



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

DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN
DE UN ARREGLO DE MICRO ELECTRODOS PLANARES
PARA ESTIMULACIÓN Y SENSADO DE CÉLULAS EXCITABLES

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

PRESENTA:
OSCAR PILLONI CHOREÑO

TUTOR PRINCIPAL
DRA. LAURA ADRIANA OROPEZA RAMOS
FACULTAD DE INGENIERÍA

MÉXICO, D. F. OCTUBRE 2014

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dra. Navarrete Montesinos Margarita
Secretario: Dr. Perez Alcázar Pablo Roberto
Vocal: Dra. Oropeza Ramos Laura Adriana
1er. Suplente: Dra. González Gómez Gertrudis Hortensia
2do. Suplente: Dra. Moumtadi Fatima

Lugar o lugares donde se realizó la tesis:

Laboratorio de micro-sistemas BioMEMS y Lab on a Chip del Centro UNAMems, Facultad de Ingeniería, UNAM.

Laboratorios de Biofísica de Sistemas Excitables, Facultad de Ciencias, UNAM.

Laboratorio de Neurofisiología Comparada, Facultad de Ciencias, UNAM.

TUTOR DE TESIS:

DRA. LAURA ADRIANA OROPEZA RAMOS

FIRMA

Resumen

La necesidad de entender cómo funcionan las células vivas, cómo se comportan en ciertas circunstancias, qué las hace saludables y qué las enferma es de suma importancia para avanzar en campos como la biología y la medicina. Una técnica para obtener estos datos se conoce como electrofisiología y consiste en utilizar electrodos para estimular eléctricamente células excitables y medir su reacción eléctrica.

En este trabajo se presenta una metodología para diseñar y construir tres arreglos de micro electrodos planares para estimulación y sensado eléctrico de células excitables, basando la forma del diseño en la porción de tejido que se desea probar y las dimensiones del diseño en parámetros como el tamaño del fenotipo celular, la impedancia de la interfaz electrodo - electrólito y la diafonía (*crosstalk*) entre electrodos. Se revisan las directrices básicas para el diseño de micro electrodos planares, las limitaciones y las ventajas que presentan los materiales de fabricación y los retos de ajustar la técnica de electrofisiología a micro escala.

Los arreglos diseñados se fabricaron, usando plata - cloruro de plata como material para los electrodos y vidrio para el substrato, empleando tecnología presente en México, haciendo uso de técnicas como fotolitografía, *lift - off* y pulverización catódica para fabricar los arreglos de micro electrodos, y litografía suave para fabricar una capa para microfluídica abierta, usada como contenedor del medio biológico que sustentó las células durante las pruebas de validación.

La impedancia de los micro electrodos fue caracterizada empleando espectroscopía de impedancia electroquímica y los resultados fueron comparados con los obtenidos teóricamente.

Se validó la micro- plataforma de estimulación y sensado obteniendo perfiles de potenciales de acción del nervio ciático de rana toro, corazón de pez cebra y corazón de rana toro, como ejemplos de células excitables, bajo diferentes patrones de estimulación. Estos resultados permiten confirmar que el compuesto plata - cloruro de plata es viable para fabricar arreglos de micro electrodos destinados a la estimulación y sensado de células excitables.

Abstract

The need to understand how living cells work, how they behave in certain circumstances, what makes them healthy and unhealthy is critical to progress in fields like biology and medicine. A technique used to obtain these data is known as electrophysiology and involves the use of electrodes to electrically stimulate excitable cells and measure their electrical reaction.

In this thesis a methodology to design and build three arrays of planar microelectrodes for sensing and electrical stimulation of excitable cells is presented. The design of the electrodes is based on the portion shape of the tissue under test and the dimensions on parameters such as phenotype cell size, the electrode-electrolyte interface impedance and the crosstalk between electrodes. Basic design guidelines of planar microelectrodes, the limitations and advantages of the manufacturing materials and the technical challenges of miniaturizing the electrophysiology to micro scale are reviewed.

The arrays were built using silver - silver chloride as the electrode material and glass for the substrate, making use of infrastructure currently available in Mexico to perform photolithography, lift - off and sputtering to make the microelectrode arrays, and soft lithography to make an open microfluidic layer to contain the biological medium that supported the cells during the validation tests.

The impedance of the microelectrodes was measured using electrochemical impedance spectroscopy and the results were compared with the theoretical ones.

A validation of the stimulation and sensing micro-platform was performed by detecting the action potential profile of bull frog sciatic nerve, zebra fish heart and bull frog heart, as examples of excitable cells, under different stimulation patterns. These results allow us to confirm that silver - silver chloride compound is a feasible material for microelectrodes focused on sensing and stimulating excitable cells.

Agradecimientos

A mis padres Jaime e Irma por todo el amor y apoyo que me han dado.

A mis hermanos Gustavo y Sandra por ser mi motivación para seguir adelante.

A mis amigos Arturo, Roman, Cesar, Jimena, Eduardo, Gabriel, Carlos, Marco, Arturo, Daniel, Samuel, Israel, Yuri, Gerardo, Manuel, Brenda y José, que incluso en los días más largos hacen de cada minuto un evento memorable.

A mi asesora Laura por su paciencia y constancia.

A mis compañeros de laboratorio por toda su ayuda.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por financiar esta investigación a través del proyecto 153353 de título “Plataforma micro-estructurada BioMEMS para estudio de cultivo y co-cultivo de cardiomiocitos”.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM por el financiamiento de este trabajo, por la beca de conclusión de estudios de maestría, así como por el apoyo a la asistencia a un congreso internacional otorgados con el proyecto IN114013 de título “Estudio de los efectos hidrodinámicos de sistemas microfluídicos de perfusión en la actividad de cardiomiocitos cultivados en micro-chips”.

Al Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología Aplicada (CICTA) de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, por las facilidades otorgadas para la fabricación de los micro electrodos planares.

A la UNAM y a la DGEP por el apoyo otorgado para concluir mis estudios de posgrado al otorgarme la beca CEP.

Contenido

1	INTRODUCCIÓN	12
1.1	Bioelectricidad celular	12
1.2	Métodos de sensado y estimulación del potencial de membrana: Electrofisiología	14
1.3	Micro plataformas para análisis celular	15
1.4	Justificación	18
1.5	Objetivos	18
2	MARCO TEÓRICO	19
2.1	Interfaz electrodo-electrólito	19
2.2	Modelo de doble capa de Helmholtz	19
2.3	Características eléctricas del electrólito o medio biológico	22
2.3.1	Conductividad	22
2.3.2	Permitividad eléctrica del medio	24
2.4	Composición y concentraciones del medio biológico empleado	24
2.5	Capacitancia de interfaz electrodo - electrólito	25
2.5.1	Capacitancia de Helmholtz (CH)	25
2.5.2	Capacitancia de Gouy - Chapman (CGC)	25
2.5.3	Stern y la capacitancia de interfaz total (CIT)	27
2.6	Resistencia eléctrica de interfaz y de solución biológica	27
2.6.1	Resistencia eléctrica por transferencia de carga (Rtc)	27
2.6.2	Resistencia eléctrica por dispersión (Rd)	28
2.7	Modelo eléctrico total de la interfaz electrodo - electrólito	29
2.8	Espectroscopía de impedancia electroquímica	29

3	SELECCIÓN DE MATERIALES	33
3.1	Materiales para sustrato y capa para microfluídica	33
3.1.1	PDMS	33
3.1.2	Poliestireno	33
3.1.3	Vidrio	34
3.2	Materiales para electrodos	35
3.2.1	Plata - Cloruro de plata	35
3.2.2	Platino y oro	36
3.2.3	Iridio - oxido de iridio	37
3.2.4	Acero inoxidable	37
3.2.5	PDMS dopado con partículas conductoras	38
4	DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN ARREGLO DE MICRO ELECTRODOS	41
4.1	Diseño de un arreglo de electrodos planares	41
4.1.1	Diseño 1: Agregado celular, 8 electrodos	43
4.1.2	Diseño 2: Agregado celular, 12 electrodos	45
4.1.3	Diseño 3: Porción de tejido, 12 electrodos	47
4.1.4	Resistencia de dispersión al objeto de estudio para cada diseño	49
4.1.5	Trazas conductoras	50
4.1.6	Prototipo del arreglo de electrodos y capa de pasivación	52
4.1.7	Capa de microfluídica abierta	54
4.2	Proceso de fabricación	56
4.2.1	Limpieza del sustrato	57
4.2.2	Depósito de plata y litografía del diseño de electrodos	57
4.2.3	Capa de pasivación de trazas conductoras	59
4.2.4	Capa para microfluídica	60
4.2.5	Electro platinado	60
4.2.6	Clorurado y conservación	61
4.3	Caracterización de la impedancia del arreglo de micro electrodos	61

5	EXPERIMENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	64
5.1	Arreglo experimental	64
5.2	Metodología experimental	68
5.3	Pruebas empleando el Diseño 1	70
5.3.1	D1: Estimulación sin presencia celular	70
5.3.2	D1: Registro de nervio ciático de rana toro con estimulación	72
5.3.3	D1: Registro de Ápice de ventrículo de rana toro con estimulación	75
5.3.4	D1: Corazón de pez cebra sin estimulación	78
5.4	Pruebas empleando el diseño 2	80
5.4.1	D2: Estimulación sin presencia celular	80
5.4.2	D2: Registro de ápice de ventrículo de rana toro	82
5.5	Pruebas empleando el diseño 3	86
5.5.1	D3: Estimulación sin presencia celular	86
5.5.2	D3: Corazón de pez cebra con estimulación	88
5.5.3	D3: Nervio ciático de rana toro con estimulación	91
	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	94
	ANEXO 1: LIMPIEZA DE SUBSTRATOS	97
	ANEXO 2: DEPÓSITO DE PLATA Y FOTOLITOGRAFÍA DE DISEÑOS	98
	ANEXO 3: PROCESO DE FABRICACIÓN DE LA CAPA DE PASIVACIÓN DE TRAZAS CONDUCTORAS	105
	ANEXO 4: PROCESO DE FABRICACIÓN DE LA CAPA PARA MICROFLUÍDICA	106
	ANEXO 5: ELECTRO PLATINADO	107
	ANEXO 6: FOTOLITOGRAFÍA TRADICIONAL	108
	ANEXO 7: LITOGRAFÍA SUAVE	110
	ANEXO 8: PROGRAMA EN MATLAB PARA EL CÁLCULO DE LOS VALORES TEÓRICOS DEL MODELO ELÉCTRICO DE LA INTERFAZ ELECTRODO - ELECTRÓLITO	112
	ANEXO 9: PROGRAMA EN MATLAB PARA EL CÁLCULO DE LA RESISTENCIA DE TRAZAS CONDUCTORAS DE CADA DISEÑO, COMO FUNCIÓN DEL GROSOR DE LA CAPA DE PLATA	117
	ANEXO 10: IDENTIFICADORES DE ELECTRODOS	120
	REFERENCIAS	122

Lista de figuras

FIGURA 1.1. EQUIVALENTES ELÉCTRICOS DE LOS ELEMENTOS DE LA MEMBRANA CELULAR.	13
FIGURA 1.2. EJEMPLO DE LA ESCALA EN LAS TRAZAS DE CONDUCCIÓN ELÉCTRICA DISEÑADAS EN EL PRESENTE TRABAJO.	16
FIGURA 2.1. INTERFAZ ELECTRODO - ELECTRÓLITO.	19
FIGURA 2.2. CIRCUITO ELÉCTRICO EQUIVALENTE DE LA INTERFAZ ELECTRODO ELECTRÓLITO.	21
FIGURA 2.3. MODELO ELÉCTRICO TOTAL DE LA INTERFAZ ELECTRODO - ELECTRÓLITO Y SU CONEXIÓN ELÉCTRICA A UNA CÉLULA.	29
FIGURA 2.4. APLICACIÓN DE UN VOLTAJE ARBITRARIO PERO CONOCIDO (V_s) AL MODELO DE MEDIA CELDA DE HELMHOLTZ.	30
FIGURA 2.5. MODELO COMPLETO DE DOS ELECTRODOS EN CONTACTO CON UN MEDIO ACUOSO.	32
FIGURA 4.1. PARÁMETROS DE DISEÑO DEL ARREGLO DE MICRO ELECTRODOS.	42
FIGURA 4.2. DISEÑO 1 PARA AGREGADOS CELULARES.	43
FIGURA 4.3. DISEÑO 2 PARA AGREGADOS CELULARES.	45
FIGURA 4.4. DISEÑO 3 PARA PORCIÓN DE TEJIDO VIVO.	47
FIGURA 4.5. GRÁFICAS DE LOS VALORES CALCULADOS DE RESISTENCIA ELÉCTRICA R_{d2} CONTRA DISTANCIA DE SEPARACIÓN DEL OBJETO DE ESTUDIO.	49
FIGURA 4.6. ESQUEMA DE TRAZAS CONDUCTORAS EMPLEADO PARA LOS DISEÑOS PROPUESTOS.	50
FIGURA 4.7. PROTOTIPO CON TODOS LOS DISEÑOS PROPUESTOS PARA EL ARREGLO DE ELECTRODOS PLANARES.	52
FIGURA 4.8. PROTOTIPO DEL ARREGLO DE ELECTRODOS CON LA CAPA DE PASIVACIÓN DE SU-8.	53
FIGURA 4.9. PATRÓN EMPLEADO PARA LA CAPA DE MICROFLUÍDICA ABIERTA.	54
FIGURA 4.10. PROTOTIPO FINALIZADO, CON LA CAPA DE MICROFLUÍDICA ABIERTA.	55
FIGURA 4.11. PROCESO DE <i>LIFT-OFF</i> EMPLEADO EN LA FABRICACIÓN DEL ARREGLO DE MICRO ELECTRODOS.	56
FIGURA 4.12. MÁSCARA EMPLEADA EN EL PROCESO DE FOTOLITOGRAFÍA.	57
FIGURA 4.13. BLANCO DE CROMO Y PERDIGONES DE PLATA.	58
FIGURA 4.14. CHIP OBTENIDO DESPUÉS DEL PROCESO DE FOTOLITOGRAFÍA Y DEPÓSITO DE METALES.	58
FIGURA 4.15. PROCESO DE ALINEACIÓN DE LA MÁSCARA PARA LA CAPA DE PASIVACIÓN CON EL SUBSTRATO.	59
FIGURA 4.16. CAPA DE MICROFLUÍDICA FABRICADA PARA CONTENER LOS OBJETOS DE ESTUDIO.	60
FIGURA 4.17. ESQUEMA DE CONEXIÓN PARA LA PRUEBA DE EIS SOBRE EL ARREGLO DE ELECTRODOS.	62
FIGURA 5.1. SISTEMA DE ESTIMULACIÓN CELULAR E ILUMINACIÓN DEL SUBSTRATO.	65
FIGURA 5.2. MICRO MANIPULADORES EMPLEADOS PARA CONECTAR LOS SISTEMAS ELECTRÓNICOS DE ESTIMULACIÓN Y SENSADO AL ARREGLO DE MICRO ELECTRODOS.	66
FIGURA 5.3. TABLERO DE CONEXIONES Y CONJUNTO DE AMPLIFICADORES DIFERENCIALES.	67
FIGURA 5.4. DIAGRAMA DE CONEXIONES SIMPLIFICADO DEL EXPERIMENTO REALIZADO.	68
FIGURA 5.5. ÁPICE DEL VENTRÍCULO DE UN CORAZÓN DE RANA TORO SOBRE EL ARREGLO DE ELECTRODOS CORRESPONDIENTE AL DISEÑO 1.	69

FIGURA 5.6. D1: ESTIMULACIÓN POSITIVA DEL ARREGLO CORRESPONDIENTE AL DISEÑO 1 SIN PRESENCIA DE CÉLULAS.	71
FIGURA 5.7. D1: REGISTRO DE NERVIO CIÁTICO DE RANA CON ESTIMULACIÓN POSITIVA. PRIMER REGISTRO CON UN ELECTRODO DE ESTIMULACIÓN Y UN ELECTRODO DE SENSADO.	72
FIGURA 5.8. . D1: REGISTRO DE NERVIO CIÁTICO DE RANA CON ESTIMULACIÓN POSITIVA.	73
FIGURA 5.9. D1: REGISTRO DE NERVIO CIÁTICO DE RANA CON ESTIMULACIÓN NEGATIVA.	74
FIGURA 5.10. D1: ÁPICE DE VENTRÍCULO DE RANA CON ESTIMULACIÓN POSITIVA.	76
FIGURA 5.11. D1: ÁPICE DE VENTRÍCULO DE RANA CON ESTIMULACIÓN NEGATIVA.	77
FIGURA 5.12. D1: CORAZÓN DE PEZ CEBRA SIN ESTIMULACIÓN.	78
FIGURA 5.13. ESPECTROGRAMA DEL REGISTRO POBLACIONAL OBTENIDO DE UN CORAZÓN DE PEZ CEBRA SIN ESTAR PRESENTE UNA SEÑAL DE ESTIMULACIÓN.	79
FIGURA 5.14. D2: ESTIMULACIÓN POSITIVA DEL ARREGLO CORRESPONDIENTE AL DISEÑO 2 SIN PRESENCIA DE CÉLULAS.	81
FIGURA 5.15. D2: ÁPICE DE VENTRÍCULO DE RANA CON ESTIMULACIÓN POSITIVA.	82
FIGURA 5.16. D2: ACERCAMIENTO DE LAS SEÑALES MOSTRADAS EN LA FIGURA 5.15 OMITIENDO EL IMPULSO DE LA SEÑAL DE ESTIMULACIÓN Y SUS ARTEFACTOS EN LAS SEÑALES SENSADAS.	83
FIGURA 5.17. D2: ÁPICE DE VENTRÍCULO DE RANA CON ESTIMULACIÓN NEGATIVA.	84
FIGURA 5.18. D3: ESTIMULACIÓN POSITIVA DEL ARREGLO CORRESPONDIENTE AL DISEÑO 3 SIN PRESENCIA DE CÉLULAS.	87
FIGURA 5.19. D3: CORAZÓN DE PEZ CEBRA CON ESTIMULACIÓN POSITIVA.	88
FIGURA 5.20. D3: CORAZÓN DE PEZ CEBRA CON ESTIMULACIÓN NEGATIVA.	89
FIGURA 5.21. D3: NERVIO CIÁTICO DE RANA CON ESTIMULACIÓN POSITIVA.	92
FIGURA 5.22.D3: NERVIO CIÁTICO DE RANA CON ESTIMULACIÓN NEGATIVA.	93

Lista de tablas

TABLA I: POTENCIAL DE ELECTRODO PARA DIFERENTES METALES Y SU REACCIÓN QUÍMICA GENERAL A 298 K.	20
TABLA II: CONDUCTIVIDAD LIMITANTE EQUIVALENTE DE LOS IONES Y SALES USADOS EN EL MEDIO BIOLÓGICO.	23
TABLA III: PERMITIVIDAD ELÉCTRICA RELATIVA DE ALGUNOS COMPUESTOS DE INTERÉS.	24
TABLA IV: COMPUESTOS Y CONCENTRACIONES DEL MEDIO BIOLÓGICO EMPLEADO.	24
TABLA V: PRINCIPALES MATERIALES PARA LA FABRICACIÓN DE BIOMEMS Y ALGUNAS DE SUS CARACTERÍSTICAS.	34
TABLA VI: PRINCIPALES AGENTES DE DOPADO PARA AUMENTAR LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA DEL PDMS.	38
TABLA VII: COMPARACIÓN DE PROPIEDADES DE DIFERENTES ELECTRODOS PARA BIOPOTENCIALES.	40
TABLA VIII: DIMENSIONES LINEALES Y ÁREA OCUPADA POR CADA TIPO DE ELECTRODO EN EL DISEÑO 1.	44
TABLA IX: PARÁMETROS ELÉCTRICOS TEÓRICOS DEL DISEÑO 1.	44
TABLA X: DIMENSIONES LINEALES Y ÁREA OCUPADA POR CADA TIPO DE ELECTRODO EN EL DISEÑO 2.	46
TABLA XI: PARÁMETROS ELÉCTRICOS TEÓRICOS DEL DISEÑO 2.	46
TABLA XII: DIMENSIONES LINEALES Y ÁREA OCUPADA POR CADA TIPO DE ELECTRODO EN EL DISEÑO 3.	48
TABLA XIII: PARÁMETROS ELÉCTRICOS TEÓRICOS DEL DISEÑO 3.	48
TABLA XIV: DIMENSIONES LINEALES Y ÁREAS DE LOS POZOS COLOCADOS EN LA CAPA PARA MICROFLUÍDICA ABIERTA.	55
TABLA XV: IMPEDANCIAS TEÓRICAS Y MEDIDAS PARA LOS ELECTRODOS DEL DISEÑO 1.	62
TABLA XVI: IMPEDANCIAS TEÓRICAS Y MEDIDAS PARA LOS ELECTRODOS DEL DISEÑO 2.	62
TABLA XVII: IMPEDANCIAS TEÓRICAS Y MEDIDAS PARA LOS ELECTRODOS DEL DISEÑO 3.	63
TABLA XVIII: TIPOS DE CÉLULAS PROBADAS EN CADA ARREGLO DE ELECTRODOS.	69
TABLA XIX: PARÁMETROS DE PROCESO PARA DEPÓSITO DE CROMO.	101
TABLA XX: CONDICIONES DE LA PELÍCULA DELGADA DE CROMO.	102
TABLA XXI: PARÁMETROS DE PROCESO PARA DEPÓSITO DE PLATA.	103
TABLA XXII: CONDICIONES DE LA PELÍCULA DELGADA DE PLATA.	104
TABLA XXIII: RESISTENCIA ELÉCTRICA DE CADA TRAZA CONDUCTIVA, CALCULADAS A PARTIR DE UN DEPOSITO DE PLATA DE 140 [NM] DE GROSOR.	119

1 Introducción

1.1 Bioelectricidad celular

La célula, la unidad más básica de la vida, es una estructura compleja que sobrevive de forma sorprendentemente análoga a los sistemas que conforma. Es decir, así como nosotros, las células comen, respiran, crecen, se reproducen, generan desechos y se comunican con su medio circundante. Con los mecanismos para desarrollar todo esto contenidos en un paquete que no supera los 130 [μm] en organismos humanos [1], estos pequeños bloques de construcción para la vida están contenidos y protegidos por la membrana celular, la cual conforma una división entre ellos y el medio que los circunda. Esta membrana se forma por una doble capa de lípidos con proteínas embebidas, las cuales generan una estructura resistente y selectivamente permeable a otras moléculas orgánicas y varios tipos de iones. Esto le permite a la célula controlar la entrada y salida de materiales que necesita para sobrevivir.

Una consecuencia de la membrana celular se manifiesta en la generación de una diferencia de potencial eléctrico entre el medio intracelular y el medio extracelular (potencial de membrana). Esta diferencia de potencial bioeléctrico es la responsable principal de las propiedades eléctricas de las células [2]. La correcta medición de este potencial nos puede llevar a conocer varios aspectos de la célula, como su estado de salud o su funcionamiento.

El potencial de membrana basal se define por la diferencia de concentración de los iones a los que es permeable la membrana celular, principalmente iones de potasio (K^+), de sodio (Na^+) y de cloro (Cl^-), entre el interior y exterior de la célula. Ésta a su vez logra el flujo de iones auxiliándose de una serie de compuertas localizadas a lo largo de su membrana, conocidas como canales iónicos y bombas moleculares.

Los canales iónicos son compuertas de transporte pasivo que funcionan auxiliándose del gradiente de concentración entre el líquido intracelular y el líquido extracelular. Cuando se activan, debido a estímulos externos, permiten el paso selectivo de los iones a los que son susceptibles, modificando el gradiente de concentración.

Las bombas sodio - potasio son compuertas de transporte activo que, al activarse, transportan iones de sodio y de potasio en contra del gradiente de concentración, generando una baja concentración intracelular de iones de sodio y una alta concentración de iones de potasio con respecto al líquido extracelular. Estas diferencias de concentración causan un potencial negativo con respecto al líquido extracelular conocido como potencial de membrana en reposo. Este potencial, generalmente del orden de decenas o centenas de milivolts, causa a su vez un campo eléctrico fuerte incluso para estándares del mundo macro (10^6 a 10^9 [V/m]). Esto es debido a que el potencial de membrana en reposo se presenta a lo largo de una superficie cuyo grosor generalmente se encuentra en el orden de los nanómetros (10^{-9} [m]) [3].

Un modelo eléctrico simplificado de la célula consiste en considerar los líquidos intracelular y extracelular como electrolitos que poseen conducción eléctrica. Al estar formada por una capa doble de lípidos, la membrana celular presenta un comportamiento fundamentalmente aislante, con la excepción de las secciones de ella donde se encuentran los canales iónicos y las bombas de sodio - potasio, por lo que se modela como un arreglo de capacitancias y resistencias, las primeras siendo generadas por la existencia de dos conductores (líquidos intracelular y extracelular) separados por un dieléctrico (membrana celular) y las segundas debido a que los canales iónicos y bombas sodio - potasio forman caminos conductivos entre el interior y exterior de la célula.

