, en la técnica ECIS una manera usual de monitorear cambios a través de impedancia eléctrica, es con un parámetro denominado índice celular (I_c). El I_c resulta de la normalización de la impedancia eléctrica de la monocapa celular respecto a la impedancia del medio de cultivo (Hassan et al., 2020; Kho et al., 2015; van Kralingen et al., 2013). Aplicando este enfoque a las suspensiones celulares, se realiza la normalización de la magnitud de la impedancia electroquímica con respecto a la medición del medio líquido. Es decir, se normaliza el espectro de la magnitud de la impedancia de las suspensiones, de acuerdo con:

$$DM_i = \frac{|Z|_S - |Z|_{LM}}{|Z|_{LM}}, \quad (6.11)$$

donde DM_i se refiere al índice del medio disperso, $|Z|_S$ representa la magnitud de la impedancia de la suspensión (medio disperso en el medio líquido) y $|Z|_{LM}$ representa la magnitud de la impedancia del medio líquido.

6.1 Análisis de las mediciones de EIS de suspensiones de fantasmas biológicos (partículas de PMMA) en suero fisiológico

En la Fig. 30, incisos a, b y c, se presenta el espectro normalizado de la magnitud de la impedancia, para ϕ_1 , ϕ_2 y ϕ_3 respectivamente. El valor basal del DM_i es cero, que le corresponde al medio líquido, en este caso SF.

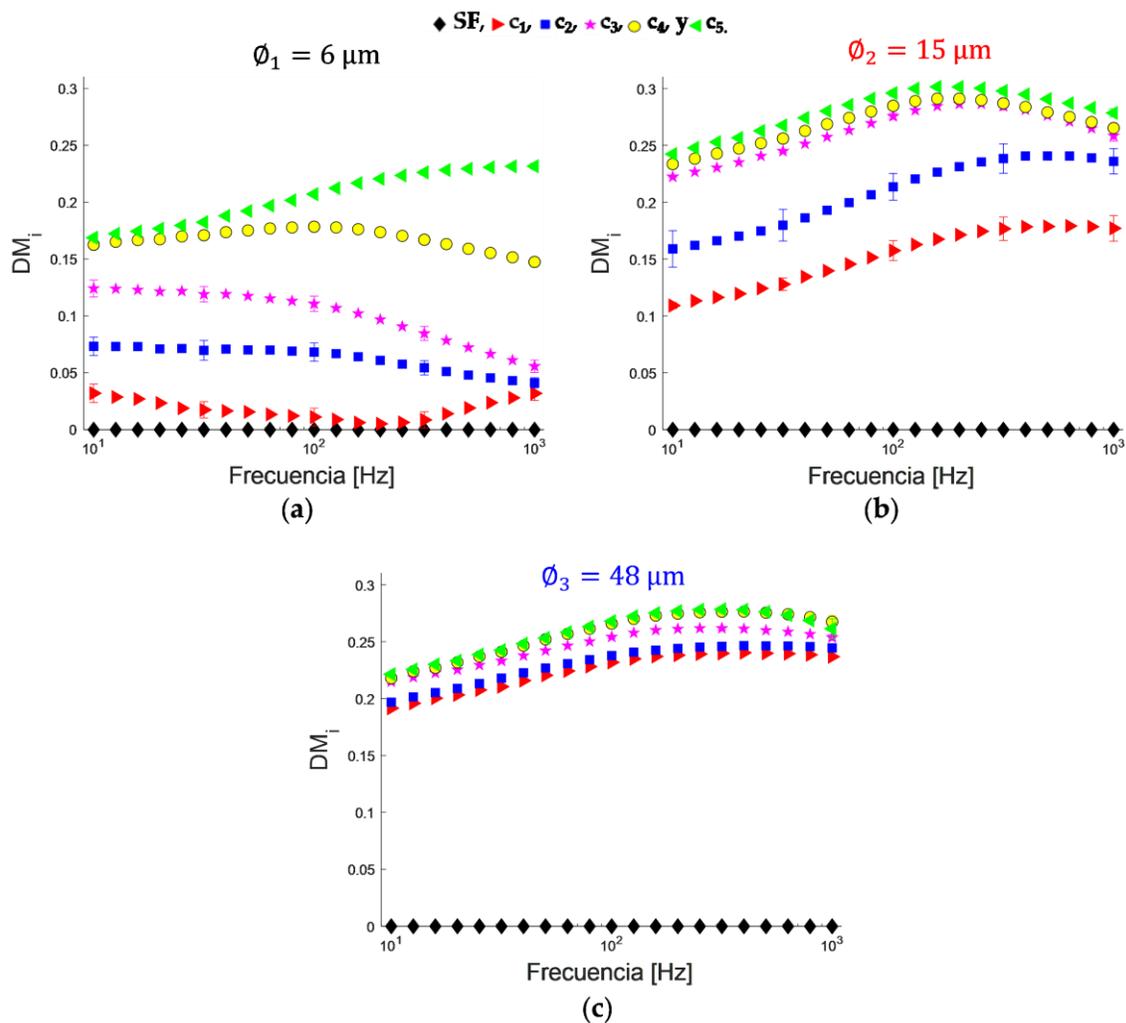


Fig. 30. Espectro de impedancia electroquímica de suspensiones de partículas de PMMA en SF, representado como DM_i para a) ϕ_1 , b) ϕ_2 y c) ϕ_3 (De León-Hernández et al., 2022).

Para las partículas de ϕ_1 , **Fig. 30a**, se observa un incremento del DM_i conforme aumenta la cantidad de partículas, respetando un orden para las cinco suspensiones. En el caso de las partículas de ϕ_2 , **Fig. 30b**, se observa un incremento del DM_i para las cinco suspensiones, sin embargo, hay un cambio menor entre c_4 y c_5 . Finalmente, para partículas de ϕ_3 , **Fig. 30c**, también se tiene un incremento del DM_i , sin embargo, es un cambio menor para las cinco suspensiones entre sí.

Al aumentar el tamaño de las partículas se observa una disminución en la tasa del incremento del DM_i , lo cual se explica por la fracción de volumen (FV) de las suspensiones. La suspensión c_1 tiene 2500 partículas y una $FV * 10^{-4}$ de 0.03, 0.4 y 14, para ϕ_1 , ϕ_2 y ϕ_3 respectivamente, por lo tanto, el volumen del medio disperso aumenta según el tamaño de las partículas (Tabla 2).

Tabla 2. Fracción de volumen para las suspensiones de partículas de PMMA de ϕ_1 , ϕ_2 y ϕ_3 .

ϕ [μm]	ϕ_1	ϕ_2	ϕ_3
c_i	$FV * 10^{-4}$		
c_1	0.03	0.4	14
c_2	0.06	0.9	29
c_3	0.1	2	58
c_4	0.2	4	120
c_5	0.5	7	230

Para obtener una curva de calibración, desde el enfoque de un sensor, se busca maximizar la sensibilidad, por lo tanto, para obtener la curva del DM_i en función de c_i , se elige la frecuencia donde su valor entre cada concentración tenga la mayor diferencia, resultado ser a 50 Hz. El DM_i función de la frecuencia para las partículas de ϕ_1 (**Fig. 30a**), tiene un aumento consecutivo para las cinco suspensiones, es decir, incrementa conforme hay una mayor cantidad de partículas, los valores c_1 son cercanos al SF, indicando que es

predominantemente medio líquido, entre c_1 y c_5 hay un aumento de 0.02 a 0.19 (50 Hz) para una $FV \cdot 10^{-4}$ de 0.03 a 0.5.