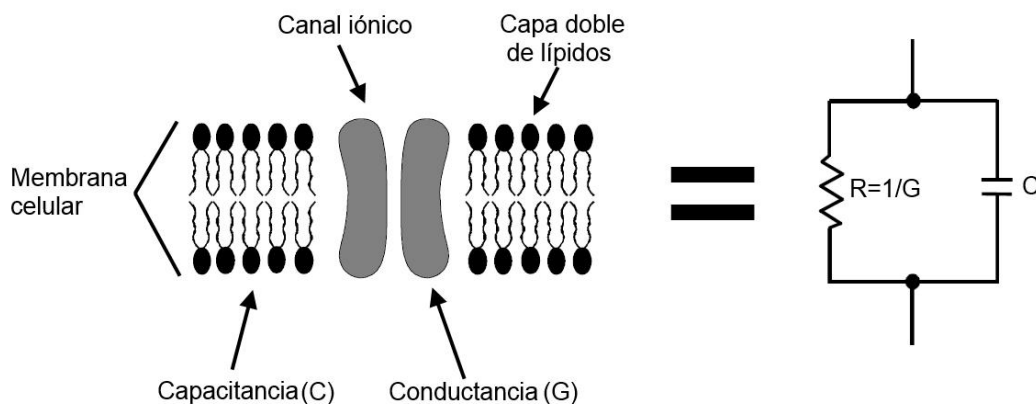


Figura 1.1. Equivalentes eléctricos de los elementos de la membrana celular.

1.2 Métodos de sensado y estimulación del potencial de membrana: Electrofisiología

La electrofisiología es la disciplina que se encarga de estudiar cómo se comportan las células y los tejidos vivos a partir de sus propiedades eléctricas, mediante la medición de sus potenciales de membrana al ser estimulados por campos o corrientes eléctricos. Esto resulta de fundamental importancia para caracterizar los sistemas anatómicos que éstas conforman.

La forma tradicional de realizar electrofisiología celular consiste en producir un agregado celular (conjunto de células disociadas) de la especie que se desea estudiar, generalmente en una caja Petri, el cual se mantiene vivo y se desarrolla mediante el uso de voluminosas incubadoras, que lo mantienen a una temperatura, pH y concentración de O_2 constantes e ideales a sus necesidades, y bombas que suministran el medio acuoso rico en elementos que requieren las células para sobrevivir [4]. Una vez que se tiene un agregado celular viable, se somete a alguna técnica de detección u observación (microscopia, *patch clamp*, fluoroscopia, etc.) para determinar un parámetro de comparación sobre su estado y salud.

Una de estas técnicas denominada *patch clamp* consiste en emplear micro manipuladores para fijar (*patch*) una micro pipeta rellena de un electrólito o material conductor en contacto a la membrana de la célula objetivo, lo que crea un camino para la corriente eléctrica de y hacia la misma. Bajo estas condiciones, se realizan mediciones de la membrana celular a tensión o corriente fijas (*clamp*) [4].

Existen trabajos de electrofisiología aplicada *in vivo* (directamente en las células del animal objetivo mientras sigue vivo). Estos muestran la necesidad de numerosos y complejos equipos de laboratorio aplicados al sujeto de estudio, de forma invasiva, para realizar mediciones fisiológicas relevantes. Por otro lado, las mediciones *in vitro* presentan otros retos, siendo quizá el más característico la dificultad de emular las condiciones internas del cuerpo de un ser vivo en un experimento *in vitro* (donde se toman muestras celulares y se cultivan artificialmente). Esto provoca que dichos resultados no sean tan representativos de los fenómenos fisiológicos reales de un ser vivo. Los sistemas micro electromecánicos (MEMS) pueden emplearse para ayudar a resolver esta problemática [5].

1.3 Micro plataformas para análisis celular

En busca de técnicas alternativas para realizar electrofisiología celular, se han realizado un gran número de reportes de micro-fabricación de dispositivos MEMS aplicados a biología celular [6], [7], así como reportes sobre métodos de interacción de ingeniería celular [8] y un amplio número de revisiones de cultivos celulares y micro-fabricación [9]–[11]. En ellos se establece que el reto de esta tecnología es el desarrollar interfaces *in vitro* que imiten con fidelidad las condiciones fisiológicas básicas que suceden en sistemas *in vivo*, lo que arrojará resultados biológicamente relevantes. Así mismo, se espera que estas plataformas funcionen como módulos que eventualmente conformen sistemas tipo *Lab On a Chip* (LOC), que hoy en día representan herramientas muy veloces y de alta sensibilidad para análisis y diagnóstico de entidades químico-biológicas.

La habilidad de los dispositivos LOC de manipular volúmenes pequeños ha permitido a los investigadores desarrollar experimentos precisos y mejor controlados en muchas áreas de las ciencias, como lo son la biología, la química y la medicina (BioMEMS) [12], [13]. Siendo que la mayoría de las células y sus estructuras internas tienen dimensiones en el orden de los micrómetros, justamente la escala en la que se desarrollan estos sistemas, lo que permite la posibilidad de controlar, en cierta medida, el micro entorno de los dispositivos de forma precisa (su temperatura, características de líquido extracelular, presión del medio, dirección del flujo eléctrico en una solución, matriz extra celular, etc.), generando un entorno con algunas características parecidas al de un organismo vivo [14]. No obstante, no resulta trivial trasladar un experimento realizado en escala macroscópica a micro-escala solo redimensionándolo, es necesario considerar otros fenómenos físicos que a escala normal no tienen la misma proporción [5].

Uno de estos fenómenos de especial relevancia es la resistencia eléctrica que presentan las trazas conductoras a micro escala. Por ejemplo, mientras que en un conductor común, como lo sería un alambre de cobre calibre 18 AWG (diámetro de 1.02362 [mm]), la resistencia eléctrica por unidad de distancia es pequeña ($\sim 21 \times 10^{-6} [\frac{\Omega}{mm}]$), esta resistencia se vuelve significativa en una traza conductiva del mismo material a escala micrométrica ($\sim 1.2 [\frac{\Omega}{mm}]$ en algunas de las trazas diseñadas para el presente trabajo con una sección transversal de $100 \times 10^3 [nm]$ por $140 [nm]$). La Figura 1.2 muestra una representación de la sección transversal de los conductores descritos en este ejemplo.

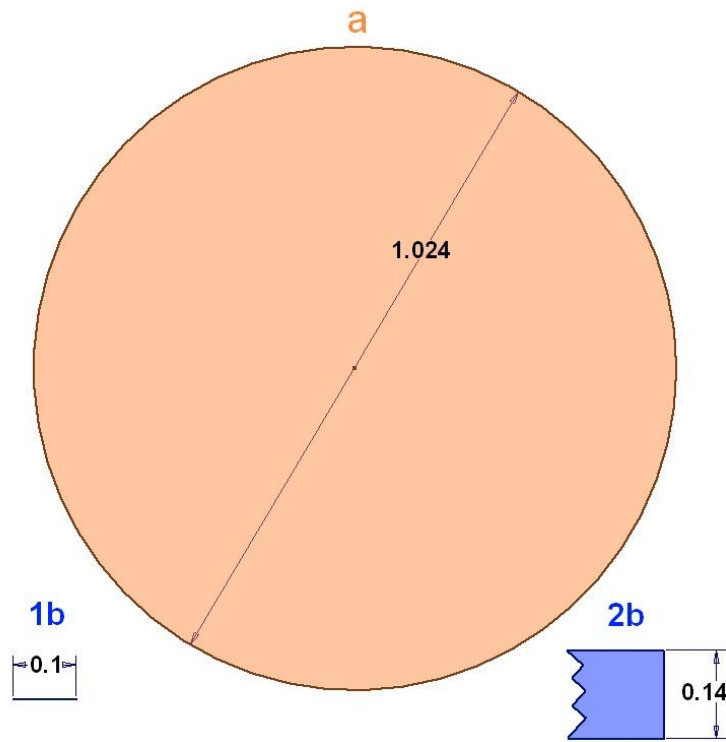


Figura 1.2. Ejemplo de la escala en las trazas de conducción eléctrica diseñadas en el presente trabajo. Se muestra la sección transversal de un conductor calibre 18 AWG (a) y una traza conductora de $100 \times 10^3 \times 140 [nm]$ (1b), ambos con escala 100:1 y medidas en [mm]. También se presenta una sección de la misma traza conductora (2b) con escala 100,000:1 y medidas en [μm] para clarificar su forma rectangular.

Se han presentado varios trabajos en el campo de la estimulación [15]–[17] y sensado [18]–[20] de potenciales bioeléctricos en células animales. En particular, las células excitables presentan una respuesta a algún tipo de estimulación (eléctrica, mecánica o química).

En este trabajo se presenta el diseño, construcción y validación de un nuevo micro dispositivo que integra los elementos necesarios para realizar pruebas de electrofisiología a células excitables en un chip monolítico, haciendo uso de micro electrodos planares fabricados con plata - cloruro de plata para la excitación y el sensado de estas células. Para el diseño del arreglo de electrodos se tomó en cuenta el objeto de estudio al cual se le aplicará la técnica de electrofisiología, como lo son agregados celulares y porciones de tejido de células excitables.

1.4 Justificación

El estudio de células excitables contribuye al entendimiento de los mecanismos de operación de un ser vivo. El contar con una plataforma que permita acondicionar eléctrica y químicamente un agregado celular, así como la detección eléctrica de su respuesta es de gran utilidad para dicho propósito.

1.5 Objetivos

- **General**

La plataforma no invasiva que se desarrolle deberá adaptarse a diversos tipos celulares y permitir una nueva gama de arreglos experimentales que brinden repetitividad y control, arrojando resultados biológicos relevantes.

Además, este sistema será modular en el sentido que contará con la capacidad de ser integrado en otros biochips de forma sencilla. Esto es especialmente importante porque se propone que sea parte de un sistema tipo *Lab On a Chip (LOC)* dedicado al cultivo de células, lo cual representaría un avance en la generación de este tipo de tecnologías en México.

- **Particulares**

- 1) Diseñar un prototipo de biochip polimérico que permita estimular y sensar la actividad de agregados celulares excitables.
- 2) Construir el biochip diseñado.
- 3) Caracterizar sus propiedades eléctricas en presencia de un medio de cultivo celular y establecer las bases para un futuro sistema *Lab On a Chip* integrado de diseño y fabricación mexicana.

2 Marco teórico

2.1 Interfaz electrodo-electrólito

Al colocar un metal en contacto con una solución salina, como el medio en el que se encuentran las células, se genera una interfaz electrodo-electrólito. Parte del metal empieza a reaccionar con la solución, disolviéndose ligeramente y generando una pérdida de átomos del electrodo hacia el medio, en forma de iones. Esta pérdida deja al metal con carga negativa y a los iones metálicos disueltos en la solución con carga positiva. El campo eléctrico formado por esta diferencia de cargas tiende a atraer los iones de nuevo a la proximidad de la superficie del metal, sin embargo se requiere energía para su reintegración a la capa metálica, por lo que los iones simplemente se agrupan cerca de la superficie del metal.

2.2 Modelo de doble capa de Helmholtz

Se han estudiado diferentes modelos de análisis de la interfaz electrodo-electrólito en pro de mejorar el diseño de electrodos para diferentes aplicaciones medicas y biológicas [21]. El modelo de Herman von Helmholtz es el más usado para representar esta interfaz mediante una doble capa de iones y aniones (Figura 2.1).

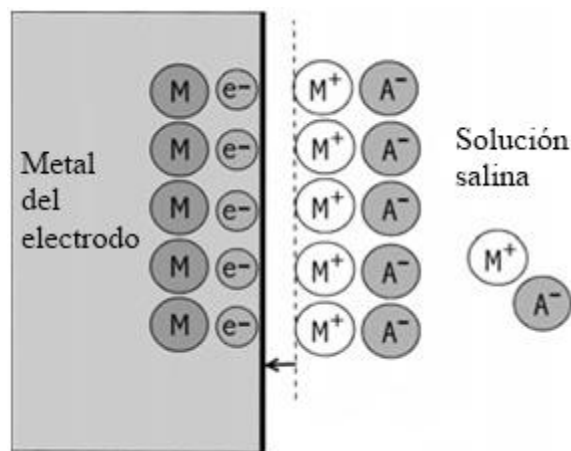


Figura 2.1. Interfaz electrodo - electrólito. Iones del metal (M^+) y aniones (A^-) se agrupan en la interfaz del metal con la solución salina, formando la doble capa de Helmholtz.

Al colocar un segundo electrodo en el electrólito se forma una celda electroquímica, lo que genera un potencial eléctrico en la interfaz de ambos electrodos debido a la separación de iones cargados a través de la doble capa de Helmholtz de cada uno.

La diferencia de potencial de cada electrodo es conocida como potencial de media celda (V_{mc} , *half - cell potential* en inglés) al representar la mitad del potencial total que se presentaría en una celda electroquímica con electrodos del mismo material. También, se le suele denominar potencial de *offset* del electrodo por manifestarse como tal en mediciones de biopotenciales [3]. No es posible medir directamente este potencial debido a que se requeriría de un potencial eléctrico de referencia generado con otro electrodo, el cual tendría a su vez su propio potencial de media celda.

Estos potenciales son característicos de cada metal y teóricamente, si ambos electrodos son del mismo material, sus potenciales deberían anularse al realizar una medición por tener igual magnitud pero diferente polaridad. Esto implicaría que la estructura atómica e impurezas de ambos electrodos deberían ser idénticas, lo cual es sumamente improbable. Por esto, y dependiendo de la sensibilidad necesaria para realizar mediciones, es deseable contar con electrodos que posean magnitudes mínimas en su potencial de media celda. Se ha llegado a una convención para medirlos [21], debido a que forman parte importante en el desarrollo de instrumentos de medición de potenciales bioeléctricos. La Tabla I muestra este potencial para electrodos construidos con diferentes metales y la reacción química que ocurre en la interfaz electrodo-electrólito para dicho metal.

Tabla I: Potencial de electrodo para diferentes metales y su reacción química general a 298 K [21].

Metal	Reacción	Potencial de media celda V_{mc} [V]
Hierro	$Fe \rightarrow Fe^{2+} + 2e^{-}$	-0.409
Cloruro de plata	$Ag + Cl^{-} \rightarrow AgCl + e^{-}$	+0.223
Cobre	$Cu \rightarrow Cu^{+} + e^{-}$	+0.522
Plata	$Ag \rightarrow Ag^{+} + e^{-}$	+0.799
Oro	$Au \rightarrow Au^{+} + e^{-}$	+1.680

El circuito equivalente para una interfaz electrodo - electrolito se presenta en la Figura 2.2. Cabe señalar que ésta es sólo una aproximación lineal del comportamiento de la interfaz, la cual es variante en el tiempo debido a los cambios en las condiciones del medio, procesos de oxidación y reducción en la superficie del electrodo, temperatura del sistema, frecuencia de excitación, eventos celulares, etc.

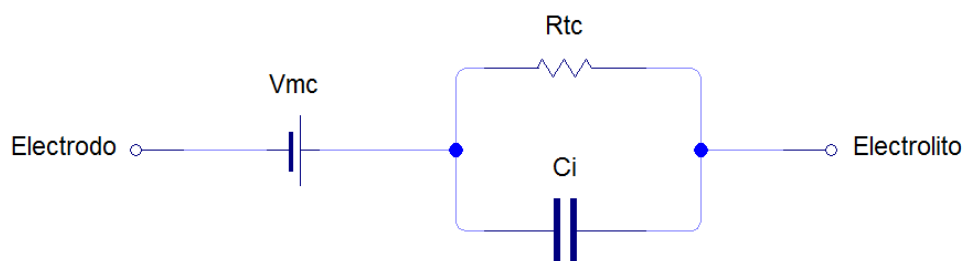


Figura 2.2. Circuito eléctrico equivalente de la interfaz electrodo electrolito, donde V_{mc} es el potencial de media celda, R_{tc} la resistencia por transferencia de carga y C_i la capacitancia total de interfaz debidos a la doble capa de iones y aniones. Estos últimos se trataran más adelante en este texto.

Es importante mencionar que las características deseables de un electrodo son influenciadas por la función que cumplirá. Si se requiere un electrodo que realice funciones de sensado, es deseable buscar que posea una impedancia eléctrica alta de tal forma que permita realizar mediciones sin cargar el sistema eléctrico del objeto de estudio; por otro lado, si se requiere un electrodo que realice funciones de estimulación, éste debe tener una resistencia tal que se garantice una buena transmisión de la potencia de la señal estimulante, minimizando la generación de artefactos.

2.3 Características eléctricas del electrólito o medio biológico

El electrólito en cuestión es un conjunto de sales que se utilizan para mantener vivo el objeto de estudio, en este caso a las células. Es común referirse a éste como medio biológico o medio de cultivo.

Es de gran importancia conocer las características eléctricas de este medio, principalmente la permitividad eléctrica y la conductividad, debido a que estas afectan el modelo eléctrico de la interfaz electrodo - electrólito y la dispersión de señales eléctricas en el mismo.

2.3.1 Conductividad

La conductividad total de un electrólito se calcula empleando el concepto propuesto por Friedrich Kohlrausch (1874), donde la conductividad eléctrica de una solución es proporcional a las concentraciones y movilidades de los iones libres que posee (los responsables de la transmisión de la corriente eléctrica en él) y usando las ecuaciones desarrolladas por Arrhenius (1883) para tal motivo [22].

La conductividad eléctrica total (σ) de una solución es la suma de las conductividades equivalentes (λ_i^*) debidas a cada tipo de ion portador de carga (i) por su concentración molar (C_i) presente en la solución, como se describe en la ecuación (1). Se debe agregar una constante de proporcionalidad (α_i) para denotar la fracción de portadores de carga disociados en la solución, los cuales participan en el flujo de corriente eléctrica. Esta constante es usualmente 1 para denotar disociación total de los iones en el electrólito.

$$\sigma = \sum \alpha_i \lambda_i^* C_i \quad (1)$$

La conductividad equivalente debida a cada ion es dependiente de la concentración de su respectiva sal y disminuye al aumentar dicha concentración:

$$\lambda_i^* = \lambda_{i0} - a\sqrt{C_i} \quad (2)$$

Donde:

λ_{i0} : Conductividad limitante equivalente de la especie de iones (i) para disociación total.

a : Constante de proporcionalidad empírica.

Se han obtenido experimentalmente las conductividades limitantes para varias especies de iones y sales, de las cuales se presentan las de interés para este trabajo en la Tabla II [22].

Tabla II: Conductividad limitante equivalente de los iones y sales usados en el medio biológico. [22]–[24]

Ion o sal	λ_{i0} [mS/(cm mol)]
Ca^+	59.50
H^+	349.80
K^+	73.52
Mg^+	53.06
Na^+	50.11
Cl^-	76.35
HCO_3^-	44.50
SO_4^-	80.00
NaH_2PO_4	80.20

2.3.2 Permittividad eléctrica del medio

La permitividad eléctrica de diferentes medios biológicos se ha estudiado previamente [25], lo que ha permitido llegar a valores estandarizados para un mismo compuesto, siendo la concentración de éste y su temperatura características determinantes de dicha permitividad. En la Tabla III se presentan valores estandarizados de permitividad eléctrica para algunos compuestos de interés.

Tabla III: Permittividad eléctrica relativa de algunos compuestos de interés [25]. Valores con concentración de 1 [Mol] a 300 [°K].

Compuesto	Permittividad eléctrica relativa
<i>NaCl</i>	69
<i>KCl</i>	70
<i>MgCl₃</i>	50
<i>Na₂SO₄</i>	58

2.4 Composición y concentraciones del medio biológico empleado

El medio biológico empleado para sustentar a las células es una mezcla de sales y glucosa presentes en el cuerpo de la especie objetivo y que permiten mantener vivas las células en una condición química cercana a la *in vivo*. Los compuestos y concentraciones usados en el medio biológico empleado se presentan en la Tabla IV.

Tabla IV: Compuestos y concentraciones del medio biológico empleado en las pruebas del presente trabajo.

Compuesto	Concentración [mMol]
<i>NaCl</i>	125
<i>KCl</i>	2.5
<i>CaCl₂</i>	2
<i>MgCl</i>	1
<i>NaHCO₃</i>	26
<i>NaH₂PO₄</i>	1.25
Glucosa	10

2.5 Capacitancia de interfaz electrodo - electrolito

Como se explicó anteriormente, en la interfaz entre el electrodo y el electrolito se forma una región donde se produce un intercambio iónico entre los radicales libres del electrolito y el metal del electrodo, que eléctricamente se comporta como una capacitancia en el modelo del sistema. La naturaleza dinámica de esta capacitancia de interfaz la vuelve difícil de calcular, pero se logra una aproximación empleando las consideraciones de Helmholtz, Gouy, Chapman y Stern [26].

2.5.1 Capacitancia de Helmholtz (C_H)

En el modelo propuesto por Helmholtz en 1879, la capacitancia de interfaz se determina por el área del electrodo, el grosor de la capa de iones que se aglomeran en la interfaz (también conocido como la distancia al plano exterior de Helmholtz) y la permitividad dieléctrica del electrolito (el medio de cultivo en nuestro caso).

$$C_H = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r A}{d_{PEH}} \quad (3)$$

Donde:

$\epsilon_0 \epsilon_r$: Permitividad dieléctrica del electrolito.

A : Área del electrodo.

d_{PEH} : Distancia del electrodo al plano exterior de Helmholtz.

2.5.2 Capacitancia de Gouy - Chapman (C_{GC})

Lamentablemente, el modelo propuesto por Helmholtz no toma en cuenta la dependencia de la capacitancia a la diferencia de potencial existente entre electrodo y electrolito, por lo que usarla directamente introduciría un factor de error que aumentaría proporcional a esta diferencia. Para resolver éste factor de error, Gouy (1910) y Chapman (1913) se dedicaron a modificar la aproximación de Helmholtz para incluir los efectos derivados de la diferencia de potencial en esta capacitancia.

Definieron que para voltajes menores a 50 [mV] la caída de potencial a través de la interfaz podría ser modelada por una exponencial decreciente, cuyas variables serían el tamaño de la interfaz iónica y la longitud de Debye, parámetro que caracteriza el decaimiento espacial del potencial a través de la capa de difusión.

$$L_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_r V_t}{2n^0 z^2 q}} \quad (4)$$

Donde:

L_D : Longitud de Debye.

$\epsilon_0 \epsilon_r$: Permitividad dieléctrica del electrolito.

V_t : Voltaje térmico (kT/q).

n^0 : Concentración de iones en el electrolito (iones/litro).

z : Valencia de los iones.

q : Carga eléctrica de un electrón.

Esto permite definir la capacitancia de interfaz como la presente en un sistema simple de placas paralelas separadas por una distancia igual a la longitud de Debye, cuyos cambios por cargas móviles son involucrados por un coseno hiperbólico.

$$C_{GC} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r A}{L_D} \cosh\left(\frac{zV_0}{2V_t}\right) \quad (5)$$

Donde:

V_0 : Potencial eléctrico en el electrodo.

2.5.3 Stern y la capacitancia de interfaz total (C_{IT})

Experimentalmente, se observaron inconsistencias con la capacitancia de Gouy - Chapman al ser ésta mayor de lo que se observaba; para solucionar este problema Stern (1924) combinó ésta y la capacitancia de Helmholtz para obtener una figura más adecuada de la capacitancia de interfaz, lo que se conoce ahora como la capacitancia de interfaz total.

$$C_{IT} = \frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_{GC}} \quad (6)$$

2.6 Resistencia eléctrica de interfaz y de solución biológica

Es necesario tomar en cuenta que existe una resistencia al flujo de corriente en la interfaz electrodo - electrólito, la cual es de suma importancia conocer debido a que aporta en gran medida a la atenuación de las señales que deseamos medir. Además, aunque los líquidos biológicos tienden a ser buenos conductores debido a sus altas concentraciones iónicas, es necesario conocer el valor preciso de la resistencia en este líquido para estimar los potenciales extracelulares de las células objetivo.

2.6.1 Resistencia eléctrica por transferencia de carga (R_{tc})

En la doble capa de Helmholtz se forma una región de movimiento iónico constante, esto produce corrientes eléctricas desde y hacia el grueso del electrólito; sin embargo, la suma total de estas corrientes tiende a un equilibrio.

Corrientes externas que traten de ir de electrodo a electrólito y viceversa, debidas a algún potencial externo a la interfaz, se encontrarán con estas corrientes por transferencia de carga y se verán limitadas al intentar sacar del equilibrio a esta región, esta limitación se modela como una resistencia en la interfaz electrodo - electrólito, cuyo valor depende de la densidad de corriente en equilibrio de la doble capa de Helmholtz (J_{eq}), el voltaje térmico (V_t) y la valencia de los portadores responsables de la transferencia de carga (z).

$$R_{tc} = \frac{V_t}{J_{eq} z} \quad (7)$$

2.6.2 Resistencia eléctrica por dispersión (R_d)

Se le denomina resistencia por dispersión a la resistencia eléctrica que ofrece el electrólito al paso de corriente de un electrodo en el medio a otro. Este parámetro es calculado empleando la relación geométrica de la resistividad con la resistencia, considerando la resistividad eléctrica del medio (ρ), el área de los electrodos (A) y la distancia a la que se encuentran separados (d).

$$R = \frac{\rho d}{A} \quad (8)$$

Existen varias aproximaciones de esta fórmula para diferentes geometrías; así, para un arreglo planar de electrodos circulares cuyo contra electrodo es infinitamente grande se expresa como se muestra en (9) [27].

$$R_d = \frac{\rho}{4r} \quad (9)$$

Donde:

ρ : Resistividad eléctrica del medio [Ωm].

r : Radio del electrodo [m].

Además, en un arreglo de múltiples electrodos, se debe considerar la posición relativa de uno con respecto a los demás para calcular sus resistencias de dispersión individuales, con lo que la resistencia por dispersión total de un electrodo se forma del paralelo de R_d para cada otro electrodo en el electrólito.

2.7 Modelo eléctrico total de la interfaz electrodo - electrólito

El modelo eléctrico total de la interfaz electrodo - electrólito (Figura 2.3) es el mismo tanto para electrodos destinados a estimulación como para electrodos destinados al sensado celular. La diferencia radica en los valores de los componentes que lo conforman, los cuales son dependientes de la forma del electrodo y las propiedades del medio.

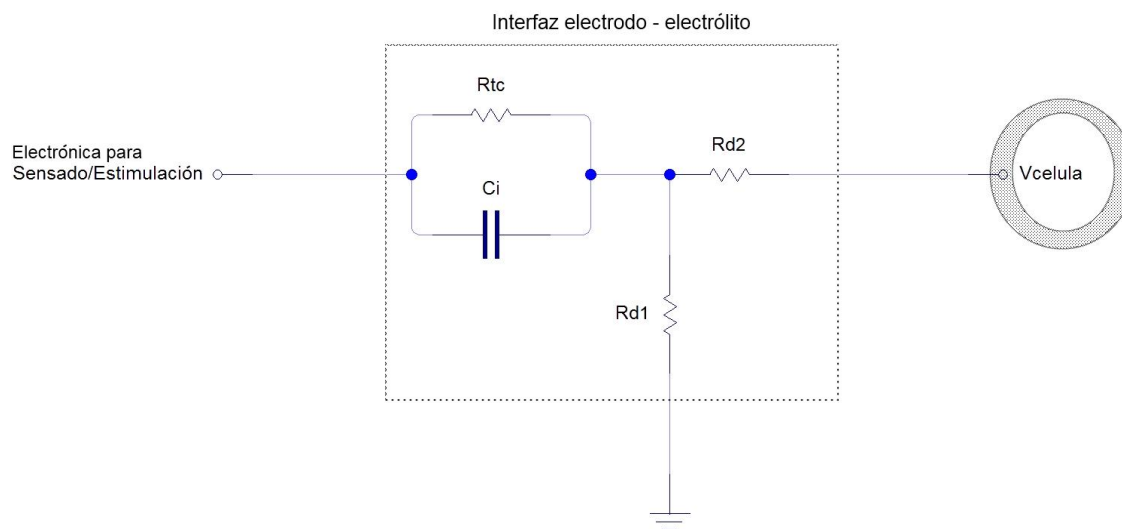


Figura 2.3. Modelo eléctrico total de la interfaz electrodo - electrólito y su conexión eléctrica a una célula.

2.8 Espectroscopía de impedancia electroquímica

La espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS, por sus siglas en inglés) es un método que se emplea exitosamente para caracterizar electrodos para micro sensores [28]. Se seleccionó esta técnica por su amplia documentación y relativa facilidad de aplicación [29]. Consiste en aplicar un estímulo (generalmente tensión eléctrica) al sistema que se desea caracterizar y al medir su impedancia se relacionan las propiedades del objeto de estudio con los cambios en esta propiedad eléctrica. La estructura física y las reacciones químicas que ocurren en el material son las principales responsables de los cambios en la impedancia medida.

Algo importante a remarcar acerca de EIS es que representa una poderosa herramienta de caracterización que no es destructiva al objeto de estudio [30], por lo que se puede emplear varias veces en el mismo objeto para generar mediciones con mayor confianza. Ahondando en esta técnica, la impedancia electroquímica usualmente se obtiene aplicando una diferencia de potencial alternante a diferentes frecuencias en las terminales de una celda electroquímica y midiendo la corriente a través de ella.

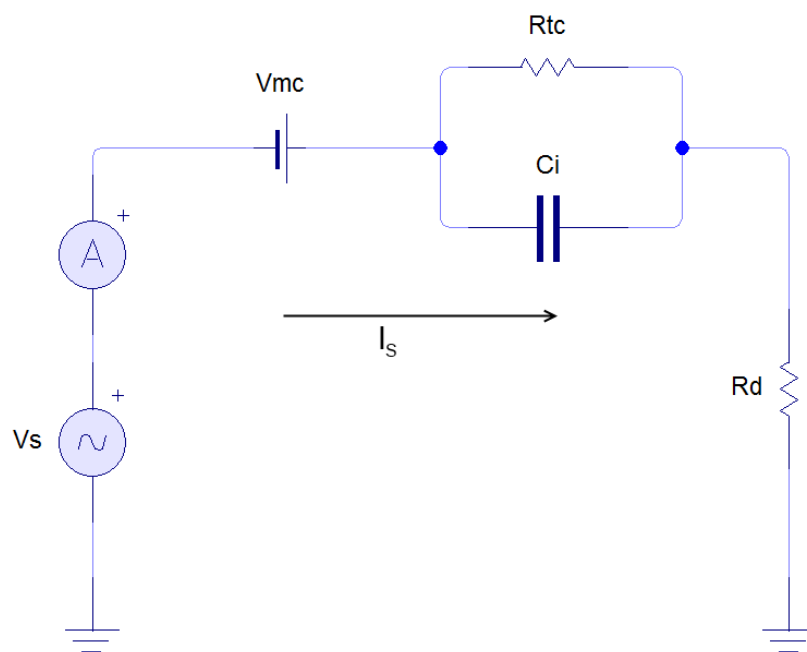


Figura 2.4. Aplicación de un voltaje arbitrario pero conocido (V_s) al modelo de media celda de Helmholtz.

Como primera aproximación al problema de caracterizar la interfaz electrodo-electrólito, se toma un solo electrodo del modelo de doble capa de Helmholtz y se aplica una diferencia de potencial arbitraria pero conocida (V_s) entre sus terminales (Figura 2.4). La corriente eléctrica es medida con un amperímetro y se compara con la ecuación que describe la respuesta de este sistema para obtener la impedancia eléctrica de la interfaz.

La respuesta del modelo se expresa en el dominio de la frecuencia como la suma de las impedancias complejas de los elementos del circuito, descrita en la ecuación (10).

$$V_s(j\omega) = I_s(j\omega) \left[Z_{R_d} + \frac{Z_{C_i} Z_{R_{tc}}}{Z_{C_i} + Z_{R_{tc}}} \right] - V_{mc} \quad (10)$$

Donde:

$$Z_{R_d} = R_d; \quad Z_{R_{tc}} = R_{tc}; \quad Z_{C_i} = \frac{1}{j\omega C_i}$$

La impedancia del electrodo queda entonces caracterizada en la ecuación (11).

$$Z(j\omega) = \frac{V_s(j\omega)}{I_s(j\omega)} = Z_{R_d} + \frac{Z_{C_i} Z_{R_{tc}}}{Z_{C_i} + Z_{R_{tc}}} - \frac{V_{mc}}{I_s(j\omega)} \quad (11)$$

De la ecuación (11) se aprecia que es deseable la selección de un material con un potencial pequeño de media celda (V_{mc}) para la fácil caracterización de los demás valores del electrodo, debido a que minimiza el impacto de la impedancia variable $\frac{V_{mc}}{I_s(j\omega)}$.

Expandiendo esta primera aproximación, se agrega un segundo modelo de media celda el cual representa a un segundo electrodo, idéntico al primero, empleado para referenciar el medio a tierra (Figura 2.5).

La respuesta total queda expresada por la ecuación (12)

$$V_s(j\omega) = I_s(j\omega) \left[Z_{R_d} + 2 \frac{Z_{C_i} Z_{R_{tc}}}{Z_{C_i} + Z_{R_{tc}}} \right] - V_{mc} + V_{mc} \quad (12)$$

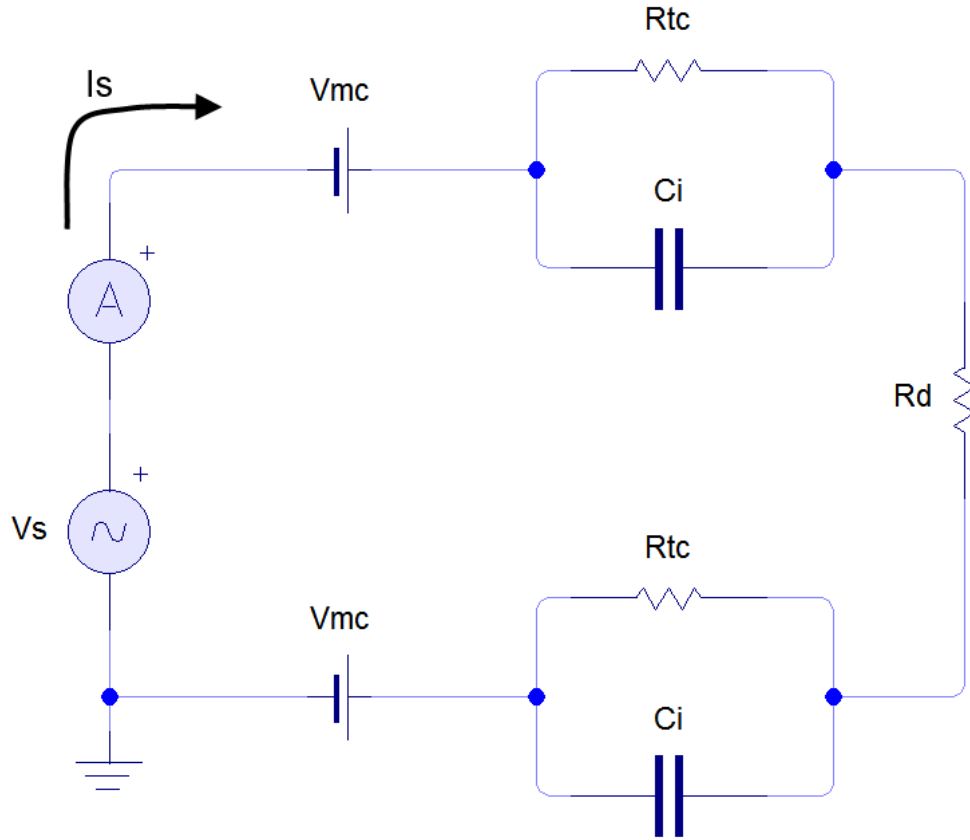


Figura 2.5. Modelo completo de dos electrodos en contacto con un medio acuoso. R_d representa la resistencia que presenta este medio al paso de corriente entre los electrodos.

En el caso ideal de dos electrodos idénticos el potencial de media celda se anula y la impedancia total de los electrodos se obtiene fácilmente. En condiciones reales aun quedará una diferencia entre ambos potenciales de media celda, pero empleando electrodos del mismo material, forma y proceso de fabricación ayuda a minimizar el error introducido por este factor.

Finalmente, la impedancia total del sistema está descrita por la ecuación (13).

$$Z(j\omega) = \frac{V_s(j\omega)}{I_s(j\omega)} = \left[Z_{R_e} + 2 \frac{Z_{C_i} Z_{R_{tc}}}{Z_{C_i} + Z_{R_{tc}}} \right] \quad (13)$$

3 Selección de materiales

Como en la mayoría de los dispositivos, la elección adecuada de los materiales a usarse juega un papel fundamental en la viabilidad y funcionalidad del sistema, determinando su peso, rigidez estructural, transparencia óptica, conductividad eléctrica, inflamabilidad, caducidad, etc. Más aun, en las disciplinas de la ingeniería que integran a la biología y medicina, es de especial importancia determinar la biocompatibilidad de estos materiales.

3.1 Materiales para sustrato y capa para microfluídica

Existe una gran cantidad de materiales para trabajar el sustrato o la microfluídica de un sistema MEMS. En BioMEMS, tal cantidad se ve limitada por la necesidad de encontrar los materiales que permitan el estudio de células vivas sin que estos interactúen de forma adversas con ellas. Aquí se presentan algunos de los más usados.

3.1.1 PDMS

El polidimetilsiloxano (PDMS) es un elastómero basado en silicio con varias propiedades mecánicas y ópticas deseables en BioMEMS. Es un material no tóxico para las células, presenta poca interacción con el medio de cultivo que las sustenta y es permeable a los gases. Además, su baja autofluorescencia y buena transparencia óptica en el rango de la luz visible es de gran ayuda en aplicaciones que requieren microscopía [5].

Este material, además, presenta gran facilidad en su manejo para almacenamiento y producción de prototipos, tiene gran resolución de copiado de patrones y no se necesitan aparatos especializados para su manipulación [31]. Otra ventaja del PDMS es su bajo costo, lo que permite el prototipado rápido, y por ende, el refinamiento del diseño de los dispositivos.

3.1.2 Poliestireno

El poliestireno es el tipo de plástico más utilizado para construir equipos dedicados a realizar cultivos celulares. Presenta toxicidad nula para las células, buena rigidez mecánica y gran facilidad de obtención a precios moderados. Algunos tipos de poliestireno presentan transparencia óptica en el rango de la luz visible, lo que permite su uso en aplicaciones que requieren de microscopía para obtener observaciones desde el chip. Sin

embargo, su manipulación para crear micro-prototipos es complicada al ser un material que se trabaja por termo formado, lo que requiere equipo especializado de alta precisión [31].

3.1.3 Vidrio

El vidrio presenta una de las opciones de menor costo para conformar el sustrato de un dispositivo BioMEMS [5]; sin embargo, es también el más difícil de trabajar por necesitar equipos de precisión para grabar micro diseños en su superficie. Presenta transparencia óptica en el rango de la luz visible, es un material sumamente rígido, no es permeable a los gases y es totalmente inerte a la presencia de células o el medio que las sustenta.

En la Tabla V se presenta un resumen de las características de cada material. La manipulación del material se refiere a la facilidad de producir un dispositivo MEMS a partir de él.

Tabla V: Principales materiales para la fabricación de BioMEMS y algunas de sus características [5], [31].

Material	Toxicidad	Permeabilidad	Óptica	Costo	Manipulación
PDMS	Biocompatible	Gas	Transparente	\$\$	Fácil
Poliestireno	Biocompatible	Variable, Gas	Transparente	\$\$	Difícil
Vidrio	Biocompatible	No	Transparente	\$	Moderado

En el presente trabajo se selecciona PDMS como material de construcción para la capa de microfluídica porque, además de su biocompatibilidad, facilidad de uso, buena transparencia óptica en el rango de la luz visible, baja autofluorescencia y bajo costo, es un material sencillo de usar para obtener un prototipo funcional empleando una gran gama de procesos de micro manufactura como micro maquinado y litografía suave [5]. Para el sustrato se eligió vidrio por su biocompatibilidad, bajo costo, resistencia a ser deformado y transparencia en el rango visible.

3.2 Materiales para electrodos

Se han estudiado varios materiales que sirven para la construcción de electrodos útiles en aplicaciones MEMS, siendo algunos de los más notables PDMS combinado con negro de carbón (*carbon black*) [32], [33], plata - cloruro de plata [34], [35], PDMS combinado con nanotubos de carbono [36], ITO (*Indium Tin oxide*) [13] y oro [37]. Definir el material y el diseño de los electrodos del sistema es fundamental para este trabajo, ya que su cuidadosa selección genera condiciones de medición u excitación deseables, que mejoran la fiabilidad de los resultados del sistema. Dependiendo si se desean electrodos de estimulación o sensado se requieren características diferentes para los materiales de los que serán fabricados [21].

A continuación se analizan las propiedades, ventajas y desventajas de algunos de los materiales más empleados para construir micro electrodos para electrofisiología celular superficial.

3.2.1 Plata - Cloruro de plata

Los electrodos fabricados con plata - cloruro de plata son actualmente de uso estándar para sensado en aplicaciones tanto extracelulares como intracelulares. Estos electrodos son usualmente no planares y de gran tamaño (1 - 5 [cm]) pero se ha empezado a explorar su uso en micro sistemas [38]. Generalmente, se fabrican sumergiendo el cuerpo principal del electrodo, formado de plata, en un baño con iones de cloro los cuales al entrar en contacto con la superficie de este generan un recubrimiento de cloruro de plata [39].

Estos electrodos presentan desventajas si se desean emplear para estimulación debido a que, dependiendo del tipo de señal para el estímulo, se degradan al tener pérdida de iones en su superficie por el paso de corrientes eléctricas. Si estos electrodos se someten a una señal monofásica, la generación de iones se da en un solo sentido, lo que en periodos largos llega a causar la pérdida total de la interfaz de cloruro de plata, exponiendo plata pura al medio de cultivo. Esto no sólo causa la degradación de la interfaz electrodo-electrólito, sino que también el electrodo empieza a liberar iones de plata en el medio, los cuales envenenan el cultivo celular [2]. Si en cambio se emplea una señal de estimulación bifásica y simétrica, el flujo de iones se generaría en ambos sentidos (entrando y saliendo

del medio) a intervalos regulares, lo que causa una menor pérdida en el material del electrodo, nula en un caso ideal.

Algunas ventajas de estos electrodos suman su gran disponibilidad en el mercado, gran cantidad de estudios basados en su fiabilidad, baja resistividad eléctrica $15.9 \times 10^{-9} [\Omega m]$ [40], facilidad de manejo, bajo potencial de *offset* y bajo costo relativo a electrodos fabricados de otros metales, tales como oro y platino.

Las desventajas que presentan son la necesidad de usarse en cultivos celulares cuyo medio y características de excitabilidad contengan iones de cloro y su limitado uso como electrodos para excitación debido a su posible polarización por efectos del degradado en su superficie de cloruro de plata.

3.2.2 Platino y oro

Estos metales nobles son empleados generalmente para la construcción de electrodos en disciplinas afines a la neurología y otras áreas de estudio donde se necesitan estructuras mecánicas rígidas que soporten procesos de implantación. Son electroquímicamente inertes lo que significa que los electrodos construidos con estos materiales al ser sumergidos en un electrolito y ser sometidos a una corriente eléctrica no presentan pérdida ni ganancia de iones, más bien catalizan otras reacciones en sus superficies y agregan o sustraen electrones de ellas, lo que les permite transmitir la corriente eléctrica sin consumir el material del electrodo. Generalmente se les modela como capacitores debido a esta característica.

Gracias a la poca resistividad eléctrica del oro y del platino, $22.14 \times 10^{-9} [\Omega m]$ y $105 \times 10^{-9} [\Omega m]$ respectivamente [40], forman excelentes electrodos para estimulación y sensado, pero tienden a ser susceptibles a fuentes de ruido externo por lo que su uso en aplicaciones de sensado en agregados celulares debe ser cauteloso y generalmente se requiere de su uso junto con equipos electrónicos de filtrado de señales [3]. Otro factor a tomar en consideración es su elevado costo y moderada disponibilidad en el mercado, debido a que se requieren materiales de grado médico para asegurar que no sean contaminados los agregados celulares donde sean aplicados [37].

3.2.3 Iridio - oxido de iridio

De forma similar a como funcionan los electrodos de plata - cloruro de plata, los electrodos hechos con iridio-óxido de iridio basan su funcionamiento en el intercambio de iones con el electrólito para transmitir corrientes eléctricas.

Las ventajas que aporta este tipo de electrodo son excelente durabilidad, la mayor resistencia a la corrosión de los materiales presentados hasta el momento y gran resistencia mecánica. Al tener una resistividad eléctrica de $47.1 \times 10^{-9} [\Omega m]$ [40] mayor a la de la plata ($15.9 \times 10^{-9} [\Omega m]$) tienden a no ser tan buenos electrodos de sensado como ésta, pero forman excelentes electrodos de estimulación.

Debido a su dureza, fragilidad y punto de fusión alto (lo que impide fundirlo y depositarlo en los sustratos mostrados en este trabajo), el iridio sólido es difícil de usar, cambiar de forma o mecanizar, por lo que se suele emplear en forma de polvo suspendido en una matriz polimérica que lo contenga. También se consigue como madejas de finos hilos que llegar a medir 150 [μm] de diámetro, dimensiones adecuadas para generar un micro electrodo; sin embargo, su manipulación resulta un problema al ser un material quebradizo e inviable para fabricar micro-electrodos planares no invasivos, como los que se busca construir en este trabajo.

3.2.4 Acero inoxidable

Este material cuenta con una resistividad eléctrica grande en comparación a los demás conductores tratados hasta el momento ($460 \times 10^{-9} [\Omega m]$) [40], lo que limita su uso para electrodos de sensado de señales en el rango de los cientos de milivolts. Este problema se remedia construyendo los electrodos a lo largo de áreas grandes para minimizar su impedancia total, pero al hacerlo se limita la posibilidad de miniaturizar como es el caso de aplicaciones MEMS. Debido a su bajo costo, el acero inoxidable se emplea generalmente como un medio barato para crear electrodos de estimulación. Otra característica que posee es la poca corrosión que sufre al entrar en contacto con líquidos salinos, por lo que se usa en aplicaciones donde es crítico que la vida útil del material no comprometa el experimento que se lleve a cabo.

Este material es atractivo por su bajo costo, alta disponibilidad y gran resistencia mecánica sin embargo el problema principal que tiene para aplicaciones de micro electrodos es la dificultad de manufacturar estos a partir de un material tan resistente [3].

3.2.5 PDMS dopado con partículas conductoras

En años recientes se ha explorado el dopaje de PDMS con numerosos aditivos para cambiar sus propiedades térmicas [41], ópticas [42] y eléctricas [43]. Al combinar algunos de estos materiales (dopantes) en suficiente proporción con un polímero como el PDMS (aislante eléctrico en su forma pura) se crea un material conductor cuya conductividad eléctrica es directamente proporcional a la concentración del dopante en el polímero. Los carbones amorfos (como el negro de carbón), los nanotubos de carbono de multicapa (*Multi-walled carbon nanotubes*) y algunas micro partículas de metales (plata, oro) son ejemplos de esta clase de materiales dopantes. Se ha demostrado que se logran buenos niveles de conducción a bajas concentraciones de dopante en la matriz polimérica [44]. En la Tabla VI se presentan las concentraciones y algunas de las propiedades reportadas de estos materiales combinados con PDMS para su comparación [44], [45].

Tabla VI: Principales agentes de dopado para aumentar la conductividad eléctrica del PDMS [44], [45].

	Negro de carbón	Nanotubos de carbono de multi capa	Plata
Porcentaje de dopado en PDMS por peso [%]	24	20	85
Conductividad eléctrica exhibida [$S\ m^{-1}$]	10	0.35	10
Conductividad eléctrica propia del material dopante [$S\ m^{-1}$]	1×10^3	23×10^3	63×10^6

Las ventajas de los electrodos hechos a partir de estos materiales se manifiestan al ser inertes a los cultivos celulares, su fácil integración a dispositivos fabricados en PDMS, flexibilidad de fabricación tanto de forma como de propiedades físicas al cambiar su relación de concentración dopante - polímero y bajo costo. Otra ventaja resulta de no necesitar material o instrumentos especializados demasiado costosos para su manejo y fabricación.

Aunque se ha comprobado que estos electrodos funcionan tanto para sensado como para excitación de células, se ha encontrado que suelen introducir componentes importantes de ruido a los registros de sensado en varias aplicaciones, por lo que su uso de esta forma es limitado [33], [45]. Aun se sigue estudiando su viabilidad para estudios a largo plazo.

La Tabla VII resume las características más importantes de cada material, discutidas previamente, tanto para aplicaciones de sensado como de estimulación celular.

Tabla VII: Comparación de propiedades de diferentes electrodos para biopotenciales [46].

Tipo de electrodo	Para sensado	Para estimulación
Plata - Cloruro de plata	Bajo ruido electroquímico Bajo potencial de offset Bajo potencial de deriva Moderadamente costosos	Moderadamente útil con excitaciones bifásicas Pierden cloruro de plata con estimulaciones monofásicas
Platino y oro	Ruidosos a bajas frecuencias Exhiben potenciales de deriva Costosos	Excelentes para estimulaciones por periodos largos Funcionan bien con estimulación monofásica y bifásica
Iridio - Oxido de iridio	Generalmente ruidosos	Buen comportamiento general Gran transferencia de carga por unidad de área Muy costosos
Acero inoxidable	Ideales para señales de gran amplitud Bajo costo	Buen desempeño para aplicaciones cortas Bajo costo
PDMS con negro de carbón, nanotubos de carbón de multicapa o micro partículas metálicas	Generalmente ruidosos Aun en estudio	Buen comportamiento general Conductividad dependiente de su concentración Funcionan bien con estimulación monofásica y bifásica Bajo costo

Para los electrodos que formarán la parte de estimulación y sensado del biochip se optó por emplear plata - cloruro de plata debido a su extenso estudio, moderada facilidad de fabricación, excelente conductividad, bajo costo y bajo potencial de *offset* [21].