Para las partículas de ϕ_2 (**Fig. 30b**), persiste un aumento de los valores del DM_i conforme aumenta la cantidad de partículas, incrementando de 0.14 a 0.28 (50 Hz) entre c_1 y c_5 . El DM_i tiene una mayor diferencia respecto al medio SF en comparación con ϕ_1 , sin embargo, las suspensiones c_3 , c_4 y c_5 tienen valores cercanos entre ellas, indicando que después de una $FV \cdot 10^{-4}$ de 2 disminuye la sensibilidad.

Finalmente, para las partículas de ϕ_3 , el DM_i incrementa de 0.22 a 0.25 (50 Hz) entre c_1 y c_5 , se observa que entre c_1 y el SF existe una diferencia más grande, en comparación con ϕ_1 y ϕ_2 , sin embargo, entre todas concentraciones la diferencia es muy poca. Lo anterior se debe a una $FV \cdot 10^{-4}$ muy grande, partiendo de 14 a 230.

En la **Fig. 31a** se presenta un ajuste del DM_i en función del logaritmo de la concentración (c_i) para una frecuencia de 50 Hz. Se realizó un ajuste mediante el método de mínimos cuadrados no lineales, obteniendo una tendencia en función de la cantidad de partículas para ϕ_1 , ϕ_2 y ϕ_3 . La bondad del ajuste es de $R^2=0.98$, $R^2=0.89$ y $R^2=0.94$ con una sensibilidad de 0.15, 0.12 y 0.03 $\mu\text{L}/\text{p}$ para, ϕ_1 , ϕ_2 y ϕ_3 , respectivamente. Por otro lado, para las suspensiones más concentradas c_4 y c_5 no hay una tendencia en función del tamaño, pues los datos de ϕ_3 se encuentran entre ϕ_1 y ϕ_2 .

Mediante el algoritmo de optimización de Levenberg-Marquardt, se realizó el ajuste con el circuito eléctrico propuesto (**Fig. 28**) y con ello se obtuvieron los parámetros eléctricos para calcular la capacitancia efectiva C_{ef} , resultando una bondad de ajuste de $R^2=0.97$, $R^2=0.95$ y $R^2=0.98$ con una sensibilidad de 1.7×10^{-7} , 0.8×10^{-7} y 0.5×10^{-7} $\mu\text{L} \times \text{F}/\text{p}$ para, ϕ_1 , ϕ_2 y ϕ_3 , respectivamente. En la **Fig. 31b** se presenta los resultados de la C_{ef} en función del logaritmo del número de partículas, resultando que C_{ef} cambia en función de la concentración (c_i). La C_{ef} tiene un valor mayor cuando hay más partículas suspendidas, lo cual corresponde a que la capacitancia efectiva de la EDL es mayor por aumentar la superficie neta cargada.

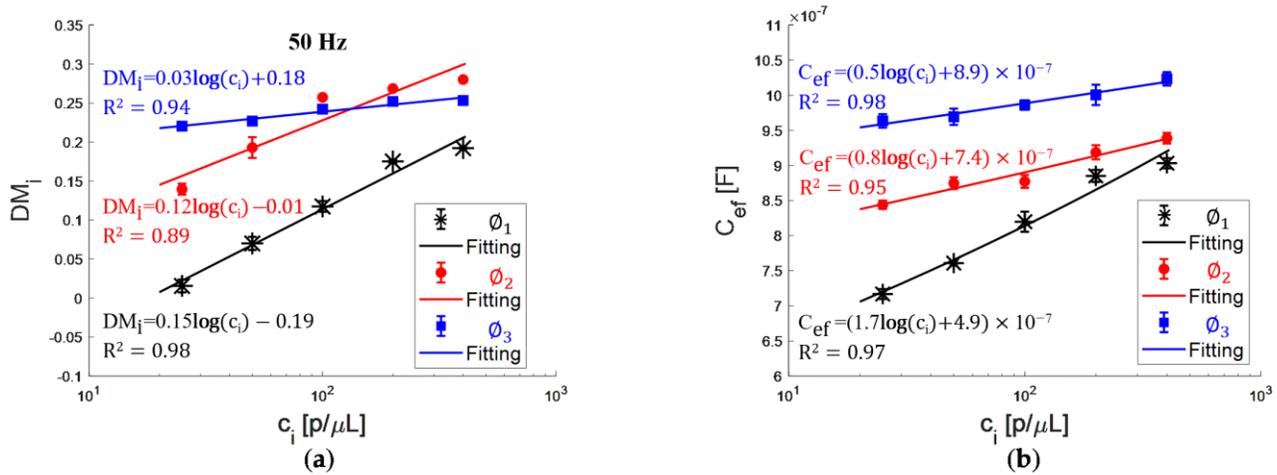


Fig. 31. a) Índice de medio disperso a 50 Hz y b) Capacitancia efectiva en función de la cantidad de partículas de PMMA de ϕ_1 , ϕ_2 y ϕ_3 suspendidas en Suero Fisiológico (De León-Hernández et al., 2022).

De acuerdo con los resultados de DM_i , para una frecuencia 50 Hz, se tienen curvas de ajuste en función de la concentración para los tres tamaños de partículas. Para las suspensiones con menos partículas es posible diferenciar entre ϕ_1 , ϕ_2 y ϕ_3 , mostrando limitantes para las suspensiones con más partículas con un ϕ_3 . La C_{ef} permite para los tres tamaños de partículas una curva de ajuste dependiente de la concentración, así como una tendencia por tamaño en las cinco suspensiones. La evaluación del espectro de impedancia mediante la C_{ef} presenta ventajas respecto al DM_i , ya que además de permitir un ajuste en función de la cantidad de partículas, también permite una tendencia por su tamaño, probado para una $FV * 10^{-4}$ en un rango de 0.03 a 230.

6.1.1. Modelo paramétrico para partículas de PMMA

Un modelo de regresión lineal múltiple (MRLM) permite ajustar un modelo lineal o linealizabile entre una variable dependiente y más de una variable independiente. Se aplicó un MRLM para las partículas de ϕ_2 , siendo la cantidad partículas suspendidas ($\frac{\rho}{\mu\text{L}}$) la variable dependiente y las variables predictoras el índice de medio disperso (DM_i) y la

capacitancia efectiva (C_{ef}). Para este modelo se linealizaron los datos empleando el logaritmo base diez de la concentración (c), resultando:

$$\log(c) = -5.94 + 3 * DM_i + 8.14 * 10^6 * C_{ef}. \quad (6.1.11)$$

Del ajuste se obtuvo una $R^2=0.98$ y del estadístico t se obtuvo un valor $p<0.05$, con lo cual se rechaza la hipótesis nula que establece que los coeficientes de las variables predictoras son cero. Lo anterior implica que existe una relación significativa entre la respuesta y las variables predictoras. Aplicando el modelo a los datos de la Fig. 20 se obtienen las concentraciones reportadas en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentración experimental y obtenida con el modelo paramétrico para las suspensiones de partículas de PMMA de ϕ_2 .

ϕ_2	c_5	c_4	c_3	c_2	c_1
	p/ μ L				
Experimental	400	200	100	50	25
Modelo	348	221	94	57	22
Error %	13	10	6	15	11

Finalmente, con este experimento mimético de partículas suspendidas se concluye que, con el modelo paramétrico, teniendo como variables predictoras el índice de medio disperso (DM_i) y la capacitancia efectiva (C_{ef}), se puede estimar la concentración del medio disperso, teniendo potencialidad para aplicarlo a células en suspensión.

6.2 Análisis de las mediciones de EIS de suspensiones celulares en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado

Aplicando la misma metodología que en el experimento mimético, se determinó el espectro del DM_i para las suspensiones celulares en RPMI-1640 complementado, tanto para la línea K-562 (**Fig. 32a**) como los leucocitos (**Fig. 32b**). Para las suspensiones de la línea K-562 se observa que para las cinco suspensiones hay un aumento progresivo función de la concentración, teniendo un DM_i mayor entre más células suspendidas. Respecto a las suspensiones de leucocitos, el DM_i también tiene un mayor valor entre más células suspendidas, sin embargo, c_{cell_2} y c_{cell_3} , así como c_{cell_4} y c_{cell_5} , tienen valores semejantes. Por su parte c_{cell_1} tiene una mayor diferencia respecto a las demás c_{cell_i} , sin embargo, es la medición con la desviación estándar más grande (36%).

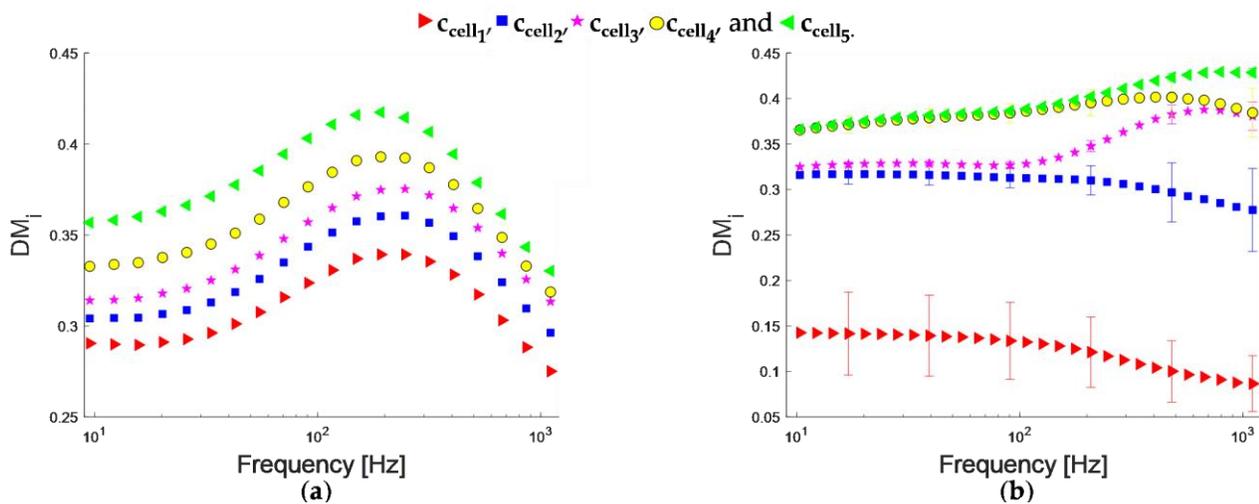


Fig. 32. Espectro de impedancia electroquímica representado como índice de medio disperso para **a)** células K-562 y **b)** leucocitos (De León-Hernández et al., 2022).

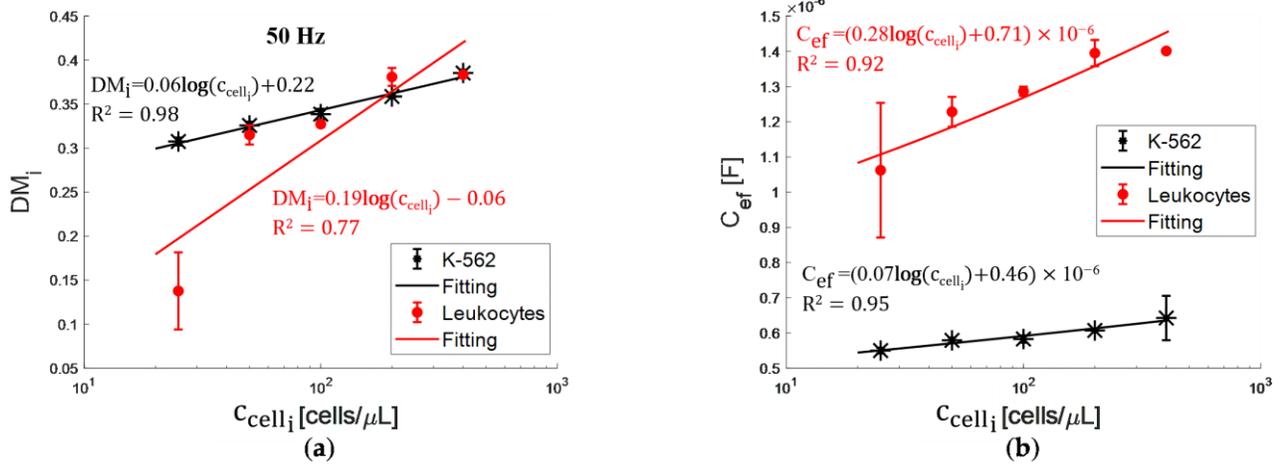


Fig. 33. a) Índice de medio disperso a 50 Hz y **b)** Capacitancia efectiva en función de la cantidad de células suspendidas en RPMI-1640 complementado (De León-Hernández et al., 2022).

En la **Fig. 33a** se presenta el ajuste del DM_i función de la concentración de las células (c_{cell_i}), para una frecuencia de 50 Hz, se obtuvo una bondad de ajuste de $R^2=0.98$ y $R^2=0.77$ con una sensibilidad de 0.06 y 0.19 $\mu\text{L}/\text{cells}$ para las células K-562 y los leucocitos, respectivamente. De los resultados se observa que, debido a la alta desviación estándar para los leucocitos, el ajuste no resulta adecuado, sin embargo, solo para la suspensión más diluida c_{cell_1} , se observa diferencia significativa con las células K-562.

Se realizó el ajuste con el circuito eléctrico propuesto y se calculó la capacitancia efectiva C_{ef} , resultando una bondad de ajuste de $R^2=0.95$ y $R^2=0.92$ con una sensibilidad de 0.07×10^{-6} y 0.28×10^{-6} $\mu\text{L} \times \text{F}/\text{cells}$ para las células K-562 y los leucocitos, respectivamente. En la **Fig. 33b** se presentan la C_{ef} en función de la concentración de las suspensiones celulares. La C_{ef} para las cinco suspensiones tuvo valores distintos entre las células K-562 y los leucocitos, obteniendo curvas de ajuste que no se entrecruzan, esto aún con la alta desviación estándar de los leucocitos. El DM_i y la C_{ef} arrojan comportamientos distintos según el tipo de células caracterizadas, por lo que ambas variables son útiles para predecir el comportamiento eléctrico.

6.2.1 Modelo paramétrico para células K-562

Aplicando un MRLM para las suspensiones celulares, siendo la cantidad de células K-562 la variable dependiente y las variables predictoras el índice de medio disperso y la capacitancia efectiva, resultó:

$$\log (c_{\text{cell}_i}) = -1.6 + 26.2 * DM_i - 9.2 * 10^6 * C_{\text{ef}}. \quad (6.2.11)$$

Del ajuste se obtuvo una $R^2=0.99$ y el valor $p<0.05$, implicando que existe una relación significativa entre la respuesta y las variables predictoras. Aplicando el modelo a los valores de la Fig. 22 se obtienen las concentraciones reportadas en la Tabla 4.