4 Diseño y construcción de un arreglo de micro electrodos

El diseño propuesto se concentró en resolver la estimulación y sensado de dos posibles fuentes de estudio propuestas: agregados celulares y porción de tejido vivo. Sin embargo, el proceso de fabricación de los diferentes diseños aquí propuestos fue el mismo, por lo que éstos pudieron ser fabricados en un sólo sustrato al mismo tiempo. Esto último aumenta la versatilidad de un mismo chip y acorta el tiempo entre iteraciones de diseño, construcción, prueba y corrección de fallas.

En esta sección se presentan por separado los diferentes diseños construidos, su fundamentación de forma y el proceso de fabricación que se llevó a cabo. Posteriormente se presenta un análisis de la resistencia eléctrica de las trazas conductoras contra el espesor de la plata depositada, definiendo este parámetro para obtener poca resistencia eléctrica.

4.1 Diseño de un arreglo de electrodos planares

Se decidió emplear como sustrato un porta objetos de vidrio con dimensiones 75 x 50 x 1 [mm], con el objeto de estandarizar el tamaño del chip en vista de su futura implementación en otros proyectos similares. En esta área se incluyeron 4 diseños diferentes de electrodos para aprovechar el proceso de fabricación y aumentar la rapidez entre las etapas de prototipado y prueba.

El área que cubren los diseños es dependiente del objeto de estudio en particular. Se definieron dos objetos de estudio: agregados celulares y porciones de tejido. Para determinar su forma y dimensiones fue necesario investigar los protocolos de estudio celular que se emplean en el Taller de Biofísica de Sistemas Excitables Extendidos de la Facultad de Ciencias de la UNAM, laboratorio que provee las células usadas en las pruebas del presente trabajo. Se definieron los siguientes parámetros de diseño:

- Agregados celulares: Conjunto de células disgregadas que pueden ser contenidas en un área circular máxima de 800 [μm]. Esta área es dependiente de la cantidad de células obtenidas para la prueba y puede variar.

- Porción de tejido: Trozo pequeño de un tejido de forma variable. Como parámetro de diseño, se considero un prisma rectangular, como forma común, con dimensiones aproximadas de 200 $[\mu m]$ x 200 $[\mu m]$ x 5 $[mm]$.

La forma y dimensión de los electrodos de estimulación y sensado fue escogida con base en el objeto que se deseaba medir y estimular. Para los diseños enfocados en agregados celulares se utilizaron electrodos circulares con diámetros alrededor de los 20 $[\mu m]$, tamaño aproximado de las células empleadas, considerando la forma cuasi esférica de las células y que cada electrodo abarcara aproximadamente una célula completa.

Se emplearon electrodos cuadrados en los diseños enfocados en porciones de tejido para permitir estimular una región lineal que contuviera alrededor de 200 células (40 $[\mu m]$ x 100 $[\mu m]$) y sensar otras regiones de 100 células aproximadamente (20 $[\mu m]$ x 100 $[\mu m]$), a lo largo de la porción de tejido.

La distancia mínima entre electrodos se definió en 100 $[\mu m]$ para aminorar efectos de diafonía desde los electrodos de estimulación hacia los electrodos de sensado [47]. La diafonía, en este caso, se refiere a la presencia de la señal transmitida para excitar las células en los electrodos de sensado.

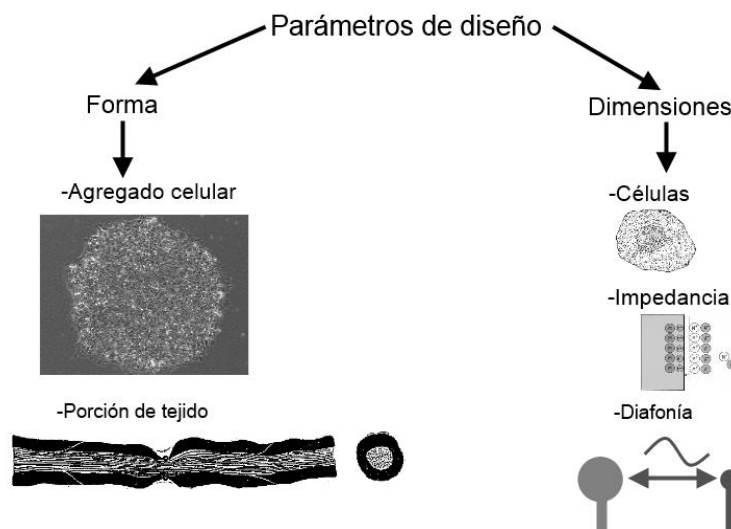


Figura 4.1. Parámetros de diseño del arreglo de micro electrodos.

4.1.1 Diseño 1: Agregado celular, 8 electrodos

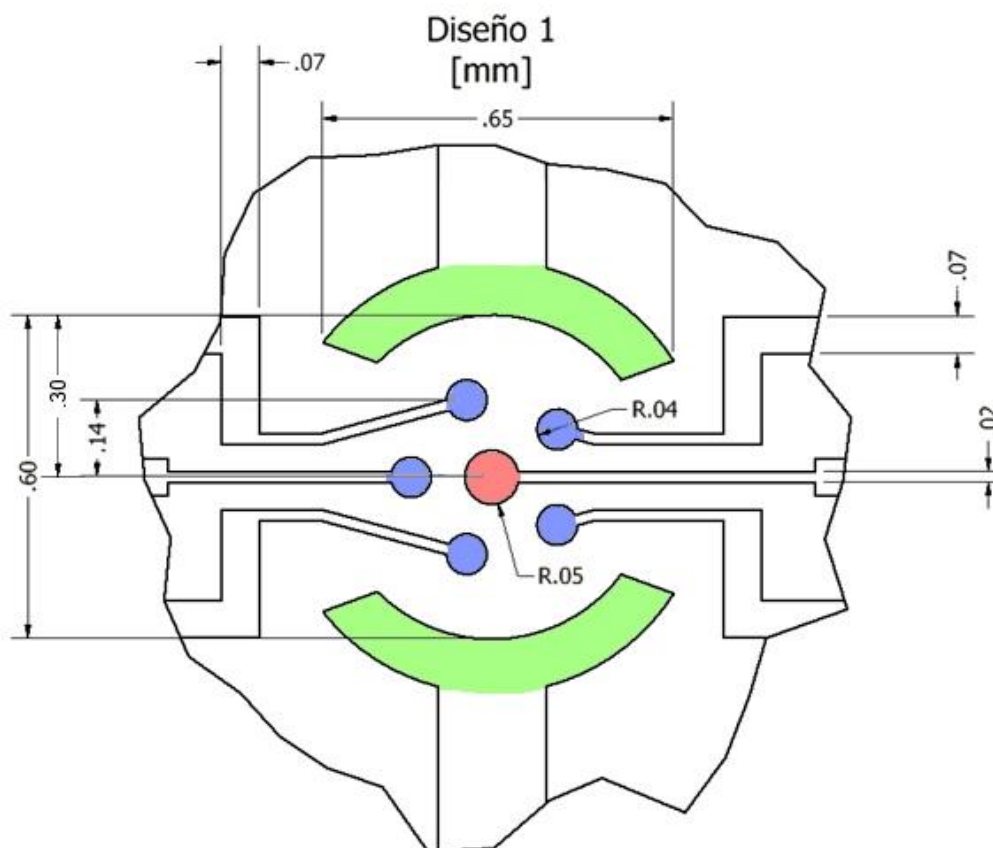


Figura 4.2. Diseño 1 para agregados celulares. Se denota en rojo el electrodo de estimulación, en azul los electrodos de sensado y en verde los electrodos de tierra. Dimensiones en [mm]. El espesor de capa es de 140 [nm] y se discute en la sección 4.1.5.

En la Figura 4.2 se muestra el primer diseño propuesto. Esta configuración de electrodos circulares y semicirculares fue diseñada para ser empleada en una región circular que contendría las células a estudiar. Este diseño permite estimular la región central del agregado celular y sensar efectos de propagación mediante los cinco electrodos de sensado (mostrados en azul) colocados equidistantemente a 100 [μm] del electrodo de estimulación (mostrado en rojo).

Se optó por una forma semicircular para los electrodos de tierra (mostrados en verde) debido a que se ajustan mejor a la forma circular de la región de estimulación y sensado propuesta, lo que permite aumentar el área del electrodo mejorando el contacto de éste con el electrolito y reduciendo el ruido causado por un aterrizado deficiente.

La Tabla VIII muestra las dimensiones de las características geométricas de los electrodos, así como sus áreas y el área total destinada a cada función en el arreglo.

Tabla VIII: Dimensiones lineales y área ocupada por cada tipo de electrodo en el diseño 1.

Tipo de electrodo	Radio [μm]	Área por electrodo [μm^2]	Cantidad de electrodos	Área total ocupada [μm^2]
Sensado	38	4536.0	5	22680.0
Estimulación	50	7854.0	1	7854.0
Tierra	-	62000.0	2	124000.0

En la Tabla IX se muestran los parámetros eléctricos que presenta este diseño de electrodos en presencia del medio biológico descrito en 2.3. Los valores fueron calculados empleando las ecuaciones mostradas en las secciones 2.5 y 0. En el Anexo 8 se encuentra un programa en MATLAB que calcula estos resultados.

Tabla IX: Parámetros eléctricos teóricos del diseño 1. Rd_2 fue calculada tomando en cuenta una célula situada justo encima del electrodo a 50 [μm] de él, ver de nuevo la Figura 4.2.

Parámetro	Electrodos de sensado	Electrodos de estimulación
$Area [\mu m^2]$	4536.5	7854.0
$C_i [nF]$	2.654	4.595
$R_{tc} [k\Omega]$	287.8	166.2
$Rd_1 [k\Omega]$	5.71	3.30
$Rd_2 [k\Omega]$	3.41	2.59

4.1.2 Diseño 2: Agregado celular, 12 electrodos

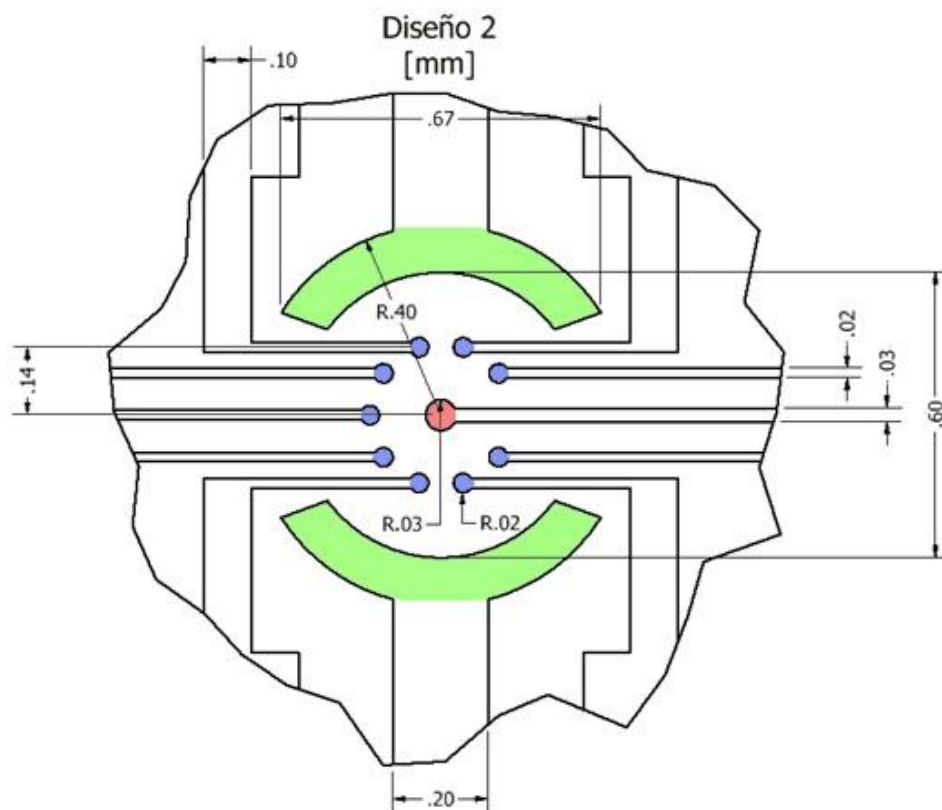


Figura 4.3. Diseño 2 para agregados celulares. Se denota en rojo el electrodo de estimulación, en azul los electrodos de sensado y en verde los electrodos de tierra. Dimensiones en [mm]. El espesor de capa es de 140 [nm] y se discute en la sección 4.1.5.

En la Figura 4.3 se muestra el segundo diseño propuesto, el cual comparte el mismo enfoque que el primer diseño de electrodos circulares y semicirculares para ser empleado en una región circular que contendría las células a estudiar. Sin embargo, en este diseño se propuso la implementación de una mayor cantidad de electrodos de sensado distribuidos en un área similar, a expensas de reducir el área individual de cada electrodo. Con esto se estimula la región central del agregado celular y permite sensor efectos de propagación de la señal estimulante a lo largo del objeto de estudio mediante los nueve electrodos de sensado (mostrados en azul) colocados equidistantemente a 100 [μm] del electrodo de estimulación (mostrado en rojo).

Este diseño continúa el uso de una forma semicircular para los electrodos de tierra (mostrados en verde) debido a que la capa de microfluídica empleada sobre el arreglo es circular (idéntica a la del primer diseño), por lo que las consideraciones propuestas siguen aplicándose: se permite aumentar el área del electrodo mejorando el contacto de éste con el electrólito y reduciendo el ruido causado por un aterrizado deficiente.

La Tabla X muestra las dimensiones dedicadas a los electrodos de sensado, estimulación y tierra en el diseño 2. Se observa que se ha introducido una mayor cantidad de electrodos pero el área total destinada a la estimulación y sensado se ha reducido con respecto al diseño 1.

Tabla X: Dimensiones lineales y área ocupada por cada tipo de electrodo en el diseño 2.

Tipo de electrodo	Radio [μm]	Área por electrodo [μm^2]	Cantidad de electrodos	Área total ocupada [μm^2]
Sensado	20	1256.6	9	11309.7
Estimulación	33	3421.2	1	3421.2
Tierra	-	62000.0	2	124000.0

La Tabla XI muestran los parámetros eléctricos que presenta el diseño 2 en presencia del medio biológico descrito en 2.3. Una vez más, los valores fueron calculados empleando las ecuaciones mostradas en las secciones 2.5 y 0. En el Anexo 8 se encuentra un programa en MATLAB que calcula estos resultados.

Tabla XI: Parámetros eléctricos teóricos del diseño 2. Rd2 fue calculada tomando en cuenta una célula situada justo encima del electrodo a 50 [μm] de él, ver de nuevo la Figura 4.3.

Parámetro	Electrodos de sensado	Electrodos de estimulación
$Area [\mu m^2]$	1256.6	3421.2
$C_i [nF]$	0.735	2.002
$R_{tc} [k\Omega]$	1038.9	381.6
$Rd_1 [k\Omega]$	20.62	7.57
$Rd_2 [k\Omega]$	6.48	3.93

4.1.3 Diseño 3: Porción de tejido, 12 electrodos

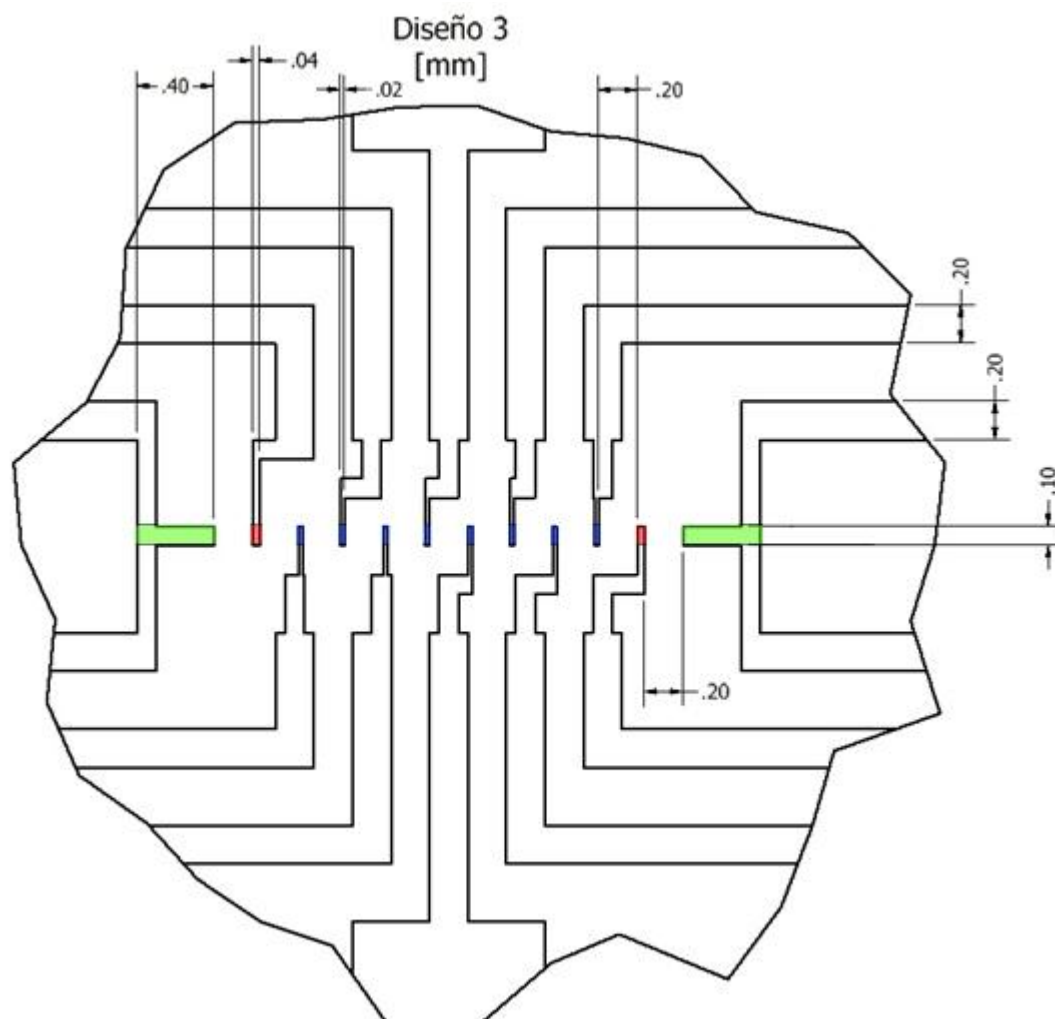


Figura 4.4. Diseño 3 para porción de tejido vivo. Se denota en rojo los electrodos de estimulación, en azul los electrodos de sensado y en verde los electrodos de tierra. Dimensiones en [mm]. El espesor de capa es de 140 [nm] y se discute en la sección 4.1.5.

El tercer diseño propuesto se enfocó en un arreglo de electrodos que cubriera una mayor área que los dos anteriores, permitiendo usar objetos de estudio de mayor tamaño como lo son las porciones de tejido vivo. Empleando como referencia una porción de tejido de 5 [mm] de largo por 2 [mm] de ancho, tamaño aproximado de un corte común en biología, se procedió al diseño de un conjunto de electrodos equidistantes entre sí a una distancia de 200 [μm] que permitiera abarcar la extensión de dicha porción.

En la Figura 4.4 se muestra el tercer diseño, en él se colocaron ocho electrodos rectangulares de sensado (denotados en azul) a lo largo de una línea. Dos electrodos rectangulares de estimulación (denotados en rojo) se agregaron a los extremos de ésta línea, lo que permite estimular la porción desde dos puntos colineales diferentes y sensar el potencial celular y los efectos de propagación en la porción de tejido.

En este diseño se emplearon electrodos rectangulares como electrodos de tierra (denotados en verde) debido a la forma lineal que tomó el arreglo. Se colocó un electrodo de tierra al lado de cada electrodo de estimulación para contener los efectos de estimulación eléctrica solamente a la zona donde se encuentran los electrodos de sensado. La longitud total del arreglo se estableció en 3.25 [mm], abarcando la mayor parte de una porción de tejido con las dimensiones antes descritas.

Como en los diseños anteriores, en la Tabla XII se presentan las dimensiones de los electrodos de estimulación, sensado y tierra, y en la Tabla XIII las características eléctricas para el diseño 3, calculados empleando las ecuaciones mostradas en las secciones 2.5 y 0. El programa mostrado en el Anexo 8 calcula estos resultados.

Tabla XII: Dimensiones lineales y área ocupada por cada tipo de electrodo en el diseño 3.

Tipo de electrodo	Longitud x anchura [μm]	Área por electrodo [μm^2]	Cantidad de electrodos	Área total ocupada [μm^2]
Sensado	100 x 20	2000.0	8	16000.0
Estimulación	100 x 40	4000.0	2	8000.0
Tierra	100 x 400	40000.0	2	80000.0

Tabla XIII: Parámetros eléctricos teóricos del diseño 3. Rd_2 fue calculada tomando en cuenta una célula situada justo encima del electrodo a 50 [μm] de él, ver de nuevo la Figura 4.4.

Parámetro	Electrodos de sensado	Electrodos de estimulación
$Area [\mu m^2]$	2000.0	4000.0
$C_i [nF]$	1.170	2.340
$R_{tc} [k\Omega]$	652.8	326.4
$Rd_1 [k\Omega]$	12.96	6.48
$Rd_2 [k\Omega]$	32.99	16.49

4.1.4 Resistencia de dispersión al objeto de estudio para cada diseño

Debido al comportamiento variable de R_{d2} con respecto a la distancia a la que se encuentre la célula objetivo del electrodo, se encuentra útil reportar las gráficas que modelan el comportamiento de esta resistencia con respecto a la distancia que separa a una célula del electrodo para cada diseño (Figura 4.5).

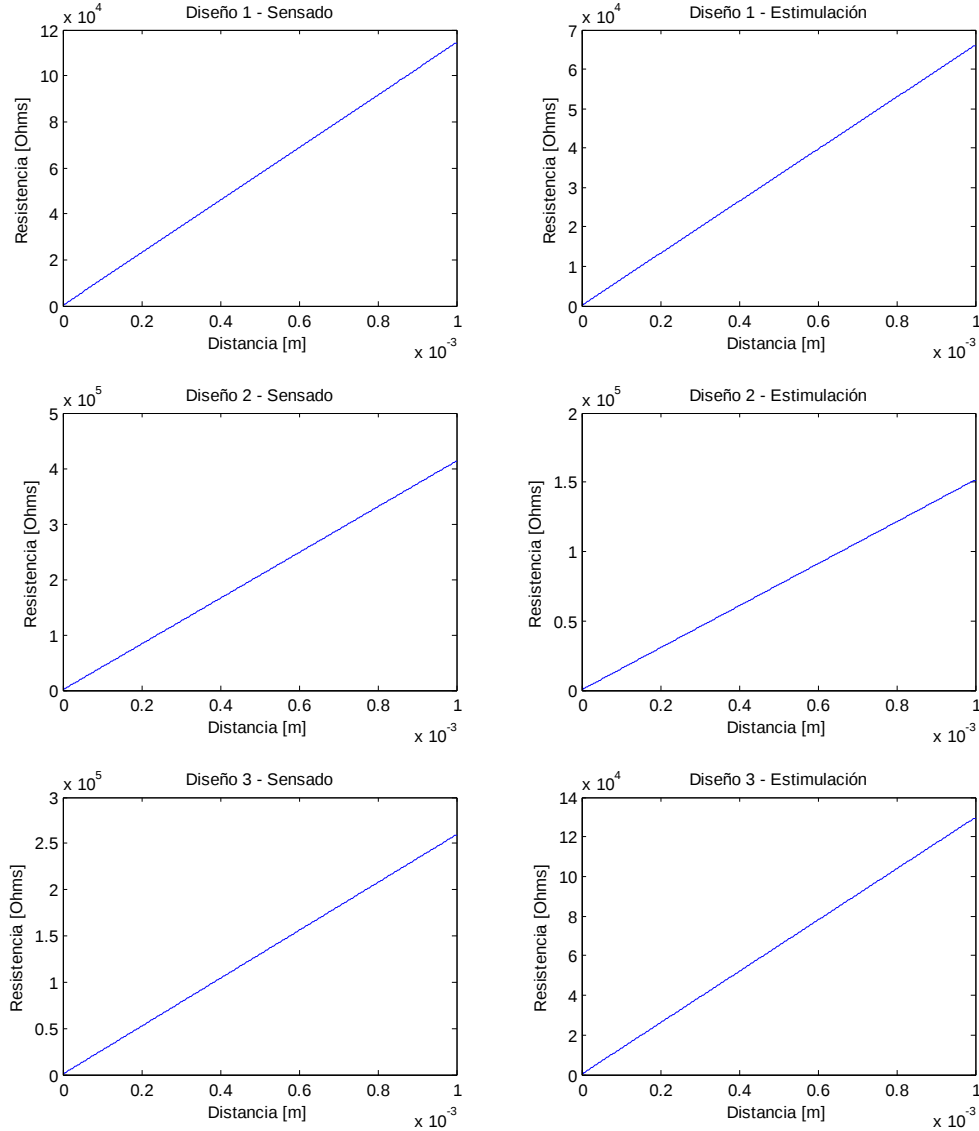


Figura 4.5. Gráficas de los valores calculados de resistencia eléctrica R_{d2} contra distancia de separación del objeto de estudio, para cada diseño (1-3) y tipo de electrodo (sensado - estimulación) a lo largo de un 1 [mm] de distancia, a partir de la superficie del electrodo hasta la superficie de la membrana celular.

4.1.5 Trazas conductoras

Debido a que los agregados y tejidos formados por las células excitables de interés tienen dimensiones a partir de las decenas de micrómetros hasta algunos milímetros y dado el interés por estudiar las señales eléctricas en diferentes puntos de la muestra (ya sea para obtener perfiles de propagación o respuestas puntuales localizadas), es necesario diseñar un arreglo de trazas conductoras micrométricas que se adecue a las dimensiones de los arreglos de electrodos diseñados.

Para permitir una manipulación fácil del prototipo, se optó por usar un tamaño estándar para los *pads* rectangulares de interconexión de 1.5 [mm] de ancho por 3 [mm] de largo y separados por 1 [mm] entre ellos. Se definieron 14 *pads* para acceder a todos los electrodos de cualquiera de los diseños, por lo que se diseñó un conjunto de trazas conductoras común para usarse en los tres diseños.

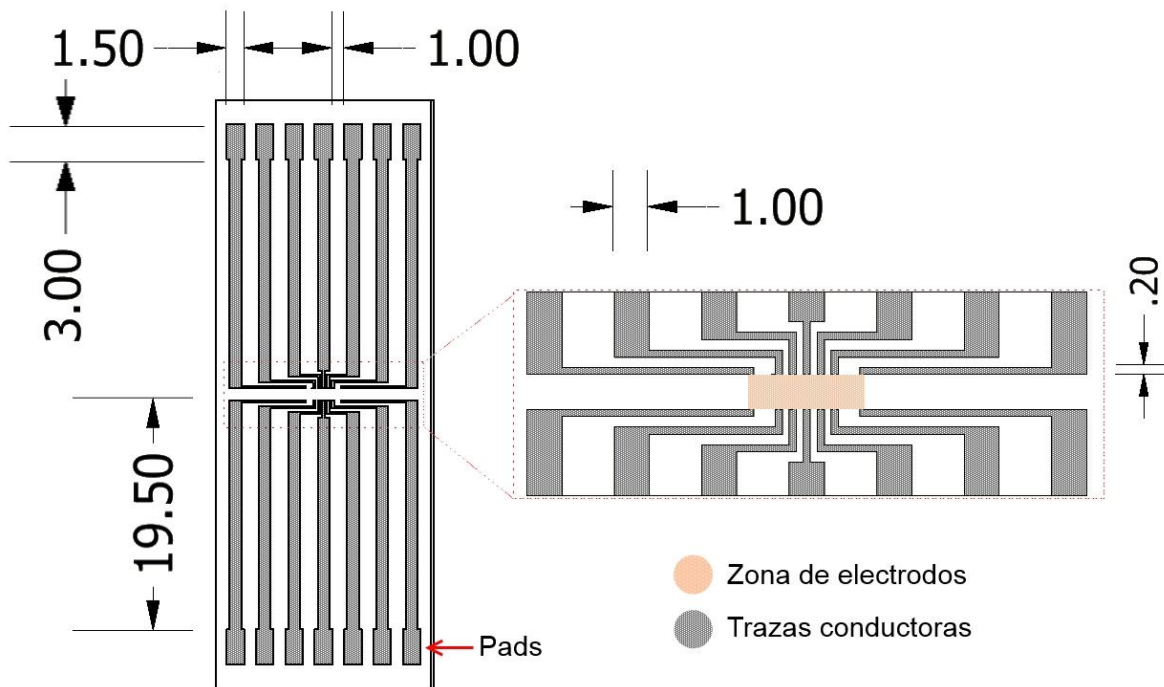


Figura 4.6. Esquema de trazas conductoras empleado para los diseños propuestos. Dimensiones en [mm].

La Figura 4.6 muestra el esquema de las trazas conductoras usadas para los tres diseños, las cuales fueron confinadas a un rectángulo de 18.55 [mm] de ancho por 50 [mm] de largo, exactamente un cuarto del área total de los portaobjetos de vidrio empleados como substrato, lo que permitió incluir cuatro arreglos por chip.

Para determinar el grosor de la capa de plata de los electrodos y las trazas conductoras, se tomó en cuenta la resistencia eléctrica total de cada traza por separado, la cual es proporcional a los elementos geométricos que conforman la traza, su grosor y a la resistividad eléctrica de la plata como se muestra en la ecuación (14).

$$R_{traza} = \frac{\rho_{plata} l}{\alpha \gamma} \quad (14)$$

Donde:

R_{traza} : Resistencia eléctrica por elemento geométrico de la traza conductora [Ω].

ρ_{plata} : Resistividad eléctrica de la plata [Ωm].

l : Longitud del elemento de la traza [m].

α : Ancho del elemento de la traza [m].

γ : Grosor de la capa de plata depositada [m].

La resistencia de la traza es inversamente proporcional al grosor de la misma, por lo que es deseable tener una capa relativamente gruesa de plata, sólo al punto en que la resistencia por traza se vuelve despreciable. En el Anexo 9 se agrega un programa en MATLAB que calcula esta resistencia eléctrica como función del grosor de capa para las dimensiones empleadas en el diseño de trazas. Se encontró que con un deposito de 140 [nm] de plata la resistencia eléctrica por traza se vuelve despreciable, cuyos valores se muestran en la Tabla XXIII.

4.1.6 Prototipo del arreglo de electrodos y capa de pasivación

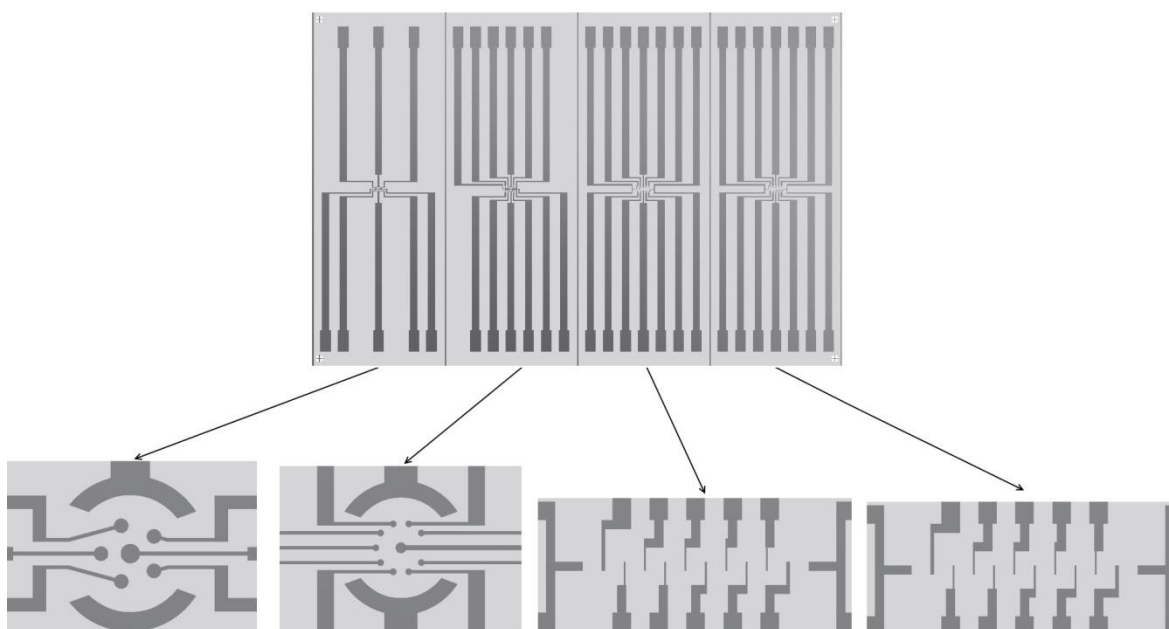


Figura 4.7. Prototipo con todos los diseños propuestos para el arreglo de electrodos planares. Se muestra la plata depositada (gris oscuro) sobre el sustrato de vidrio (gris claro)

Se combinó el diseño de trazas conductoras con cada diseño de electrodos para generar un prototipo de cada arreglo, contenidos en un mismo sustrato. Se optó por incluir dos prototipos del arreglo destinado a porciones de tejido (diseño 3) para contar con dos prototipos destinados a agregados celulares y dos para porciones de tejido en cada sustrato, como se muestra en la Figura 4.7. Para facilitar su identificación a escala normal, se eliminaron algunas trazas conductoras de los diseños que contenían menor número de electrodos y que por lo tanto no las utilizaban.

Es necesario agregar una capa de pasivación eléctrica al arreglo de electrodos para asegurar que la plata sólo entre en contacto con el medio biológico en los puntos de interés mostrados en cada diseño, lo que formará el área de electrodos como se muestra en la Figura 4.8. Para esta capa de pasivación se decidió usar SU-8, una resina fotosensible negativa, transparente en el espectro visible y de buena biocompatibilidad [48].

Esta capa se diseñó para que el SU-8 cubriera la totalidad de la superficie del prototipo exceptuando los electrodos, los *pads* de conexión y las pequeñas secciones de vidrio que servirán de anclaje para las células, de ser necesario, mediante el uso de algún adherente celular, como la polilisina.

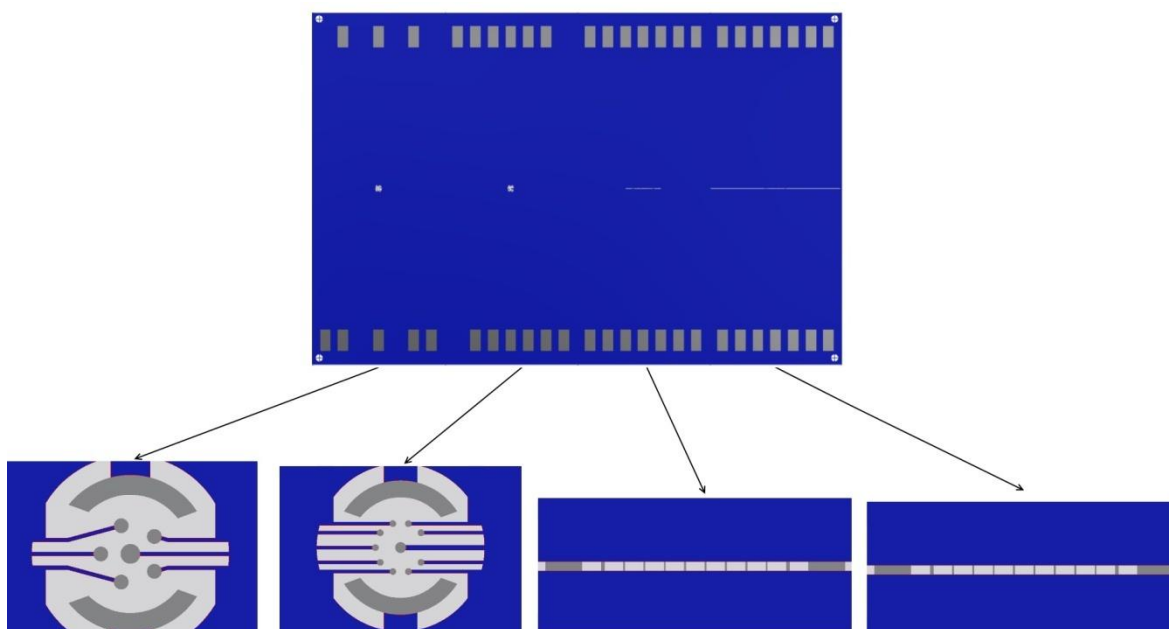


Figura 4.8. Prototipo del arreglo de electrodos con la capa de pasivación de SU-8 (Azul).

4.1.7 Capa de microfluídica abierta

Por último, se diseñó una capa de microfluídica abierta para contener al objeto de estudio (agregado celular, porción de tejido) y el medio biológico que lo sustentaría. Se decidió emplear la técnica de litografía suave (explicada en el Anexo 7: Litografía suave) para generar una capa de PDMS de 1 [mm] de grosor que contuviera la serie de microcanales y pozos mostrados en la Figura 4.9.

Los microcanales tienen una profundidad aproximada de 50 [μm] y fueron colocados para canalizar las burbujas de aire que quedan atrapadas entre el prototipo y esta capa durante su colocación. Los pozos denotados en rojo en la Figura 4.9 atraviesan por completo la capa de PDMS y permiten colocar manualmente el objeto de estudio sobre los arreglos de electrodos. Los primeros dos pozos de la izquierda (1 y 2) fueron destinados para los arreglos de electrodos enfocados en analizar agregados celulares y los últimos dos (3 y 4) a los que están enfocados en porciones de tejido. Las dimensiones de estos pozos son presentadas en la Tabla XIV y el prototipo finalizado en la Figura 4.10.

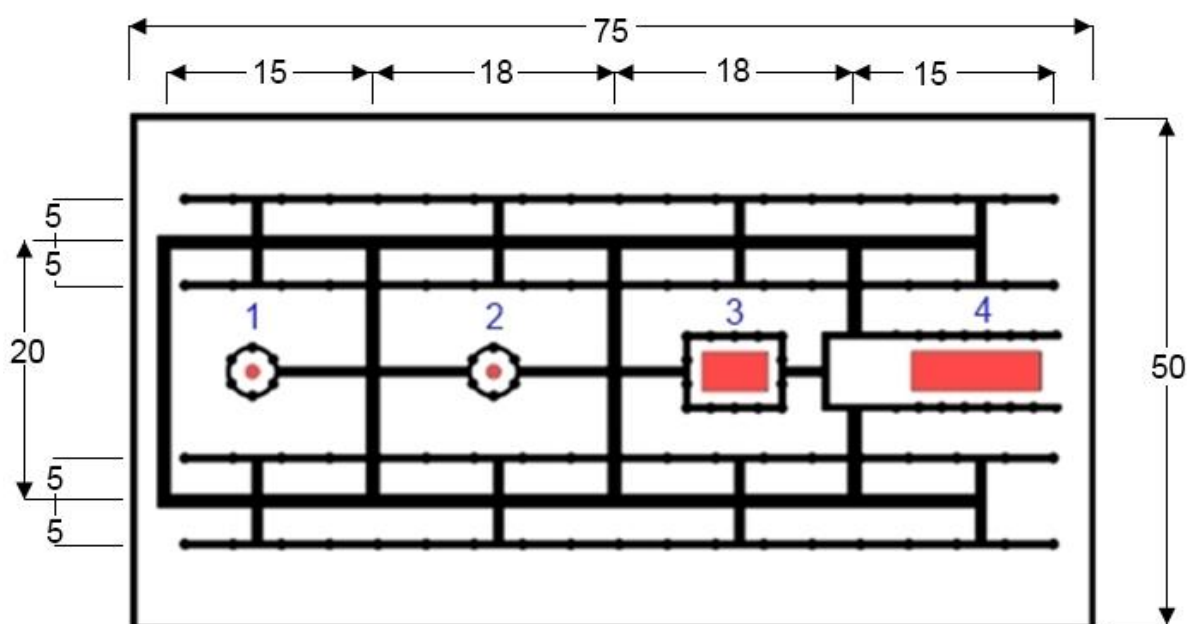


Figura 4.9. Patrón empleado para la capa de microfluídica abierta. Se muestran los micro canales de 50 [μm] de profundidad (en negro) y las secciones removidas para formar los pozos de contención (en rojo). Dimensiones en [mm].

Tabla XIV: Dimensiones lineales y áreas de los pozos colocados en la capa para microfluídica abierta. Se presentan en micrómetros para facilitar la comparación con las dimensiones mostradas en la sección de electrodos.

Pozo	Diámetro [μm]	Largo x Ancho [μm]	Área [μm^2]
1	800	-	2×10^6
2	800	-	2×10^6
3	-	5000 x 3000	15×10^6
4	-	10000 x 3000	30×10^6

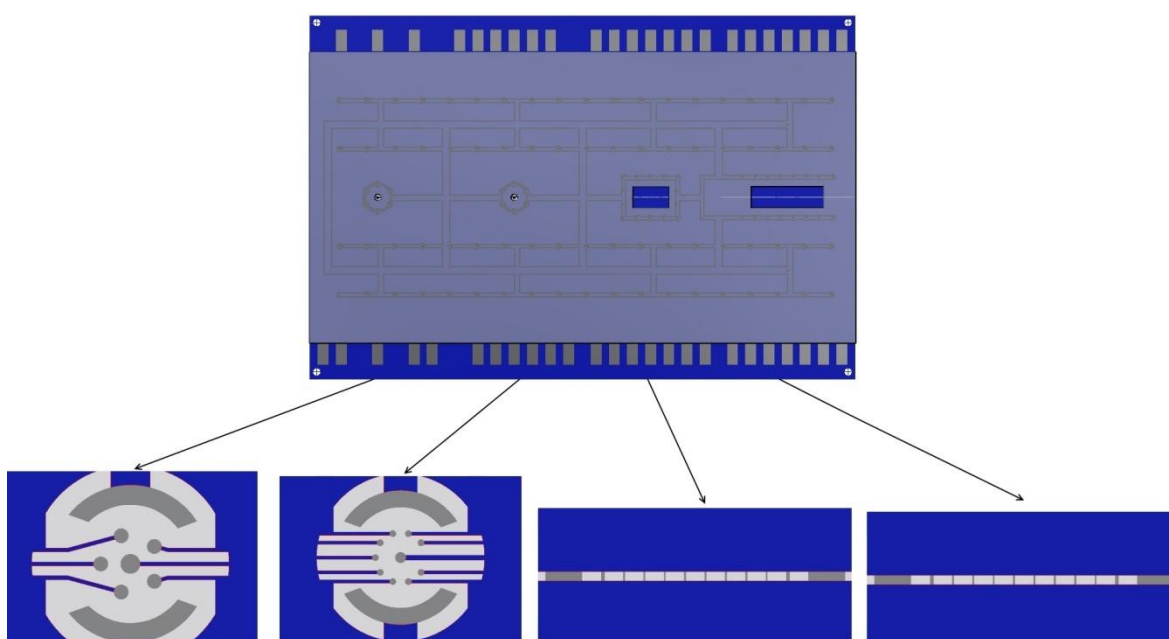


Figura 4.10. Prototipo finalizado, con la capa de microfluídica abierta (blanco transparente).

4.2 Proceso de fabricación

La fabricación de electrodos planares se realizó mediante un proceso conocido como *lift-off*, el cual se llevó a cabo en el Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología Aplicada (MEMS) de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. *Lift-off* hace referencia a una técnica usada en micro fabricación para generar estructuras en materiales que generalmente son difíciles de grabar, empleando una capa de sacrificio. A continuación se describen los pasos que se siguieron. El proceso de fabricación detallado se encuentra en el Anexo 2 donde se listan los pasos para el proceso de *lift-off*, del cual se muestra el flujo en la Figura 4.11.

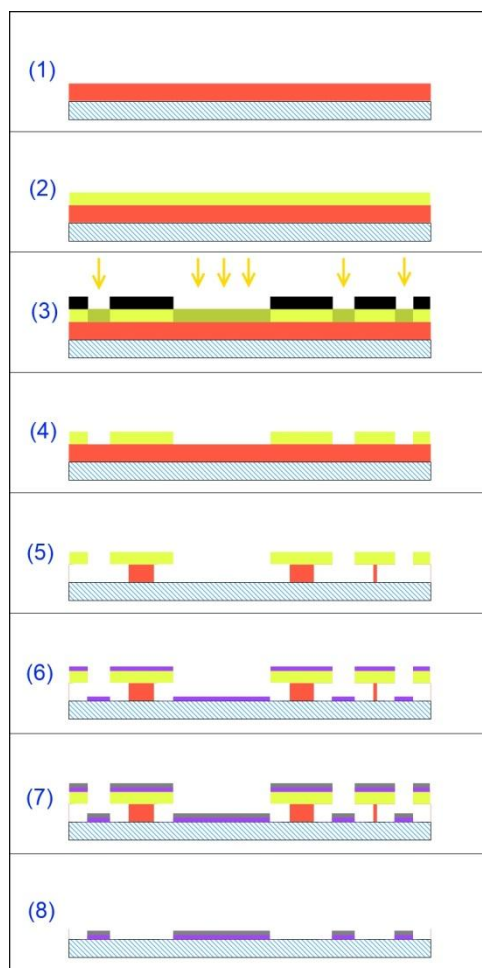


Figura 4.11. Proceso de *lift-off* empleado en la fabricación del arreglo de micro electrodos diseñado en el presente trabajo. (1) Depósito del material de sacrificio (naranja) sobre el sustrato (azul rallado). (2) Depósito de la resina fotosensible (amarillo). (3) Exposición de la resina empleando la máscara (negro) con el patrón. (4) Grabado de la resina fotosensible, se ejemplifica usando una resina positiva. (5) Grabado del material de sacrificio dejando un perfil de sub corte (*under cut*). (6) Depósito de promotor de adhesión. (7) Depósito del material objetivo. (8) Liberación de la estructura.

4.2.1 Limpieza del sustrato

Un riguroso proceso de limpieza es necesario para garantizar que el depósito de metales tuviera una buena adhesión al sustrato. En el protocolo empleado, todos los pasos fueron llevados a cabo a la presión atmosférica de ciudad de Juárez (101 [kPa]) y a una temperatura ambiente de 21 [°C]. El proceso es descrito en el Anexo 1: Limpieza de sustratos.

4.2.2 Depósito de plata y litografía del diseño de electrodos

Después de la limpieza, al sustrato se le depositaron las resinas LOR 10A de Microchem como material de sacrificio y microposit S1813 de Shipley como resina fotosensible para transferir al patrón del arreglo de micro electrodos. Acto seguido, se revelaron las resinas depositadas para dejar al descubierto parte del sustrato, lugar donde se depositaría la plata en la forma del arreglo de electrodos.

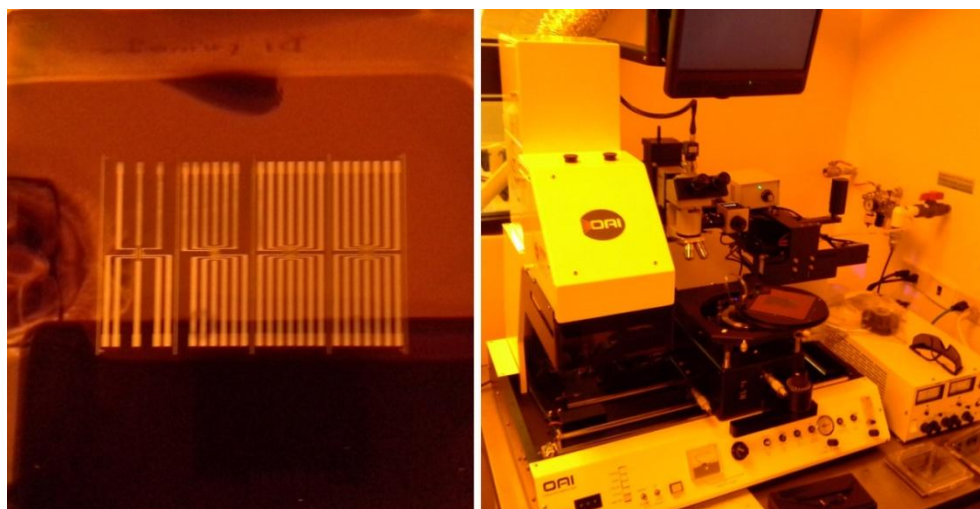


Figura 4.12. Izquierda: Máscara empleada en el proceso de fotolitografía. Derecha: Alineación y exposición de la máscara con el sustrato, empleando una alineadora OAI modelo 200.

Posteriormente, se depositaron mediante pulverización catódica (*sputtering*), una capa delgada de cromo (30 [nm]) como un agente promotor de adhesión entre el sustrato de vidrio y la plata de los electrodos y trazas conductoras, así como una capa de plata 99.99% pura del espesor diseñado en la sección 4.1.5 (140 [nm]).