Tabla 4. Concentración experimental y obtenida con el modelo paramétrico para las suspensiones de células K-562.

K-562	c_{cell_5}	c_{cell_4}	c_{cell_3}	c_{cell_2}	c_{cell_1}
	cells/ μL				
Experimental	400	200	100	50	25
Modelo	394	167	83	41	25
Error %	1	16	17	17	0

Con este experimento de células suspendidas en medio de cultivo se concluye que con el modelo paramétrico se puede estimar la población celular, teniendo potencialidad para aplicarlo monitoreando muerte celular con un agente tóxico.

6.2.2 Ensayo de muerte en células K-562 mediante la alteración de pH

Se realizó un ensayo de muerte celular en las células K-562 suspendidas en RPMI-1640 mediante la alteración del pH por efecto de ácido acético (Hismiogullari et al., 2008). El experimento se realizó en el dominio del tiempo (t). Teniendo en el biorreactor 2 mL de suspensión con una población de 400 cells/ μL se aplicó 0.05% de ácido acético en $t = 0$. Se

tomó el espectro de impedancia cada diez minutos para una alícuota de 100 μL y se obtuvieron las variables predictoras para el modelo paramétrico de células K-562 (**Fig. 34a** y **34b**). Se puede observar que tanto el DM_i como la C_{ef} disminuyen en función del tiempo, implicando que hay decremento de la población celular. Así mismo se monitoreó el pH con el sensor óptico del biorreactor (**Fig. 10b**), teniendo un decremento en función del tiempo, el cual se origina por el propio ácido acético al disociarse en el medio de cultivo y que se asocia a muerte celular (Worsley et al., 2022).

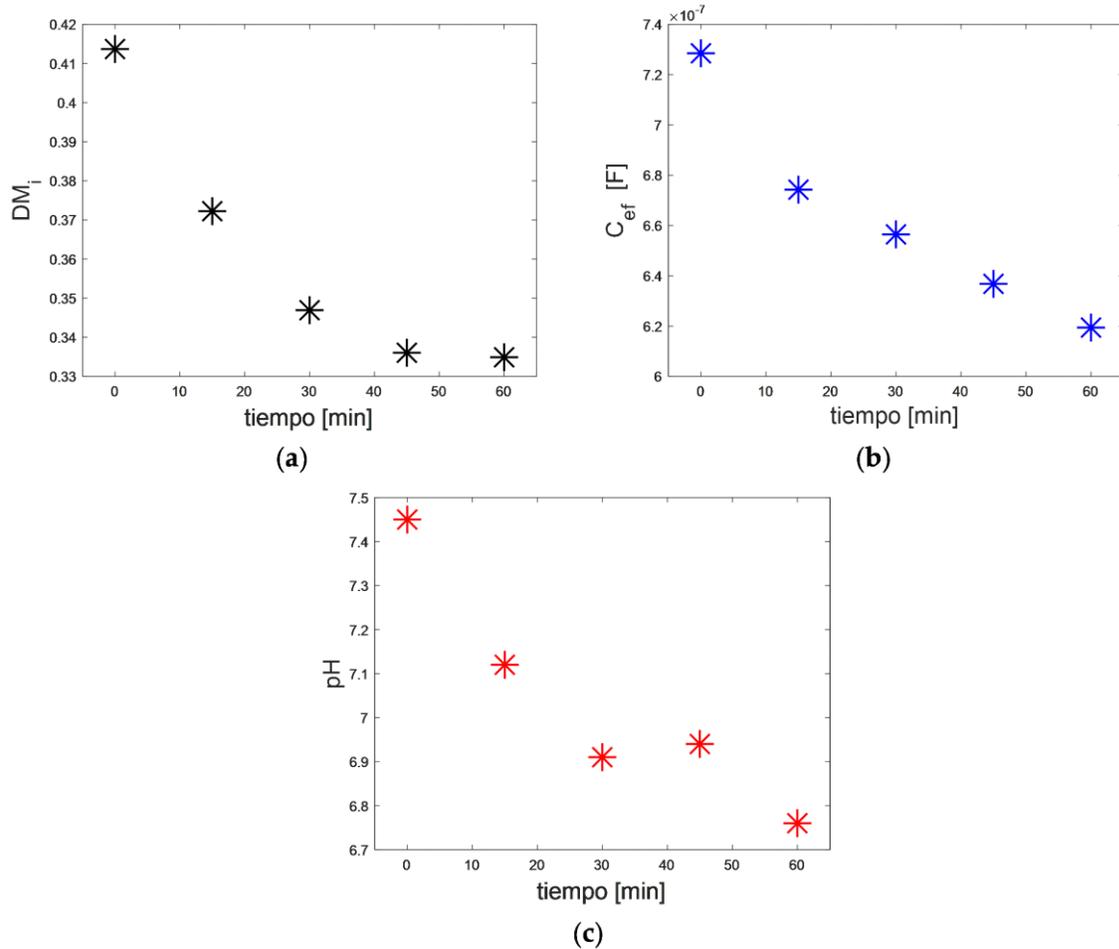


Fig. 34. a) Índice de medio disperso a 50 Hz y b) Capacitancia efectiva y c) pH en función del tiempo al aplicar 0.05% de ácido acético.

En la Tabla 5 se presentan los valores de concentraciones obtenidos al aplicar el modelo paramétrico, se puede observar que la población va disminuyendo en función del tiempo, partiendo de 400 cells/ μ L en $t = 0$ min y terminando en con 22 cells/ μ L en $t = 60$ min.

Tabla 5. Diminución de la población de células K-562 en el tiempo determinada con el modelo paramétrico.

	Tiempo [min]				
	0	15	30	45	60
K-562	cells/ μ L				
Modelo	281	79	34	28	22

CAPÍTULO VII.

CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO

En este trabajo de investigación se desarrolló una plataforma integrada por un biorreactor y una celda para mediciones de espectroscopía de impedancia eléctrica (EIS) de suspensiones celulares. Las mediciones de impedancia eléctrica se ajustaron a un circuito eléctrico equivalente buscando modelar el fenómeno de la doble capa eléctrica en un rango de frecuencias de 1000 a 10 Hz. El biorreactor se manufacturó por la técnica de moldeo suave en PDMS para un volumen de 2.5 mL y se instrumentó con un control de temperatura y monitoreo de pH. El control de temperatura se realizó con una fuente de calor generada por el efecto fototérmico, lograda al funcionalizar la base del dispositivo con un compuesto de PDMS y 2 wt% de partículas de grafito. Se implementó un controlador PID, sintonizado con el método de Ziegler-Nichols, teniendo un sobrepaso máximo de 1.5% y un tiempo de asentamiento de 12 minutos. El monitoreo de pH se realizó con un sensor basado en la absorción óptica de la molécula de rojo fenol presente en el medio de cultivo celular, instrumentado en un dispositivo compacto mediante un diodo emisor de luz blanca y un sensor TCS3200 que está integrado con una matriz de 16 fotodiodos. Del biorreactor se llevaron alícuotas de 100 μ L a la celda para su medición de impedancia electroquímica. En dicho rango espectral el fenómeno predominante en la caracterización eléctrica es la polarización de la doble capa eléctrica (EDL), formada tanto en la interfaz electrodo-electrolito como en el medio disperso.