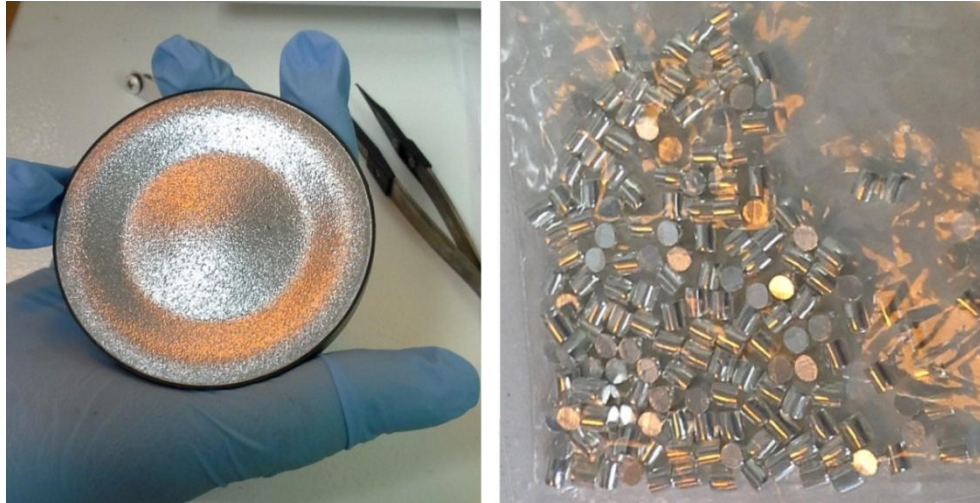


Figura 4.13. Izquierda: Blanco de Cromo después de uso. Derecha: Perdigones de Plata 99.99% pura. Ambos empleados en el proceso de pulverización catódica.

Finalmente, se realizó el paso de liberación en el proceso de *lift-off* para obtener el diseño. Se sumergió el sustrato en un baño químico para remover la resina restante, junto con todo el metal depositado sobre ella, y dejar solamente los metales depositados directamente sobre el sustrato. El chip obtenido se muestra en la Figura 4.14.

El proceso de fotolitografía y depósito de metales es descrito a profundidad en el Anexo 2.

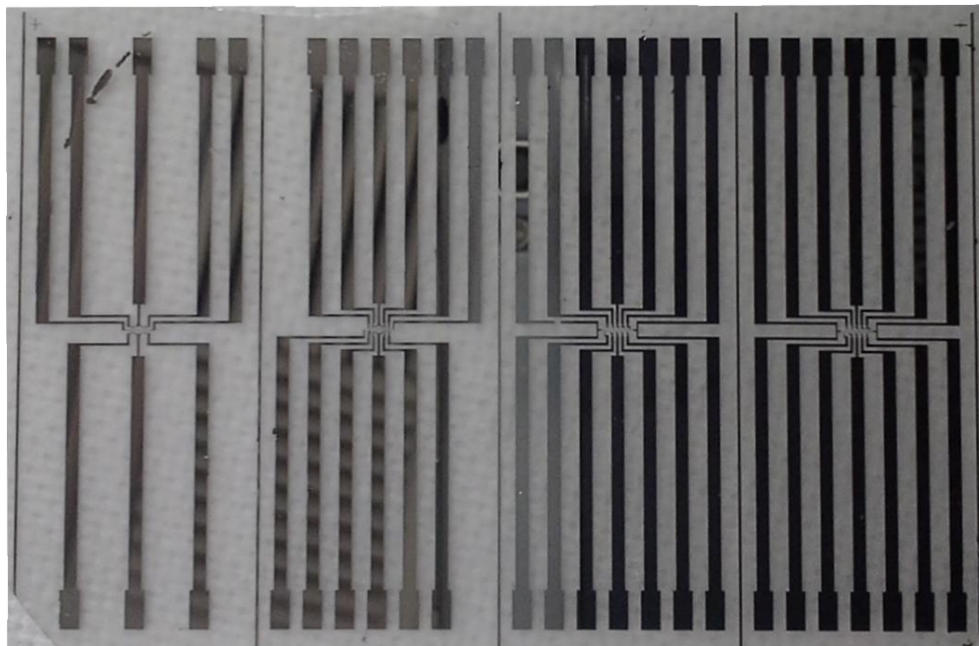


Figura 4.14. Chip obtenido después del proceso de fotolitografía y depósito de metales.

4.2.3 Capa de pasivación de trazas conductoras

Se depositó una capa delgada de 5 micrómetros de resina SU-8 como capa de pasivación eléctrica debido a su alta resistividad ($> 10 [M\Omega \text{ m}]$), buena biocompatibilidad y a que después de un calentamiento final (*hard bake*) presenta buena resistencia a la corrosión. Esta capa fue desarrollada para que cubriera las trazas conductoras que conectan a los electrodos con sus *pads* de salida, sin que obstruyera a estos elementos, para aislarlas de la solución biológica en la que se sumergen los electrodos. El método empleado para construir esta capa es descrito en el Anexo 3.

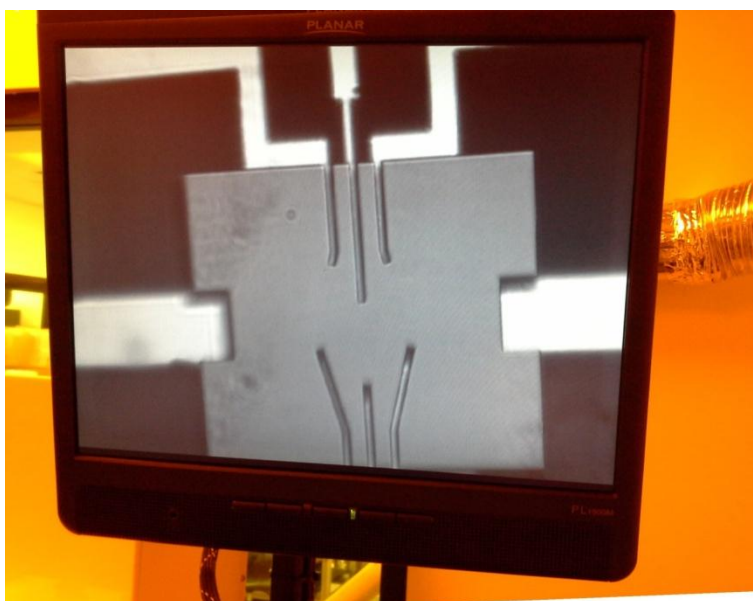


Figura 4.15. Proceso de alineación de la máscara para la capa de pasivación con el sustrato. Se puede observar la plata depositada (blanco) sobre el sustrato de vidrio (fondo negro) y la máscara para fotolitografía (gris).

4.2.4 Capa para microfluídica

Se desarrolló una capa para microfluídica abierta, con un grosor de 3 milímetros, construida en PDMS, para contener la solución biológica que mantiene viables las células sensadas. Con el objetivo de facilitar la limpieza de la cavidad que contiene a las células, esta capa de microfluídica se fijó directamente con la adhesión natural que existe entre ella y su adyacente capa de SU-8. Su proceso de fabricación se encuentra en el Anexo 4.

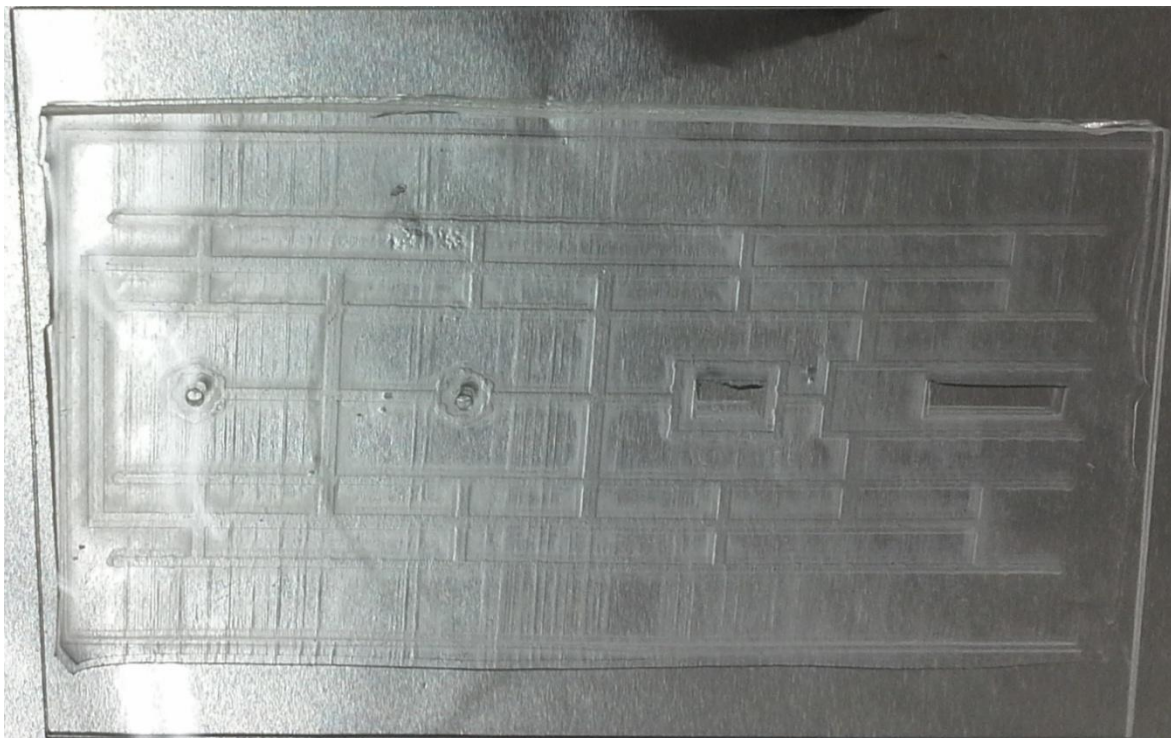


Figura 4.16. Capa de microfluídica fabricada para contener los objetos de estudio.

4.2.5 Electro platinado

Se decidió aumentar la cantidad de plata disponible por electrodo empleando la técnica de electro platinado, la cual es descrita en el Anexo 5, para crecer la capa de plata de 140 [nm] a 5 [μ m]. Este paso resultó necesario debido a que la capa depositada de plata (140 [nm]) resultaba suficiente para tener una buena conexión de los electrodos a los *pads* de interconexión pero no así para realizar el proceso de clorurado, necesario para el funcionamiento de este tipo de electrodos, además de que es inconveniente depositar capas gruesas de material por pulverización catódica porque resulta costoso y tardado.

4.2.6 Clorurado y conservación

El clorurado de la superficie de plata que funciona como electrodo fue realizado empleando una solución diluida de cloruro férrico ($FeCl_3$) al 0.1 [Mol] [49], la cual se depositó sobre los electrodos mediante pipeteo. Se le permitió reaccionar durante 120 [s] para convertir parte del volumen de plata (Ag) en cloruro de plata ($AgCl$), y se lavó empleando agua desionizada.

Inmediatamente después del clorurado, se llenaron los receptáculos de la capa para microfluídica con una solución de cloruro de sodio ($NaCl$) en concentración de 1 [Mol] y se envolvió la totalidad del prototipo en papel aluminio para conservar la capa de cloruro de plata (debido a que el cloruro de plata se degrada al exponerse a la radiación lumínica en el espectro visible).

4.3 Caracterización de la impedancia del arreglo de micro electrodos

Se empleó la técnica de EIS, desarrollada en la sección 2.8, para medir la impedancia total del circuito formado por el electrodo de estimulación, el medio de cultivo celular y el electrodo de sensado a diferentes frecuencias, empleando el arreglo experimental descrito en la Figura 4.17.

Se aplicó una señal senoidal de amplitud fija (10 [V]) entre los electrodos de sensado y los electrodos de estimulación, un par de electrodos a la vez, en un intervalo de frecuencias acorde a las que se esperaría encontrar en un experimento con células excitables cardiacas (1 - 2 [Hz]). La señal resultante fue registrada a través de un osciloscopio, cuya resistencia interna fue usada como referencia. Para identificar cada electrodo en los arreglos propuestos se proporciona una guía visual en el Anexo 10. Los valores teóricos fueron calculados empleando las ecuaciones descritas en las secciones 2.5 y 0. En la Tabla XV, Tabla XVI y Tabla XVII se muestran los valores experimentales y teóricos, para cada uno de los diseños.

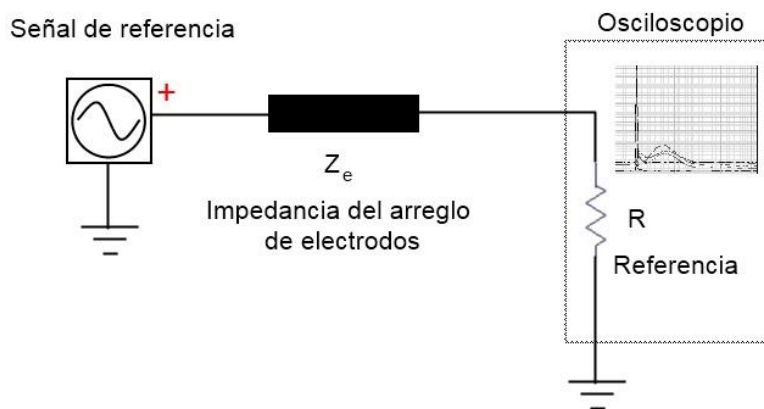


Figura 4.17. Esquema de conexión para la prueba de EIS sobre el arreglo de electrodos.

Tabla XV: Impedancias teóricas y medidas para los electrodos del diseño 1.

Electrodo	Impedancia Medida [kΩ]	Impedancia Teórica [kΩ]
E1	797.9 -333.4i	458.5 -4.36i
E2	689.8 -467.9i	458.5 -4.36i
E3	616.5 -705.7i	458.5 -4.36i
E4	572.9 -367.9i	458.5 -4.36i
E5	799.5 -492.3i	458.5 -4.36i

Tabla XVI: Impedancias teóricas y medidas para los electrodos del diseño 2.

Electrodo	Impedancia Medida [kΩ]	Impedancia Teórica [kΩ]
E1	2828.0 -99.80i	1428.0 -13.6i
E2	2520.0 -110.60i	1428.0 -13.6i
E3	2716.0 -92.81i	1428.0 -13.6i
E4	2011.0 -134.65i	1428.0 -13.6i
E5	2189.0 -12.53i	1428.0 -13.6i
E6	2623.0 -99.48i	1428.0 -13.6i
E7	2018.0 -116.05i	1428.0 -13.6i
E8	2445.0 -45.64i	1428.0 -13.6i
E9	2208.0 -113.61i	1428.0 -13.6i

Tabla XVII: Impedancias teóricas y medidas para los electrodos del diseño 3.

Electrodo	Impedancia Medida [kΩ]	Impedancia Teórica [kΩ]
E1	1242.0 -106.9i	1016.0 -9.4i
E2	1596.0 -80.8i	1054.0 -9.4i
E3	1812.0 -98.7i	1091.0 -9.4i
E4	1593.0 -86.9i	1129.0 -9.4i
E5	1467.0 -47.8i	1166.0 -9.4i
E6	1562.0 -15.1i	1204.0 -9.4i
E7	1619.0 -69.4i	1241.0 -9.4i
E8	1631.0 -44.9i	1278.0 -9.4i

Las diferencias entre las impedancias medidas y las calculadas pueden deberse a varios factores como son: porosidades en la superficie de la plata depositada, migración de iones de cromo del adherente utilizado a la capa superficial de plata y pérdida de iones por parte del electrolito usado, entre otras.

5 Experimentación y análisis de resultados

Como objeto de estudio se seleccionaron las células excitables de especímenes de pez cebra (*zebra fish*) y de rana toro (*american bullfrog*) especialmente criados para realizar estudios celulares por el extenso estudio de los atributos de estas especies, parámetros bioeléctricos bien documentados [50] y su fácil obtención para la realización de experimentos celulares. De ellos se extrajo el ápice del ventrículo y el nervio ciático, respectivamente, como ejemplo de células excitables. La preparación de las muestras a medir, así como los equipos empleados durante el proceso de registro fueron provistos por el Taller de Biofísica y Sistemas Excitables Extendidos de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

5.1 Arreglo experimental

Se montó un arreglo experimental para realizar pruebas de estimulación y sensado celular. El chip que contenía los diferentes diseños de arreglo de micro electrodos planares fue colocado sobre la platina de un microscopio estereoscópico, empleado en la alineación del chip, el depósito de las muestras celulares y el monitoreo óptico del objeto de estudio (fragmento de tejido cardiaco y de tejido nervioso). Acto seguido se acoplaron a los electrodos de sensado una serie de amplificadores diferenciales para electrofisiología Grass P511, cinco en total, empleando una serie de peines conectores. De igual manera se acopló un estimulador celular bipolar Pulsar 6BP a un electrodo de estimulación, elegido dependiendo del diseño a probar. En la Figura 5.1, Figura 5.2 y Figura 5.3 se muestra este arreglo experimental.

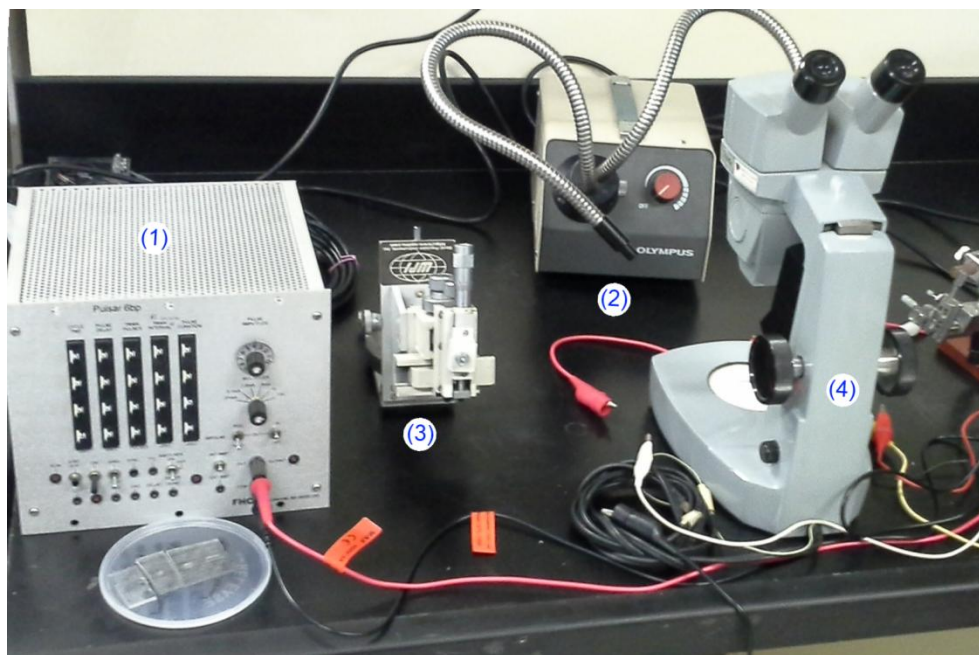


Figura 5.1. Sistema de estimulación celular (1) e iluminación del sustrato (2). Micro manipulador (3) y microscopio estereoscópico (4).

La salida de los amplificadores fue conectada a un sistema de adquisición de datos NI USB-6218 (National Instruments) que contiene un convertidor analógico-digital de 10 bits de resolución. La adquisición se realizó con un muestreo continuo a una frecuencia de 2 [kHz], intervalo de conversión analógica a digital de ± 10 [V] con una resolución de 16 bits y 10000 muestras por lectura. Los datos fueron guardados empleando el software Signal Express (National Instruments).

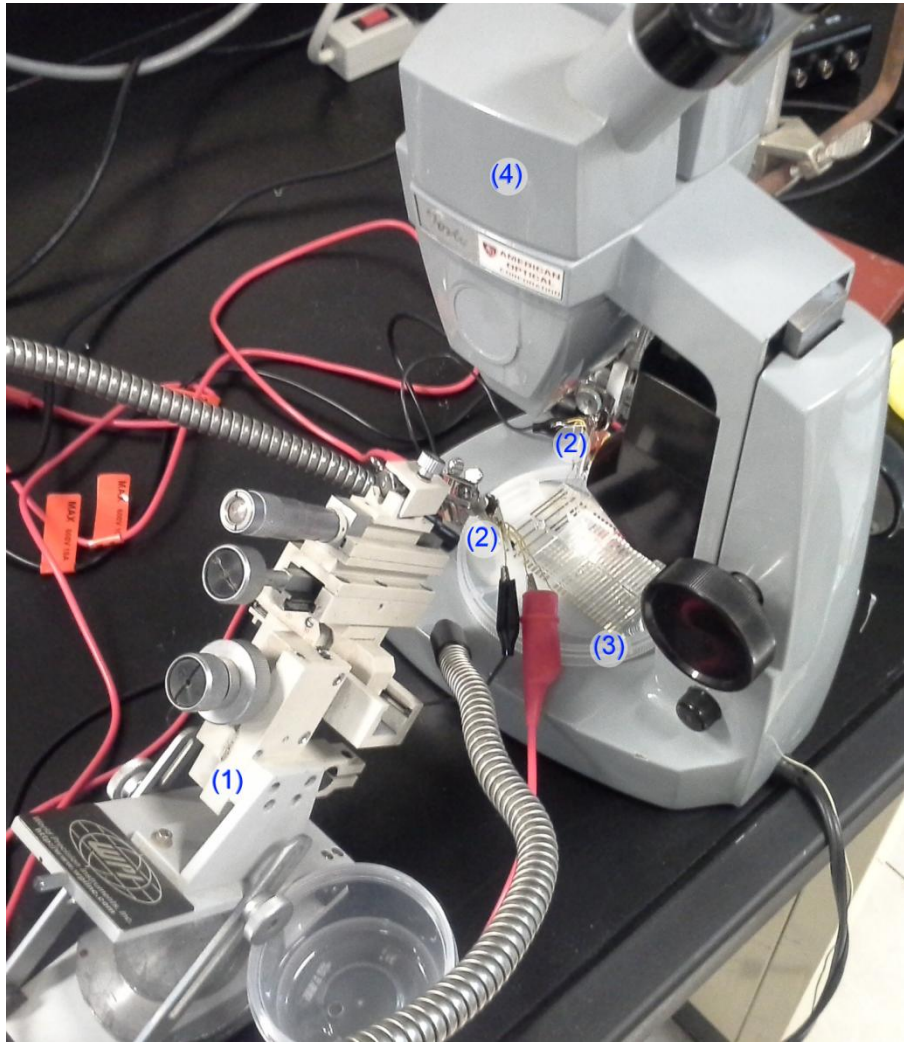


Figura 5.2. Micro manipuladores (1) usados para sostener los peines (2) empleados para conectar los sistemas electrónicos de estimulación y sensado al arreglo de micro electrodos (3). El arreglo fue armado en la platina de un microscopio estereoscópico (4) para poder depositar las células sobre el arreglo deseado.

Además, se empleó un osciloscopio Tektronics TDS 2012C para monitorear la señal de estimulación en uno de sus canales y alguna de las señales de salida en el otro canal, esto para corroborar que las señales mostradas en el software de adquisición correspondieran a las mostradas en el osciloscopio.

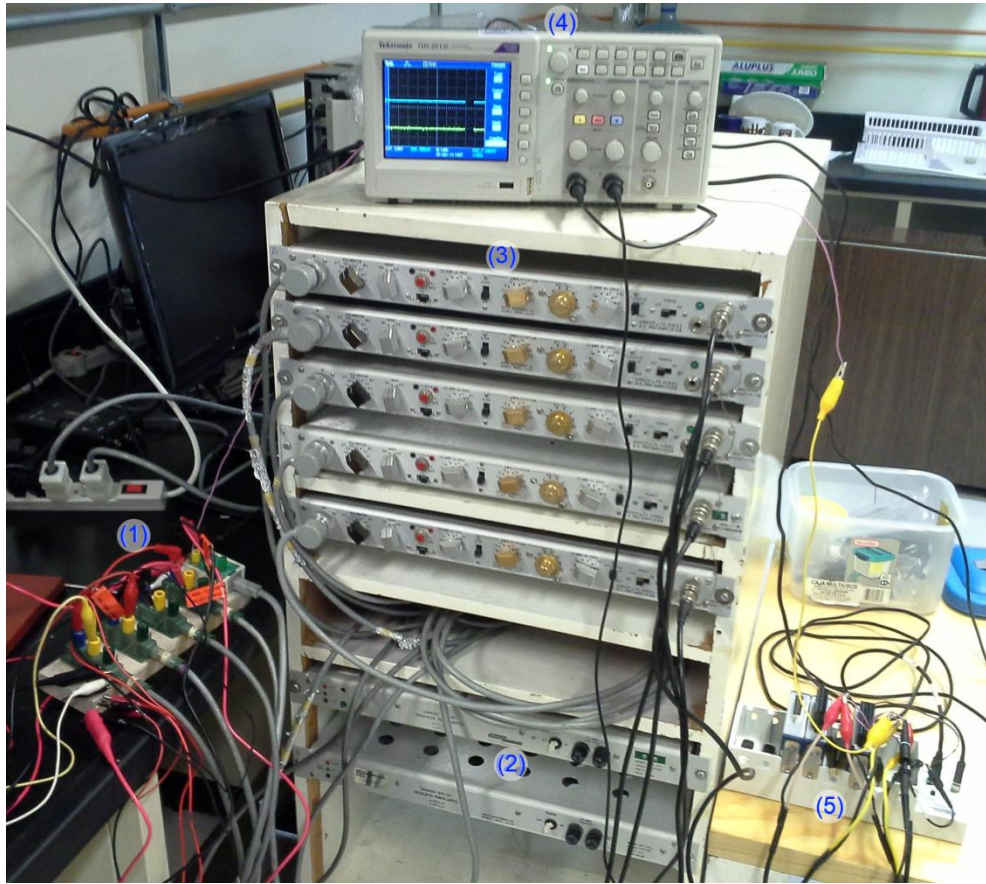


Figura 5.3. Tablero de conexiones (1) para cada electrodo de sensado, conectados al conjunto de amplificadores diferenciales (3). También se muestran las fuentes de poder (2) de los amplificadores, el osciloscopio (4) usado para monitorear las señales de interés y el sistema de adquisición de datos (5).

5.2 Metodología experimental

Como primera prueba del prototipo micrométrico de estimulación y sensado, se buscó obtener la respuesta de los diferentes diseños a un estímulo sin la presencia de células, para obtener señales que sirvieran de referencia en la posterior repetición del experimento ya en presencia de células excitables. Se muestra un diagrama simplificado de las conexiones usadas para este experimento en la Figura 5.4.

Primero, los arreglos fueron sumergidos en el medio biológico descrito en la sección 2.4 y acto seguido fueron sometidos a las señales de estimulación que se usarían en el experimento con presencia celular, para obtener así la respuesta al estímulo, sin presencia celular, de los diseños construidos.

Habiendo realizado la prueba anterior, los tejidos fueron preparados anestesiando al espécimen a usar (pez cebra o rana toro) y diseccionándolo para obtener el tejido que se probaría en los electrodos (corazón o nervio). Los tejidos fueron después colocados en el arreglo de electrodos y sumergidos en el medio biológico que los sustentaría durante las pruebas. Como ejemplo, en la Figura 5.5 se muestra una fotografía de una porción de tejido de corazón de rana toro sobre los electrodos correspondientes al diseño 1.

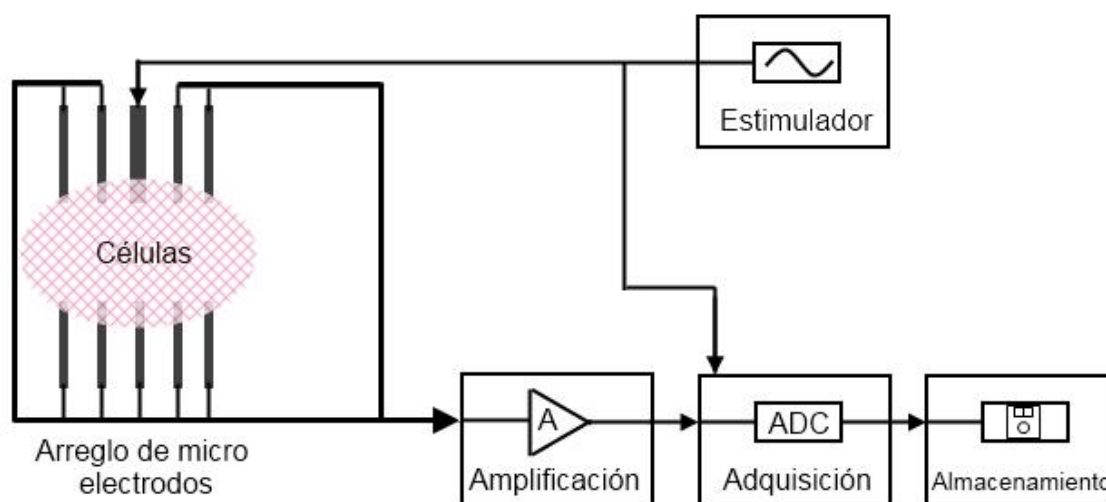


Figura 5.4. Diagrama de conexiones simplificado del experimento realizado.

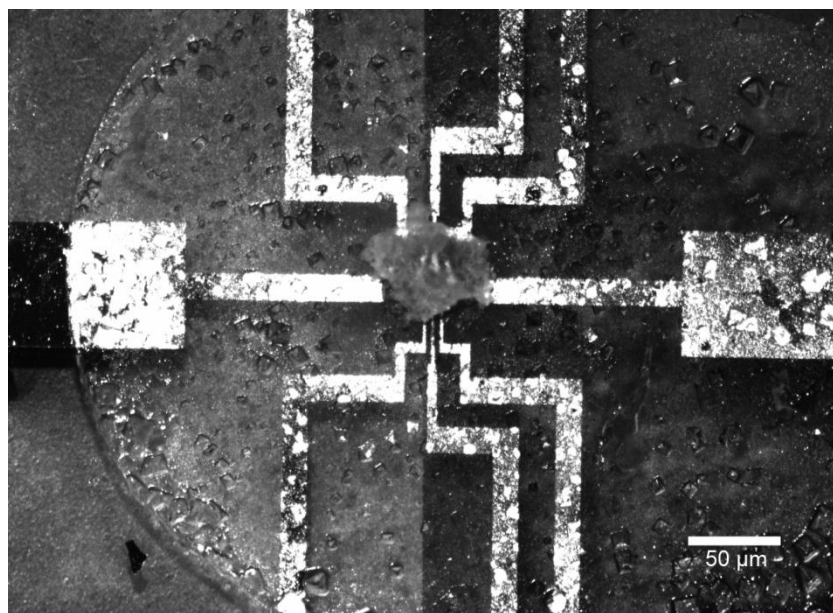


Figura 5.5. Ápice del ventrículo de un corazón de rana toro sobre el arreglo de electrodos correspondiente al diseño 1.

Una vez realizadas las conexiones del arreglo experimental, se probaron los diseños 1, 2 y 3 en diferentes condiciones de estimulación y empleando los tipos de células mostrados en la Tabla XVIII para cada diseño. Para la estimulación se usó una serie de impulsos de voltaje con periodo, duración de impulso, amplitud y polaridad, modificados según los requerimientos del experimento.

Tabla XVIII: Tipos de células probadas en cada arreglo de electrodos.

Tipo de célula	Diseño 1	Diseño 2	Diseño 3
Corazón de rana toro	Probada	Probada	
Nervio ciático de rana toro			Probada
Corazón de pez cebra	Probada		Probada

En la interpretación de los resultados se usan nuevamente los identificadores de los electrodos que contiene cada arreglo, los cuales se encuentran en el Anexo 10.

5.3 Pruebas empleando el Diseño 1

5.3.1 D1: Estimulación sin presencia celular

Durante esta prueba se sometió el arreglo de electrodos correspondiente al diseño 1 a una serie de impulsos positivos, con un periodo de 1 [s], duración de 1 [ms] y amplitud de 10 [V], para observar su comportamiento en ausencia de células, pero sumergido en el medio biológico que las sustentaría. Los amplificadores empleados para el experimento fueron programados para tener un factor de amplificación de 50.

Cabe recordar que el medio biológico empleado es una sustancia conductora, lo que permite el paso de la corriente desde el electrodo de estimulación a los de sensado, por lo que es importante conocer la aportación de la señal de estimulación a la señal total que se medirá con el arreglo en presencia de células.

De la Figura 5.6 se observa que los electrodos de sensado percibieron la señal de estimulación, la cual fue atenuada por la impedancia de la interfaz electrodo – electrólito y la impedancia del electrólito (medio biológico).

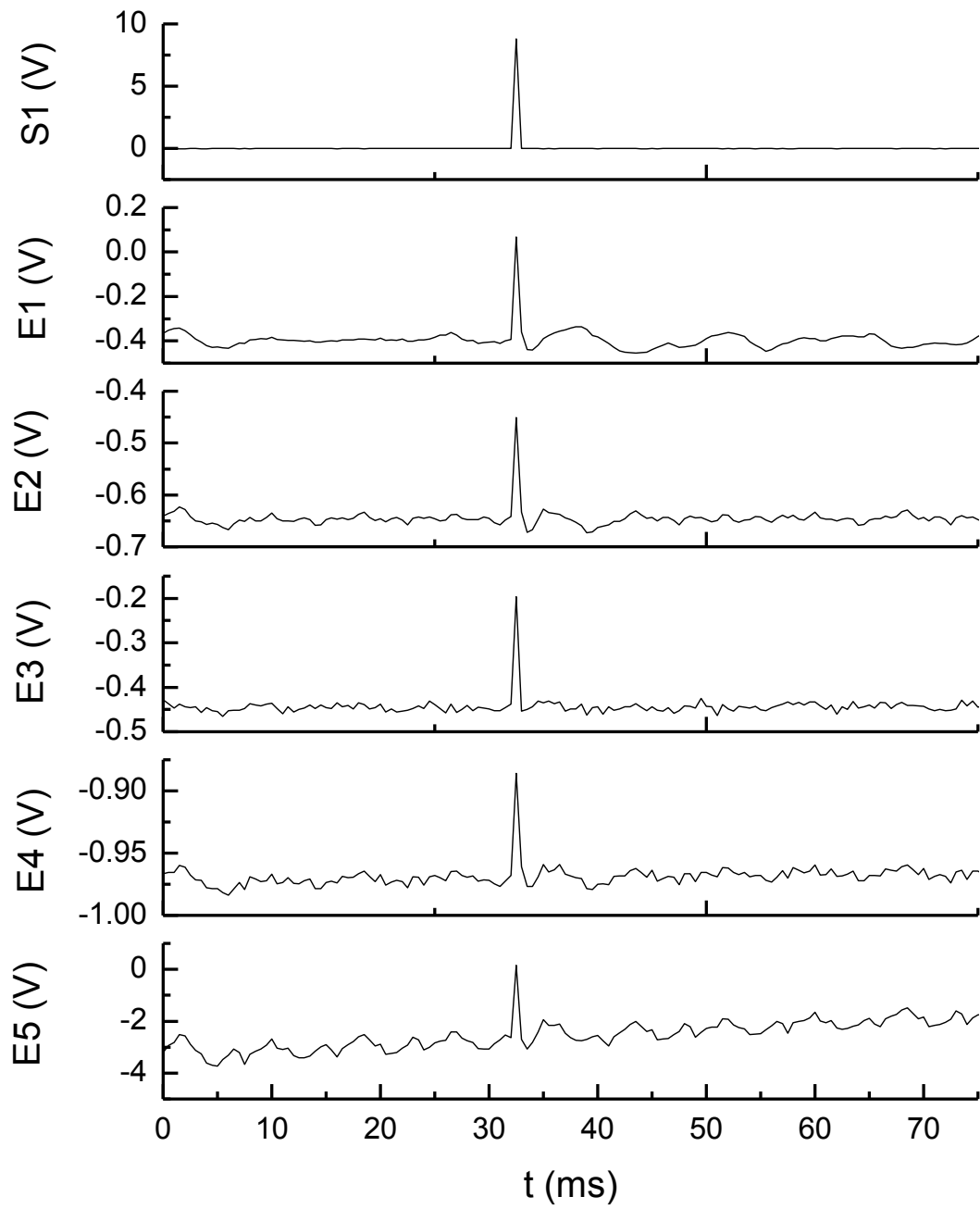


Figura 5.6. D1: Estimulación positiva del arreglo correspondiente al diseño 1 sin presencia de células. Un electrodo de estimulación (S1) y cinco electrodos de sensado (E1 – E5).

5.3.2 D1: Registro de nervio ciático de rana toro con estimulación

En esta prueba se utilizó una estimulación alternante entre impulsos positivos y negativos con un periodo de 1 [s], duración de 1 [ms] y amplitud de 10 [V] para estimular un trozo de nervio ciático de rana toro. La adquisición de datos se realizó con un factor de amplificación de 100 debido a que se observó una mejora en la apreciación de los datos a esta escala.

El primer conjunto de pruebas se realizó utilizando un electrodo de sensado monitoreado por el osciloscopio Tektronix para observar los efectos de la estimulación en el nervio como prueba de concepto, el resultado se observa en la Figura 5.7.

Posterior a esto, se agregaron las conexiones para utilizar en su totalidad los electrodos de sensado del diseño 1 y se obtuvieron los patrones de estimulación positiva y negativa que se muestran en la Figura 5.8 y Figura 5.9 respectivamente.

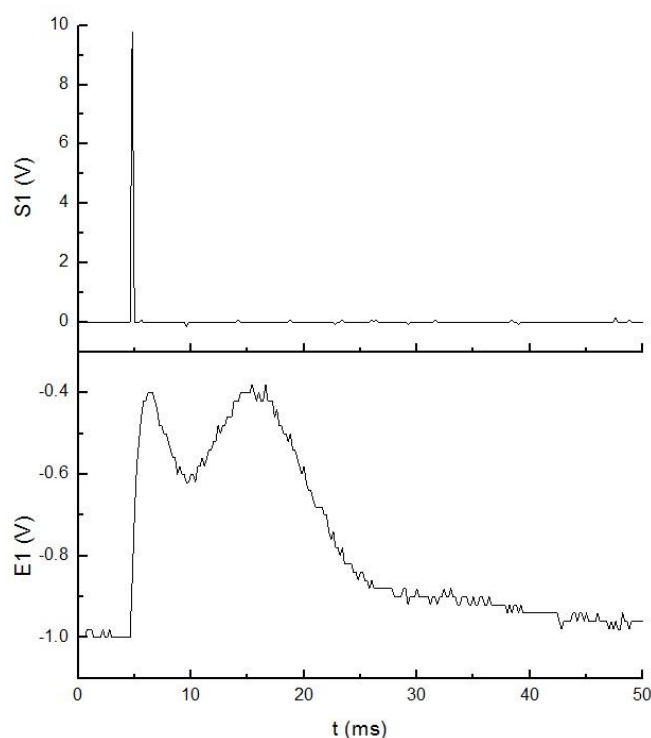


Figura 5.7. D1: Registro de nervio ciático de rana con estimulación positiva (S1). Primer registro con un electrodo de estimulación (S1) y un electrodo de sensado (E1).

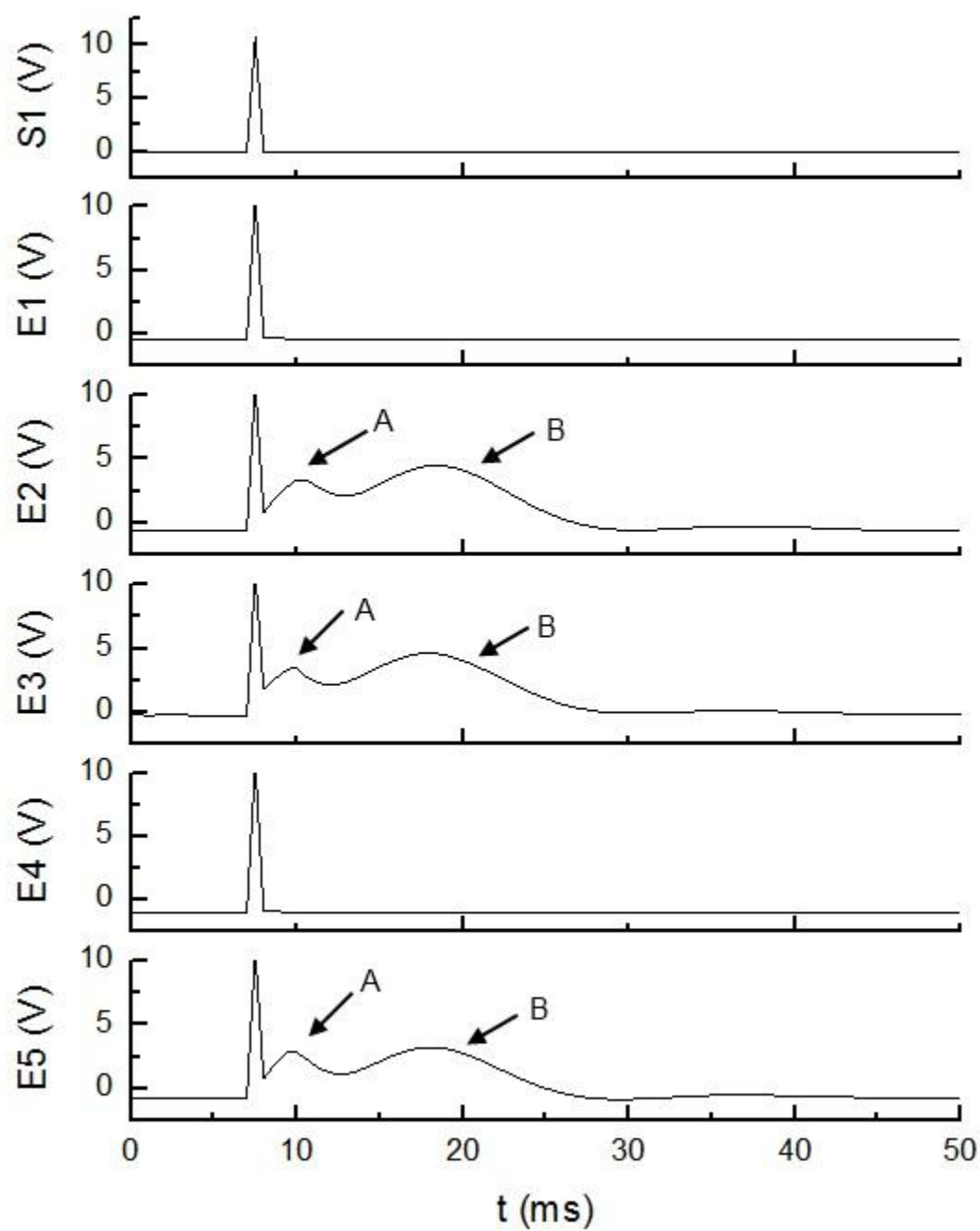


Figura 5.8. . D1: Registro de nervio ciático de rana con estimulación positiva (S1). Un electrodo de estimulación (S1) y cinco electrodos de sensado (E1 – E5). Se aprecian dos subpoblaciones de células en A y B.

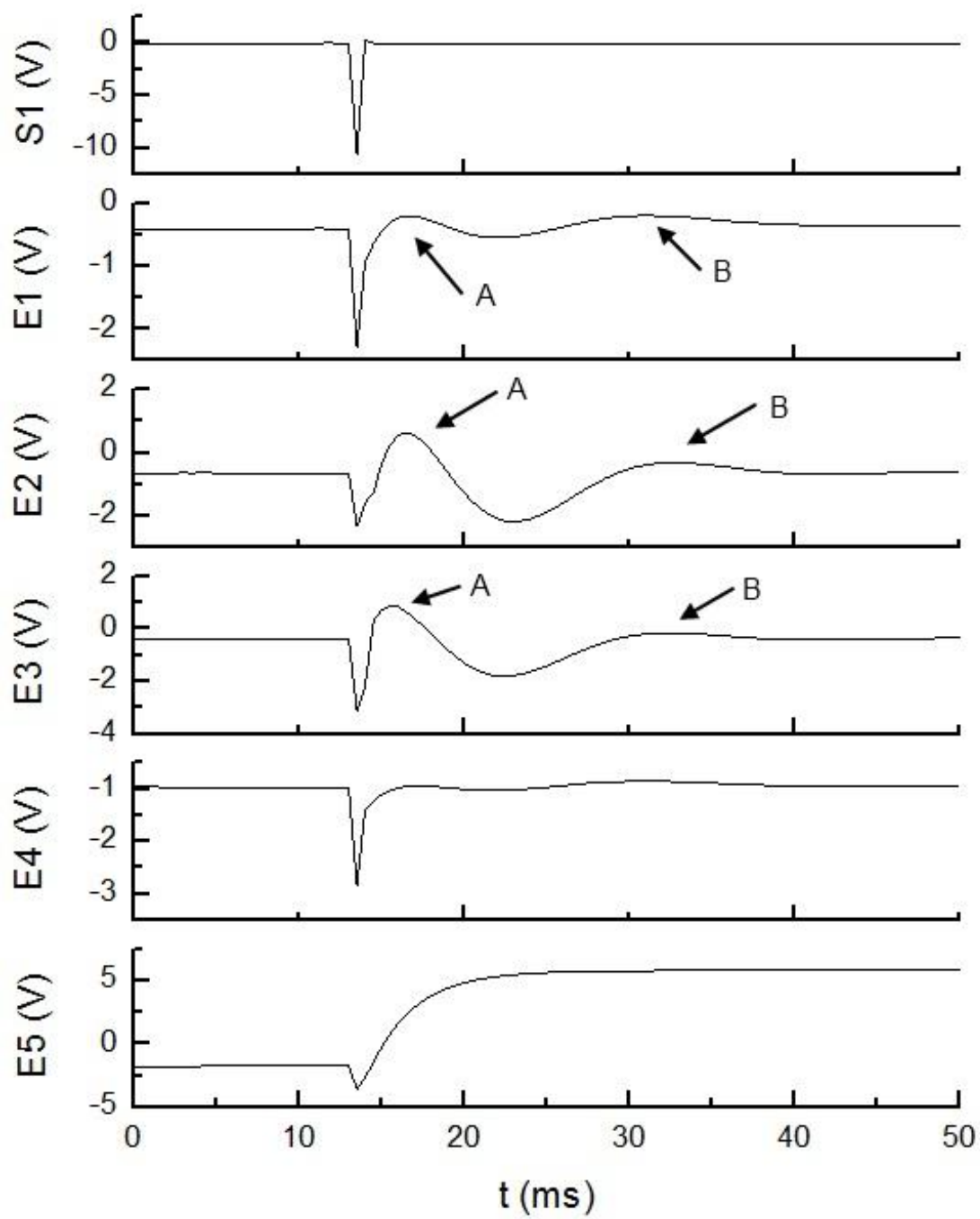


Figura 5.9. D1: Registro de nervio ciático de rana con estimulación negativa (S1). Un electrodo de estimulación (S1) y cinco electrodos de sensado (E1 – E5). Se aprecia una subpoblación de células en A.

Los perfiles de las señales sensadas de los grupos celulares estimulados, denominados registros poblacionales (debido a que se estimula una población de células y no a una sola de ellas), presentan un periodo de 20 [ms] y una amplitud pico a pico de 1.45 [V], lo cual daría lugar a un potencial real de 14.5 [mV]. Estos datos fueron obtenidos analizando las graficas mediante las herramientas proporcionadas en el software de adquisición (*Signal Express*). Además, se observa que los registros poblacionales se desarrollan con la misma forma y polaridad (la señal celular comienza con una cresta seguida por un valle y finaliza con otra cresta en este caso), no importando qué tipo de estimulación se emplee. Esto se debe a que las células al ser estimuladas generan un potencial eléctrico con la misma polaridad, debido a la operación de las bombas sodio – potasio y los canales iónicos, no importando el tipo de estímulo que las excite. Note que se observa una latencia, definida como el lapso entre el estímulo y la excitación celular, menor con polaridad de estimulación negativa (1 [ms] para la subpoblación "A" y 18 [ms] para la subpoblación "B") que con polaridad de estimulación positiva (2 [ms] para la subpoblación "A" y 10.5 [ms] para la subpoblación "B").

5.3.3 D1: Registro de ápice de ventrículo de rana toro con estimulación

Para estimular el ápice ventricular de un corazón de rana toro, se utilizó una estimulación alternante entre impulsos positivos y negativos con un periodo de 1 [s], duración de 1 [ms] y amplitud de 10 [V]. El factor de amplificación durante esta prueba fue de 100.

En la Figura 5.10 y Figura 5.11 se muestra los efectos de estimulación positiva y negativa de este tipo de células excitables y de su registro poblacional se obtuvo un periodo de actividad celular de 16 [ms] y una amplitud pico a pico que oscilaba entre 1.8 y 3 [V], 18 y 30 [mV] reales. Como en el caso anterior, se puede observar que los registros poblacionales se desarrollan con la misma forma y polaridad, no importando qué tipo de estimulación se use. Las latencias observadas para la subpoblación "A" fueron de 8.5 [ms] para estimulación positiva y 9.5 [ms] para estimulación negativa.