El experimento mimético fue la caracterización de partículas de PMMA como medio disperso en un medio electrolítico, determinado una curva de ajuste en función de la concentración, para partículas de 6, 15 y 48 μ m de diámetro. Se emplearon dos métodos de análisis para los espectros de impedancia eléctrica, el primero consistió en el cálculo del parámetro denominado índice de medio disperso (DM_i), que resulta de la normalización de

la magnitud de impedancia de las suspensiones con respecto a la magnitud de la impedancia del medio líquido. El segundo método consistió en el ajuste a un circuito eléctrico equivalente y mediante sus parámetros la determinación de la capacitancia efectiva (C_{ef}) asociada a la EDL. De los resultados se encontró que para partículas de 6 y 15 μm , a una frecuencia de la señal de excitación de 50 Hz, el DM_i tiene una tendencia en función de la cantidad de partículas y del tamaño. Sin embargo, la curva de ajuste para partículas de 48 μm se encuentra entre las curvas de 6 y 15 μm , implicando que, para un análisis de tamaño de la muestra, el DM_i tiene limitantes a partir de una fracción de volumen de 58×10^{-4} .

Respecto a la C_{ef} para los tres tamaños de partículas y todas las concentraciones, se encontró una tendencia, permitiendo un análisis por la cantidad de muestra suspendida y por su tamaño. El DM_i es un método sencillo que solo requiere tratamientos aritméticos de los datos, teniendo limitantes para un análisis de cambios de tamaño de la muestra. Por su parte la C_{ef} es un método más complejo, que requiere de un algoritmo de optimización para obtener el ajuste con el circuito eléctrico propuesto, pero muestra un mejor resultado para el análisis del tamaño de la muestra. El DM_i y la C_{ef} describen información distinta, el DM_i describe solo los efectos de la polarización de la EDL del medio disperso y la C_{ef} describe la capacitancia efectiva de la EEDL afectada por la EDL del medio disperso, por lo tanto, ambos parámetros son valiosos y se emplearon para obtener un modelo paramétrico para determinar la concentración de las partículas suspendidas. El modelo tuvo una bondad de ajuste de $R^2=0.98$, implicando una relación significativa entre la respuesta y las variables predictoras.

Al igual que en las partículas con superficie cargada, cuando una excitación eléctrica externa es aplicada a células suspendidas en un medio electrolítico, la distribución iónica de la EDL de la membrana se modifica, por lo tanto, permite caracterizar la población suspendida. Se aplicaron los dos métodos de análisis para los espectros de impedancia de suspensiones de células cancerosas K-562 y leucocitos en RPMI-1640 complementado. Mediante el DM_i , se

obtuvo una curva de ajuste para los dos tipos de suspensiones celulares, sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas entre los valores para las células K-562 y los leucocitos (excluyendo a la suspensión más diluida). Al analizar los espectros de las suspensiones celulares mediante la C_{ef} , se encontraron dos curvas de ajuste con diferencias significativas entre las células K-562 y los leucocitos, mostrando que al igual que en partículas, este método muestra mayores diferencias respecto a la normalización del espectro.

Dado el comportamiento distinto entre el DM_i y la C_{ef} , implicando que cada parámetro tiene cierta información fisicoquímica presente, también se obtuvo un modelo paramétrico con ambas variables, resultando una bondad de ajuste de $R^2=0.99$. El modelo paramétrico permitió monitorear cambios en la población de las células K-562 al aplicar ácido acético, estableciendo las bases de una herramienta para monitorear muerte celular. Los procesos de muerte, como necrosis o apoptosis, implican un cambio de tamaño de la célula, lo cual, según el experimento mimético, se tiene capacidad de resolver. Para posicionar la plataforma como instrumento de uso cotidiano en laboratorios de cultivo celular, es necesario corroborar los resultados del ensayo de muerte celular con una técnica estándar, empezando con técnicas de tinción. Así mismo, resta realizar ensayos para determinar tipo de muerte celular, monitoreando los cambios de tamaño a través del tiempo y contrastar los resultados con técnicas específicas como citometría de flujo.

En este trabajo se desarrolló un instrumento y método de análisis para la caracterización eléctrica de células no adherentes, que en comparación con otras técnicas eléctricas como la ECIS, permite evaluarlas sin la necesidad de cultivarlas sobre los electrodos de medición. El método desarrollado explota el fenómeno de la polarización de la doble capa eléctrica de los electrodos y del medio disperso, en el cual se unieron los fenómenos presentes a bajas frecuencias mediante una capacitancia efectiva. Esta capacitancia efectiva se determinó al unificar los parámetros eléctricos de un circuito equivalente, mostrando que las variaciones exhibidas están en función de la concentración del medio disperso.

Una de las aplicaciones de esta plataforma es monitorear la porción de células comprometidas después de la exposición a un agente citotóxico, posicionándose entre técnicas manuales como el conteo mediante la cámara de Neubauer, en la cual la valoración visual de la tinción es subjetiva y se acarrean errores por conteo y extrapolación de datos; y técnicas especializadas como citometría de flujo, en la cual se requiere que las células sean marcadas con un colorante específico e implica una instrumentación costosa. Por dichas razones en este trabajo se establecen las bases para la investigación farmacológica y/o terapéutica de suspensiones celulares mediante el análisis en baja frecuencia, explotando la polarización la doble capa eléctrica, con un instrumento compacto y de bajo costo, usando una técnica in situ y en tiempo real.

REFERENCIAS

- Adams, J. D., Ebbesen, C. L., Barnkob, R., Yang, A. H. J., Soh, H. T., & Bruus, H. (2012). High-throughput, temperature-controlled microchannel acoustophoresis device made with rapid prototyping. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 22(7), 075017. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/22/7/075017>
- Asami, K. (2002). Characterization of biological cells by dielectric spectroscopy. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 305(1), 268–277. [https://doi.org/10.1016/S0022-3093\(02\)01110-9](https://doi.org/10.1016/S0022-3093(02)01110-9)
- Asami, K. (2012). Dielectric spectroscopy reveals nanoholes in erythrocyte ghosts. *Soft Matter*, 8(11), 3250–3257. <https://doi.org/10.1039/C2SM06306A>
- Attard, P. (1995). Ion condensation in the electric double layer and the corresponding Poisson-Boltzmann effective surface charge. *The Journal of Physical Chemistry*, 99(38), 14174–14181.
- Avelar-Freitas, B. A., Almeida, V. G., Pinto, M. C. X., Mourão, F. A. G., Massensini, A. R., Martins-Filho, O. A., Rocha-Vieira, E., & Brito-Melo, G. E. A. (2014). Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas*, 47(4), 307–315. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20143437>
- Bard, A. J., & Faulkner, L. R. (2001). *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications* (2nd Edition). JOHN WILEY.
- Brug, G. J., van den Eeden, A. L. G., Sluyters-Rehbach, M., & Sluyters, J. H. (1984). The analysis of electrode impedances complicated by the presence of a constant phase element. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 176(1), 275–295. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(84\)80324-1](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(84)80324-1)
- Chassagne, C., Dubois, E., Jiménez, M. L., van der Ploeg, J. P. M., & van Turnhout, J. (2016). Compensating for Electrode Polarization in Dielectric Spectroscopy Studies of Colloidal Suspensions: Theoretical Assessment of Existing Methods. *Frontiers in Chemistry*, 4. <https://doi.org/10.3389/fchem.2016.00030>
- Chen, J., Du, D., Yan, F., Ju, H. X., & Lian, H. Z. (2005) Electrochemical Antitumor Drug Sensitivity Test for Leukemia K562 Cells at a Carbon-Nanotube-Modified Electrode. *Chemistry—A European Journal*, 11(5), 1467–1472. <https://doi.org/10.1002/chem.200400956>
- Copyright 2009, TAOS Inc. (2009). *TCS3200, TCS3210 Programmable color light-to-frequency converter*.
- Córdoba-Torres, P., Mesquita, T. J., & Nogueira, R. P. (2015). Relationship between the Origin of Constant-Phase Element Behavior in Electrochemical Impedance Spectroscopy and Electrode Surface Structure. *The Journal of Physical Chemistry C*, 119(8), 4136–4147. <https://doi.org/10.1021/jp512063f>
- Crowley, L. C., Scott, A. P., Marfell, B. J., Boughaba, J. A., Chojnowski, G., & Waterhouse, N. J. (2016). Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow

- Cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(7).
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot087163>
- Damez, J.-L., Clerjon, S., Abouelkaram, S., & Lepetit, J. (2008). Electrical impedance probing of the muscle food anisotropy for meat ageing control. *Food Control*, 19(10), 931–939. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.09.005>
- De León-Hernández, A., Romero-Ornelas, L., Ramírez-Chavarría, R. G., Ramón-Gallegos, E., & Sánchez-Pérez, C. (2022). Effective Capacitance from Equivalent Electrical Circuit as a Tool for Monitoring Non-Adherent Cell Suspensions at Low Frequencies. *Bioengineering*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/bioengineering9110697>
- Ding, L., Du, D., Wu, J., & Ju, H. (2007). A disposable impedance sensor for electrochemical study and monitoring of adhesion and proliferation of K562 leukaemia cells. *Electrochemistry Communications*, 9(5), 953–958. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2006.11.040>
- Du, D., Cai, J., Ju, H., Yan, F., Chen, J., Jiang, X., & Chen, H. (2005). Construction of a Biomimetic Zwitterionic Interface for Monitoring Cell Proliferation and Apoptosis. *Langmuir*, 21(18), 8394–8399. <https://doi.org/10.1021/la051071k>
- Du, D., Liu, S., Chen, J., Ju, H., Lian, H., & Li, J. (2005). Colloidal gold nanoparticle modified carbon paste interface for studies of tumor cell adhesion and viability. *Biomaterials*, 26(33), 6487–6495. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.03.048>
- Ellis, G. (2012). Chapter 6—Four Types of Controllers. En G. Ellis (Ed.), *Control System Design Guide (Fourth Edition)* (Fourth Edition, pp. 97–119). Butterworth-Heinemann. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385920-4.00006-0>
- Eveness, J., Cao, L., Kiely, J., & Luxton, R. (2022). Equivalent circuit model of a non-faradaic impedimetric ZnO nano-crystal biosensor. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 906, 116003. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.116003>
- Fang, C., Ji, F., Shu, Z., & Gao, D. (2017). Determination of the temperature-dependent cell membrane permeabilities using microfluidics with integrated flow and temperature control. *Lab Chip*, 17(5), 951–960. <https://doi.org/10.1039/C6LC01523A>
- Fernández, P. S. (2011). *Modificación superficial de materiales de carbono: Grafito y grafeno*.
- Fuchs, S., Johansson, S., Tjell, A. Ø., Werr, G., Mayr, T., & Tenje, M. (2021). In-Line Analysis of Organ-on-Chip Systems with Sensors: Integration, Fabrication, Challenges, and Potential. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 7(7), 2926–2948. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c01110>
- Hassan, Q., Ahmadi, S., & Kerman, K. (2020). Recent Advances in Monitoring Cell Behavior Using Cell-Based Impedance Spectroscopy. *Micromachines*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/mi11060590>
- Hayashi, Y., Oshige, I., Katsumoto, Y., Omori, S., Yasuda, A., & Asami, K. (2008). Dielectric inspection of erythrocyte morphology. *Physics in Medicine and Biology*, 53(10), 2553–2564. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/53/10/007>
- Heileman, K., Daoud, J., & Tabrizian, M. (2013). Dielectric spectroscopy as a viable biosensing tool for cell and tissue characterization and analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 49, 348–359. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.04.017>

- Hismiogullari, S., Hismiogullari, A., Sahin, F., Toksoy Oner, E., Yenice, S., & Karasartova, D. (2008). Investigation of Antibacterial and Cytotoxic Effects of Organic Acids Including Ascorbic Acid, Lactic Acid and Acetic Acids on Mammalian Cells. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7.
- Huang, V., Vivier, V., Orazem, M. E., Pebere, N., & Tribollet, B. (2007). The Apparent CPE Behavior of a Disk Electrode with Faradaic Reactions: A Global and Local Impedance Analysis. *ECS Transactions*, 3(31), 567–585. <https://doi.org/10.1149/1.2789258>
- Hur, W., Son, S. E., & Seong, G. H. (2020). Electrochemical live cell patterning. *Electrochemistry Communications*, 117, 106778. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2020.106778>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2021). *Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer* (p. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021_Nal.pdf). Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI).
- Jaccard, N., Macown, R. J., Super, A., Griffin, L. D., Veraitch, F. S., & Szita, N. (2014). Automated and online characterization of adherent cell culture growth in a microfabricated bioreactor. *Journal of Laboratory Automation*, 19(5), 437–443. <https://doi.org/10.1177/2211068214529288>
- Jang, J., Moon, S.-J., Hong, S.-H., & Kim, I.-H. (2010). Colorimetric pH measurement of animal cell culture media. *Biotechnology Letters*, 32(11), 1599–1607. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0341-6>
- Jiménez, M. L., Arroyo, F. J., van Turnhout, J., & Delgado, A. V. (2002). Analysis of the Dielectric Permittivity of Suspensions by Means of the Logarithmic Derivative of Its Real Part. *Journal of Colloid and Interface Science*, 249(2), 327–335. <https://doi.org/10.1006/jcis.2001.8141>
- Jin, R., He, S., Black, K. A., Clarke, O. B., Wu, D., Bolla, J. R., Johnson, P., Periasamy, A., Wardak, A., Czabotar, P., Colman, P. M., Robinson, C. V., Laver, D., Smith, B. J., & Gulbis, J. M. (2022). Ion currents through Kir potassium channels are gated by anionic lipids. *Nature Communications*, 13(1), 490. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28148-4>
- Kang, J., Wen, J., Jayaram, S. H., Yu, A., & Wang, X. (2014). Development of an equivalent circuit model for electrochemical double layer capacitors (EDLCs) with distinct electrolytes. *Electrochimica Acta*, 115, 587–598. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.11.002>
- Khademi, M., & Barz, D. P. J. (2020). Structure of the Electrical Double Layer Revisited: Electrode Capacitance in Aqueous Solutions. *Langmuir*, 36(16), 4250–4260. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00024>
- Kho, D., MacDonald, C., Johnson, R., Unsworth, C. P., Carroll, S. J., Mez, E. D., Angel, C. E., & Graham, E. S. (2015). Application of xCELLigence RTCA Biosensor Technology for Revealing the Profile and Window of Drug Responsiveness in Real Time. *Biosensors*, 5(2), 199–222. <https://doi.org/10.3390/bios5020199>
- Kilic, M. S., Bazant, M. Z., & Ajdari, A. (2007). Steric effects in the dynamics of electrolytes at large applied voltages. I. Double-layer charging. *Physical Review. E, Statistical*,

- Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 75(2 Pt 1), 021502.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevE.75.021502>
- Laschuk, N. O., Easton, E. B., & Zenkina, O. V. (2021). Reducing the resistance for the use of electrochemical impedance spectroscopy analysis in materials chemistry. *RSC Adv.*, 11(45), 27925–27936. <https://doi.org/10.1039/D1RA03785D>
- Liu, Z., Liu, J., & Chen, T. (2005). Phenol red immobilized PVA membrane for an optical pH sensor with two determination ranges and long-term stability. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 107(1), 311–316. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2004.10.017>
- Lockett, V., Horne, M., Sedev, R., Rodopoulos, T., & Ralston, J. (2010). Differential capacitance of the double layer at the electrode/ionic liquids interface. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12(39), 12499–12512. <https://doi.org/10.1039/C0CP00170H>
- Lockett, V., Sedev, R., Ralston, J., Horne, M., & Rodopoulos, T. (2008). Differential Capacitance of the Electrical Double Layer in Imidazolium-Based Ionic Liquids: Influence of Potential, Cation Size, and Temperature. *The Journal of Physical Chemistry C*, 112(19), 7486–7495. <https://doi.org/10.1021/jp7100732>
- Macdonald, J. R., & Johnson, W. B. (2005). Fundamentals of Impedance Spectroscopy. En *Impedance Spectroscopy* (pp. 1–26). <https://doi.org/10.1002/0471716243.ch1>
- Magnusson, E. B., Halldórsson, S., Fleming, R. M. T., & Leosson, K. (2013). Real-time optical pH measurement in a standard microfluidic cell culture system. *Biomed. Opt. Express*, 4(9), 1749–1758. <https://doi.org/10.1364/BOE.4.001749>
- Mansor, M. A., Takeuchi, M., Nakajima, M., Hasegawa, Y., & Ahmad, M. R. (2017). Electrical Impedance Spectroscopy for Detection of Cells in Suspensions Using Microfluidic Device with Integrated Microneedles. *Applied Sciences*, 7(2). <https://doi.org/10.3390/app7020170>
- Martinsen, G., Grimnes, S., & Schwan, H. P. (2002). *Interface phenomena and dielectric properties of biological tissue*.
- McCafferty, E. (2010). Charged Interfaces. En E. McCafferty (Ed.), *Introduction to Corrosion Science* (pp. 33–56). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0455-3_3
- McKubre, M. C. H., & Macdonald, D. D. (2005). Measuring Techniques and Data Analysis. En *Impedance Spectroscopy* (pp. 129–204). <https://doi.org/10.1002/0471716243.ch3>
- Michl, J., Park, K. C., & Swietach, P. (2019). Evidence-based guidelines for controlling pH in mammalian live-cell culture systems. *Communications Biology*, 2(1), 144. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0393-7>
- Miranda, I.-S., AndrewsAU-Sousa, PauloAU-Ribeiro, JoãoAU-Castanheira, Elisabete M. S. AU-Lima, RuiAU-Minas, GraçaTI-Properties and Applications of PDMS for Biomedical Engineering: A Review. (2022). Properties and Applications of PDMS for Biomedical Engineering: A Review. *Journal of Functional Biomaterials*, 13(1). <https://doi.org/10.3390/jfb13010002>
- Mukherjee, P. K. (2019). Chapter 13—Bioassay-Guided Isolation and Evaluation of Herbal Drugs. En P. K. Mukherjee (Ed.), *Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs* (pp. 515–537). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813374-3.00013-2>
- Orazem, M. E., & Tribollet, B. (2017). *Electrochemical Impedance Spectroscopy* (Second Edition). John Wiley & Sons.

- Organización Mundial de la Salud. (2008). *Overview Cancer* (p. https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1). Organización Mundial de la Salud (OMS).
- Padmaraj, D., Pande, R., Miller, J. H., Jr, Wosik, J., & Zagozdzon-Wosik, W. (2014). Mitochondrial Membrane Studies Using Impedance Spectroscopy with Parallel pH Monitoring. *PLOS ONE*, 9(7), e101793. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101793>
- Pereira, F. de C., de Lima, A. P., Vilanova-Costa, C. A. S. T., Pires, W. C., Ribeiro, A. de S. B. B., Pereira, L. C. G., Pavanin, L. A., dos Santos, W. B., & Silveira-Lacerda, E. de P. (2014). Cytotoxic effects of the compound cis-tetraammine(oxalato)ruthenium(III) dithionate on K-562 human chronic myelogenous leukemia cells. *SpringerPlus*, 3(1), 301. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-301>
- Pretini, V., Koenen, M. H., Kaestner, L., Fens, M. H. A. M., Schiffelers, R. M., Bartels, M., & Van Wijk, R. (2019). Red Blood Cells: Chasing Interactions. *Frontiers in Physiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00945>
- R. G. Ramírez-Chavarría & C. Sánchez-Pérez. (2019). Sensing Micro-colloid Concentration by Spectral Impedance Measurements and Relaxation Times Analysis. *2019 IEEE Sensors Applications Symposium (SAS)*, 1–5. <https://doi.org/10.1109/SAS.2019.8706080>
- Raicu, V., & Feldman, Y. (Eds.). (2015). *Dielectric Relaxation in Biological Systems: Physical Principles, Methods, and Applications*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199686513.001.0001>
- Raistrick, I. D., Franceschetti, D. R., & Macdonald, J. R. (2005). Theory. En *Impedance Spectroscopy* (pp. 27–128). <https://doi.org/10.1002/0471716243.ch2>
- Randviir, E. P., & Banks, C. E. (2013). Electrochemical impedance spectroscopy: An overview of bioanalytical applications. *Anal. Methods*, 5(5), 1098–1115. <https://doi.org/10.1039/C3AY26476A>
- Resnik, D., Vrtačnik, D., Možek, M., Pečar, B., & Amon, S. (2011). Experimental study of heat-treated thin film Ti/Pt heater and temperature sensor properties on a Si microfluidic platform. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 21(2), 025025. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/21/2/025025>
- Sánchez-Pérez, C., De León-Hernández, A., & García-Cadena, C. (2017). Optical device for thermal diffusivity determination in liquids by reflection of a thermal wave. *Review of Scientific Instruments*, 88(8), 084901. <https://doi.org/10.1063/1.4998983>
- Schwan, H. P. (1994). Electrical properties of tissues and cell suspensions: Mechanisms and models. *Proceedings of 16th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 1, A70-A71 vol.1. <https://doi.org/10.1109/IEMBS.1994.412155>
- Seger-Sauli, U., Panayiotou, M., Schnydrig, S., Jordan, M., & Renaud, P. (2005). Temperature measurements in microfluidic systems: Heat dissipation of negative dielectrophoresis barriers. *Electrophoresis*, 26(11), 2239–2246. <https://doi.org/10.1002/elps.200410358>
- Shamoon, D., Lasquelles, S., & Brosseau, C. (2018). Perspective: Towards understanding the multiscale description of cells and tissues by electromechanobiology. *Journal of Applied Physics*, 123(24), 240902. <https://doi.org/10.1063/1.5018723>

- Shih, W.-P., Tsao, L.-C., Lee, C.-W., Cheng, M.-Y., Chang, C., Yang, Y.-J., & Fan, K.-C. (2010). Flexible temperature sensor array based on a graphite-polydimethylsiloxane composite. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 10(4), 3597–3610. <https://doi.org/10.3390/s100403597>
- Siinor, L., Lust, K., & Lust, E. (2010). Influence of anion composition and size on the double layer capacitance for Bi(111)|room temperature ionic liquid interface. *Electrochemistry Communications*, 12(8), 1058–1061. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2010.05.025>
- Soley, A., Lecina, M., Gámez, X., Cairó, J. J., Riu, P., Rosell, X., Bragós, R., & Gòdia, F. (2005). On-line monitoring of yeast cell growth by impedance spectroscopy. *Journal of Biotechnology*, 118(4), 398–405. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.05.022>
- Stephenson, M., & Grayson, W. (2018). Recent advances in bioreactors for cell-based therapies. *F1000Research*, 7, F1000 Faculty Rev-517. <https://doi.org/10.12688/f1000research.12533.1>
- Stoddart, M. J. (2011). Cell Viability Assays: Introduction. En M. J. Stoddart (Ed.), *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols* (pp. 1–6). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_1
- Strober, W. (1997). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*, 21(1), A.3B.1-A.3B.2. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs21>
- Suárez Herrera, M. F. (2011). *Electroquímica física e interfacial: Una aproximación teórica*. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.
- Sukhorukov, V. L., Kürschner, M., Dilsky, S., Lisec, T., Wagner, B., Schenk, W. A., Benz, R., & Zimmermann, U. (2001). Phloretin-Induced Changes of Lipophilic Ion Transport across the Plasma Membrane of Mammalian Cells. *Biophysical Journal*, 81(2), 1006–1013. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75758-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75758-X)
- T. A. Nguyen, T. -I. Yin, & G. Urban. (2013). A cell impedance sensor chip for cancer cells detection with single cell resolution. *SENSORS, 2013 IEEE*, 1–4. <https://doi.org/10.1109/ICSENS.2013.6688160>
- Tao, Z., Wang, H., Li, X., Liu, Z., & Guo, Q. (2017). Expanded graphite/polydimethylsiloxane composites with high thermal conductivity: ARTICLE. *Journal of Applied Polymer Science*, 134. <https://doi.org/10.1002/app.44843>
- Tovar, M., Mahler, L., Buchheim, S., Roth, M., & Rosenbaum, M. A. (2020). Monitoring and external control of pH in microfluidic droplets during microbial culturing. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-1282-y>
- Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. (2006). Hydrodynamic stress: Death and cellular damage in agitated cultures. *Revista latinoamericana de microbiología*, 48(3–4), 269–280.
- van Kralingen, C., Kho, D. T., Costa, J., Angel, C. E., & Graham, E. S. (2013). Exposure to inflammatory cytokines IL-1 β and TNF α induces compromise and death of astrocytes; implications for chronic neuroinflammation. *PloS One*, 8(12), e84269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084269>
- Wang, L., Hu, S., Liu, K., Chen, B., Wu, H., Jia, J., & Yao, J. (2020). A hybrid Genetic Algorithm and Levenberg–Marquardt (GA–LM) method for cell suspension

- measurement with electrical impedance spectroscopy. *Review of Scientific Instruments*, 91(12), 124104. <https://doi.org/10.1063/5.0029491>
- Wang, W., Cui, J., Zhao, Y., Ye, C., Zhou, S., Guo, X., Zhang, C., Li, J., & Wu, D. (2019). A label-free approach to detect cell viability/cytotoxicity based on intracellular xanthine/guanine by electrochemical method. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 100, 106625. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2019.106625>
- Weber, J. D., Yarden, Y., Dustin, M., Sassoon, D. A., & Ezekowitz, A. (2016). Functional Cell Biology: An Overview. En R. A. Bradshaw & P. D. Stahl (Eds.), *Encyclopedia of Cell Biology* (pp. 1–7). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.30114-6>
- Weltin, A., Slotwinski, K., Kieninger, J., Moser, I., Jobst, G., Wego, M., Ehret, R., & Urban, G. A. (2014). Cell culture monitoring for drug screening and cancer research: A transparent, microfluidic, multi-sensor microsystem. *Lab on a Chip*, 14(1), 138–146. <https://doi.org/10.1039/C3LC50759A>
- Worsley, C. M., Veale, R. B., & Mayne, E. S. (2022). Inducing apoptosis using chemical treatment and acidic pH, and detecting it using the Annexin V flow cytometric assay. *PLOS ONE*, 17(6), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270599>
- Xiao, C., & Luong, J. H. T. (2003). On-Line Monitoring of Cell Growth and Cytotoxicity Using Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS). *Biotechnology Progress*, 19(3), 1000–1005. <https://doi.org/10.1021/bp025733x>
- Xing, J. Z., Zhu, L., Jackson, J. A., Gabos, S., Sun, X.-J., Wang, X., & Xu, X. (2005). Dynamic Monitoring of Cytotoxicity on Microelectronic Sensors. *Chemical Research in Toxicology*, 18(2), 154–161. <https://doi.org/10.1021/tx049721s>
- Yao, J., Sapkota, A., Konno, H., Obara, H., Sugawara, M., & Takei, M. (2016). Noninvasive online measurement of particle size and concentration in liquid–particle mixture by estimating equivalent circuit of electrical double layer. *Particulate Science and Technology*, 34(5), 517–525. <https://doi.org/10.1080/02726351.2015.1089345>
- Yao, T., & Asayama, Y. (2017). Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive Medicine and Biology*, 16(2), 99–117. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12024>
- Yeon, J. H., & Park, J.-K. (2005). Cytotoxicity test based on electrochemical impedance measurement of HepG2 cultured in microfabricated cell chip. *Analytical Biochemistry*, 341(2), 308–315. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.03.047>
- Young, E. W. K., & Beebe, D. J. (2010). Fundamentals of microfluidic cell culture in controlled microenvironments. *Chem. Soc. Rev.*, 39(3), 1036–1048. <https://doi.org/10.1039/B909900J>
- Zhang, D., Zhang, Y., Zheng, L., Zhan, Y., & He, L. (2013). Graphene oxide/poly-l-lysine assembled layer for adhesion and electrochemical impedance detection of leukemia K562 cancer cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 42, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.10.057>
- Zhang, Q., Han, Y., Wang, Y., Ye, S., & Yan, T. (2014). Comparing the differential capacitance of two ionic liquid electrolytes: Effects of specific adsorption. *Electrochemistry Communications*, 38, 44–46. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2013.10.027>

- Zhao, Y., & Wang, M. (2015). Experimental study on dielectric relaxation of SiO₂ nanoparticle suspensions for developing a particle characterization method based on electrical impedance spectroscopy. *Powder Technology*, 281, 200–213. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.04.070>
- Zór, K., Heiskanen, A., Caviglia, C., Vergani, M., Landini, E., Shah, F., Carminati, M., Martínez-Serrano, A., Moreno, T. R., Kokaia, M., Benayahu, D., Keresztes, Zs., Papkovsky, D., Wollenberger, U., Svendsen, W. E., Dimaki, M., Ferrari, G., Raiteri, R., Sampietro, M., ... Emnéus, J. (2014). A compact multifunctional microfluidic platform for exploring cellular dynamics in real-time using electrochemical detection. *RSC Adv.*, 4(109), 63761–63771. <https://doi.org/10.1039/C4RA12632G>