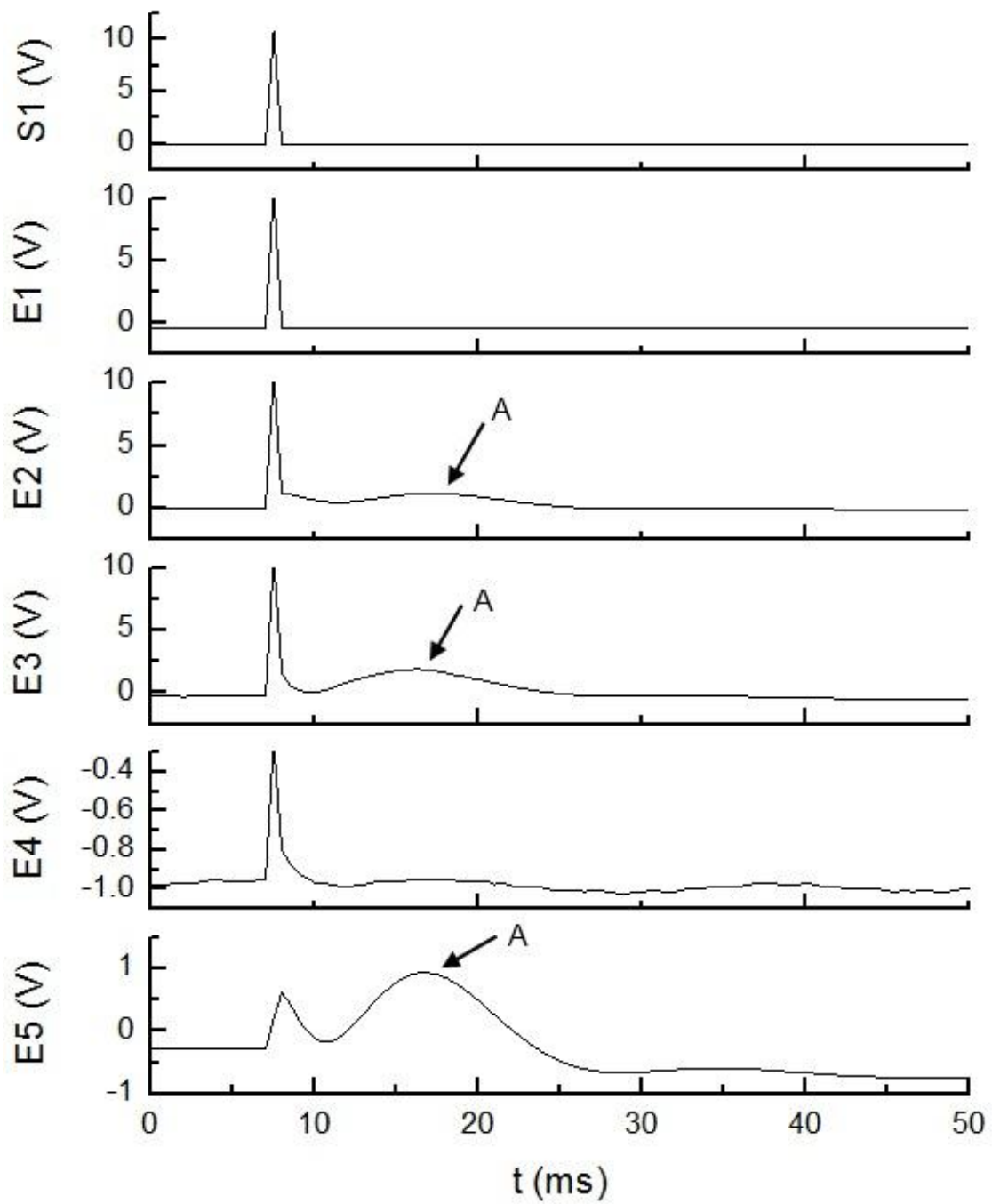


Figura 5.10. D1: Ápice de ventrículo de rana con estimulación positiva (S1). Un electrodo de estimulación (S1) y cinco electrodos de sentido (E1 – E5). Se aprecia una subpoblación de células en A.

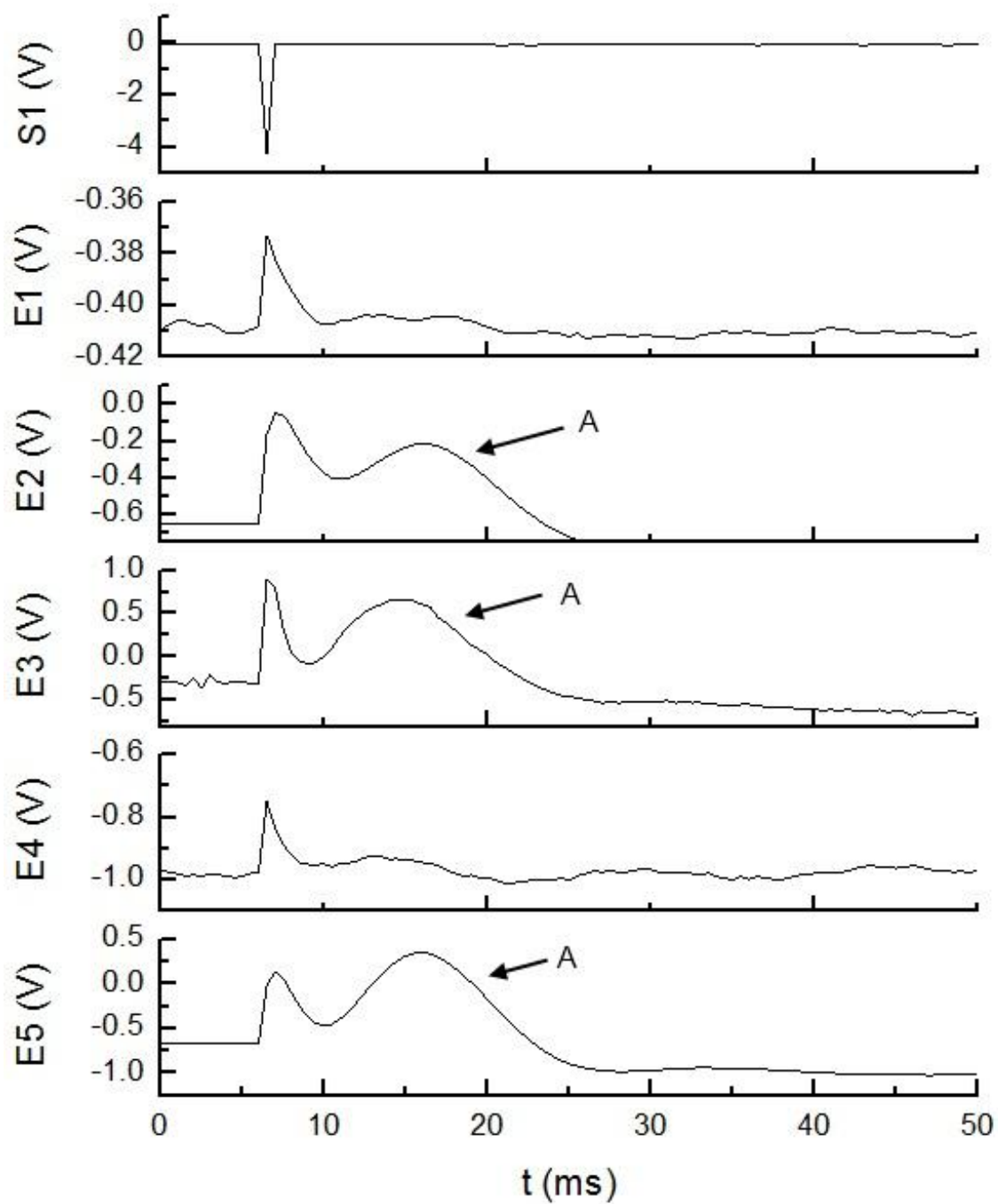


Figura 5.11. D1: Ápice de ventrículo de rana con estimulación negativa (S1). Un electrodo de estimulación (S1) y cinco electrodos de sensado (E1 – E5). Se aprecia una subpoblación de células en A.

5.3.4 D1: Corazón de pez cebra sin estimulación

El potencial eléctrico espontáneo generado por un corazón de pez cebra fue monitoreado durante esta prueba. Para este fin se empleó el electrodo S1 conectado a un amplificador con factor de amplificación de 100, el resultado se observa en la Figura 5.12.

Se entiende como potencial eléctrico espontáneo al potencial que genera el músculo cardiaco al excitarse a sí mismo (propiedad biogénica) a una frecuencia natural, la cual es afectada por el estado de salud del tejido y sus condiciones ambientales principalmente. La frecuencia natural de auto excitación en el corazón de pez cebra oscila entre 1 y 2 [Hz] [50].

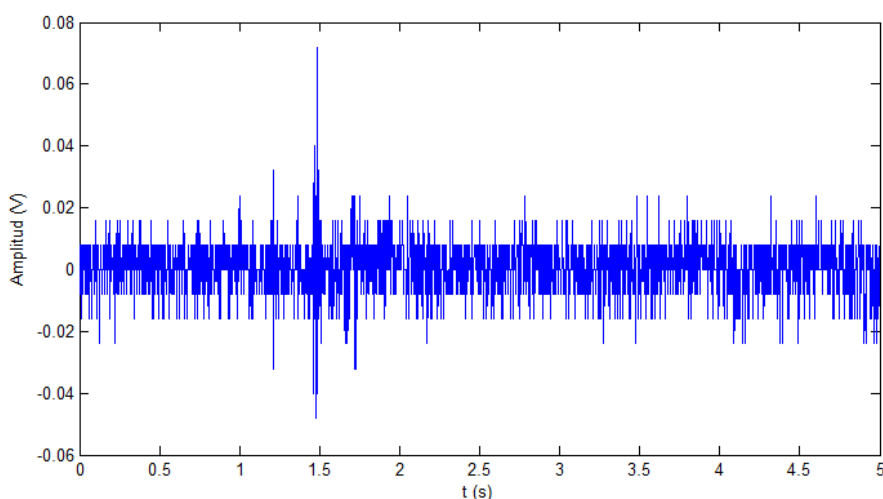


Figura 5.12. D1: Corazón de pez cebra sin estimulación. Para esta prueba se verificó ópticamente a través de un microscopio que las células cardiacas siguieran latiendo mientras se registraba con el electrodo S1.

Se procedió a obtener el espectro de Fourier de la señal mostrada en la Figura 5.12 y se obtuvo el espectrograma de la Figura 5.13. Se aprecia que existe una espiga localizada en una frecuencia a 1.099 [Hz], lo que concuerda con lo que se esperaría encontrar al medir la frecuencia cardiaca del pez cebra (1-2 [Hz]).

De esta prueba se concluye que es necesario encontrar alternativas para atenuar la cantidad de ruido introducido en la medición, pero a su vez es posible obtener datos relevantes de una señal ruidosa haciendo un análisis posterior de la señal. Así se valida el que este tipo de electrodos sean utilizados para sensar señales pequeñas como la auto estimulación cardiaca de un corazón de pez cebra.

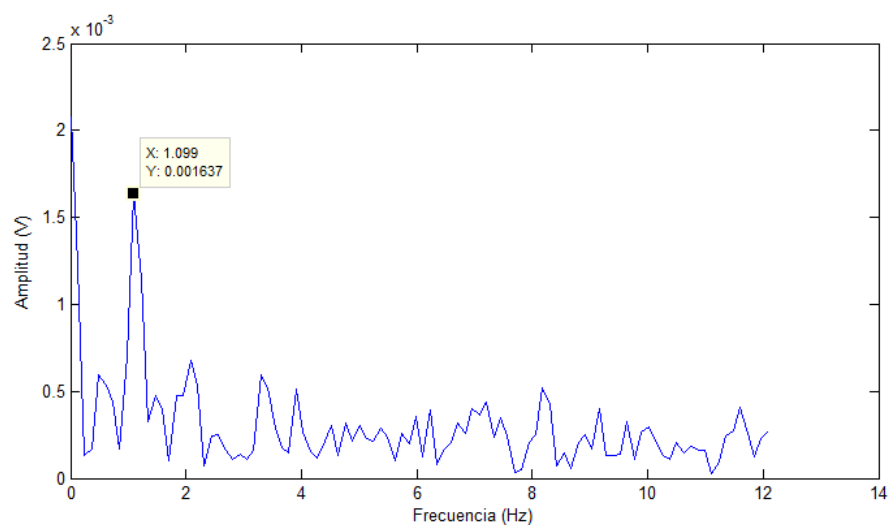


Figura 5.13. Espectrograma del registro poblacional obtenido de un corazón de pez cebra sin estar presente una señal de estimulación.

5.4 Pruebas empleando el diseño 2

5.4.1 D2: Estimulación sin presencia celular

Para esta prueba se sometió el arreglo de electrodos a una serie de impulsos positivos para observar su comportamiento en ausencia de células, pero sumergido en el medio biológico que las sustentaría. Los amplificadores fueron programados para tener un factor de amplificación de 50 y el resultado se aprecia en la Figura 5.14. Se observa que los electrodos de sensado percibieron la señal de estimulación y que su amplitud fue nuevamente atenuada por la impedancia propia del medio biológico y de la interfaz electrodo - electrolito.

Debido a que se contó con sólo cinco amplificadores durante las pruebas, se decidió emplear sólo cinco de los nueve electrodos de sensado siendo estos los electrodos E2, E4, E5, E7 y E9. Para la estimulación se utilizó el electrodo S1.

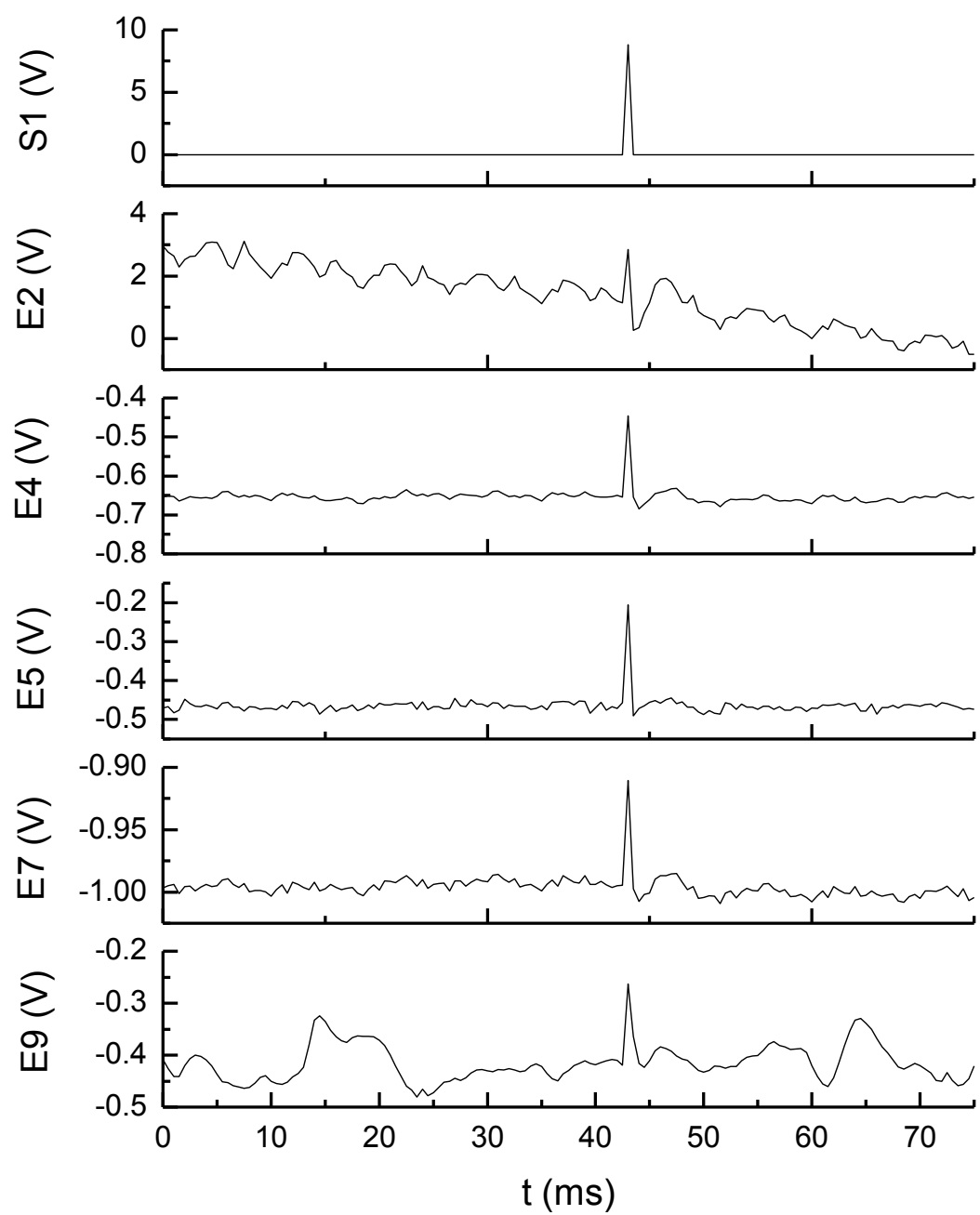


Figura 5.14. D2: Estimulación positiva (S1) del arreglo correspondiente al diseño 2 sin presencia de células. Un electrodo de estimulación (S1) y cinco electrodos de sensado (E2, E4, E5, E7, E9).

5.4.2 D2: Registro de ápice de ventrículo de rana toro

Para esta prueba se utilizó una estimulación alternante entre impulsos positivos y negativos con un periodo de 1 [s], duración de 1 [ms] y amplitud de 10 [V] para estimular el ápice del ventrículo de un corazón de rana toro.

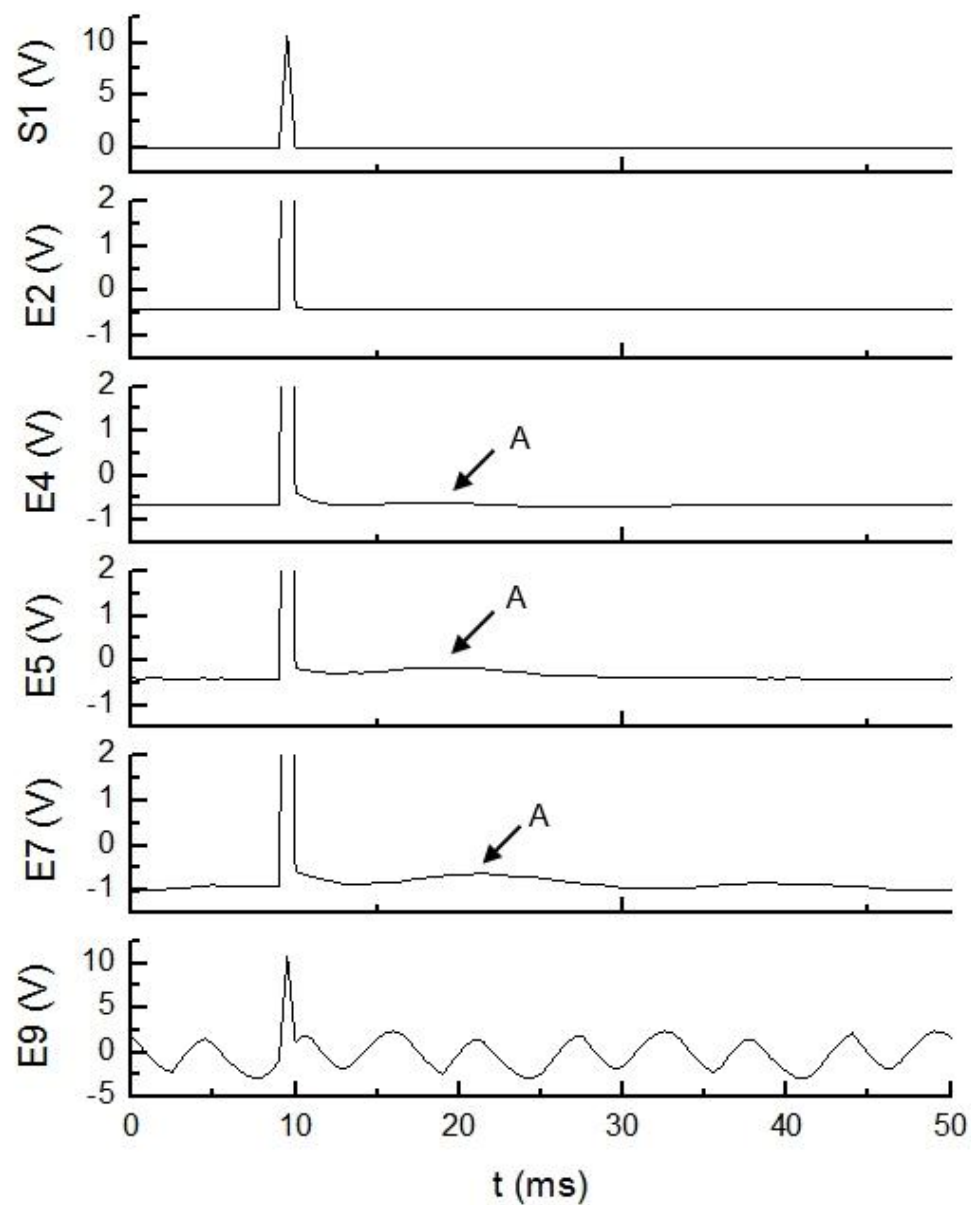


Figura 5.15. D2: Ápice de ventrículo de rana con estimulación positiva (S1). Un electrodo de estimulación (S1) y cinco electrodos de sensado (E2, E4, E5, E7 y E9). Se aprecia una subpoblación de células en A.

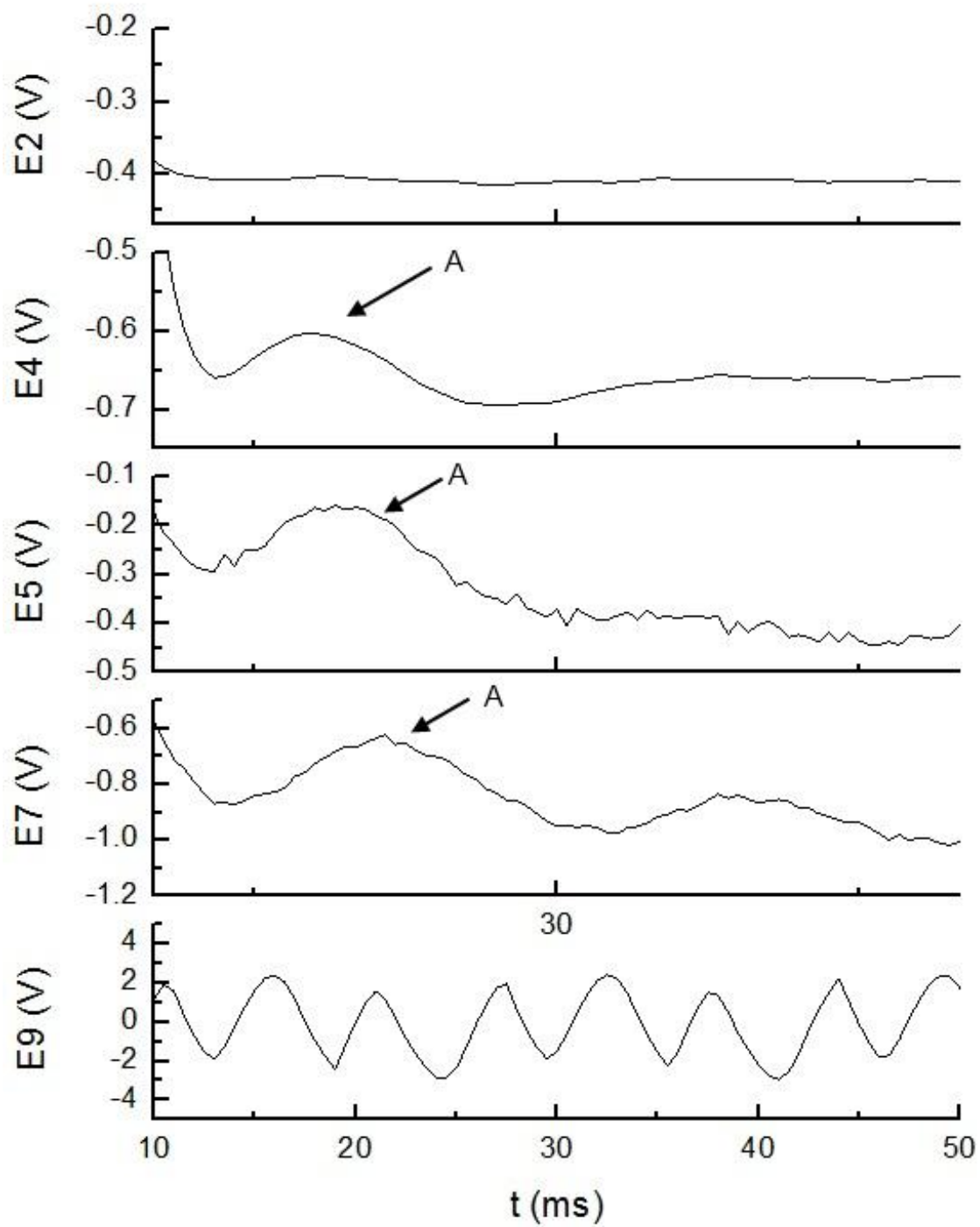


Figura 5.16. D2: Acercamiento de las señales mostradas en la Figura 5.15 omitiendo el impulso de la señal de estimulación y sus artefactos en las señales sensadas. Se aprecia una subpoblación de células en A.

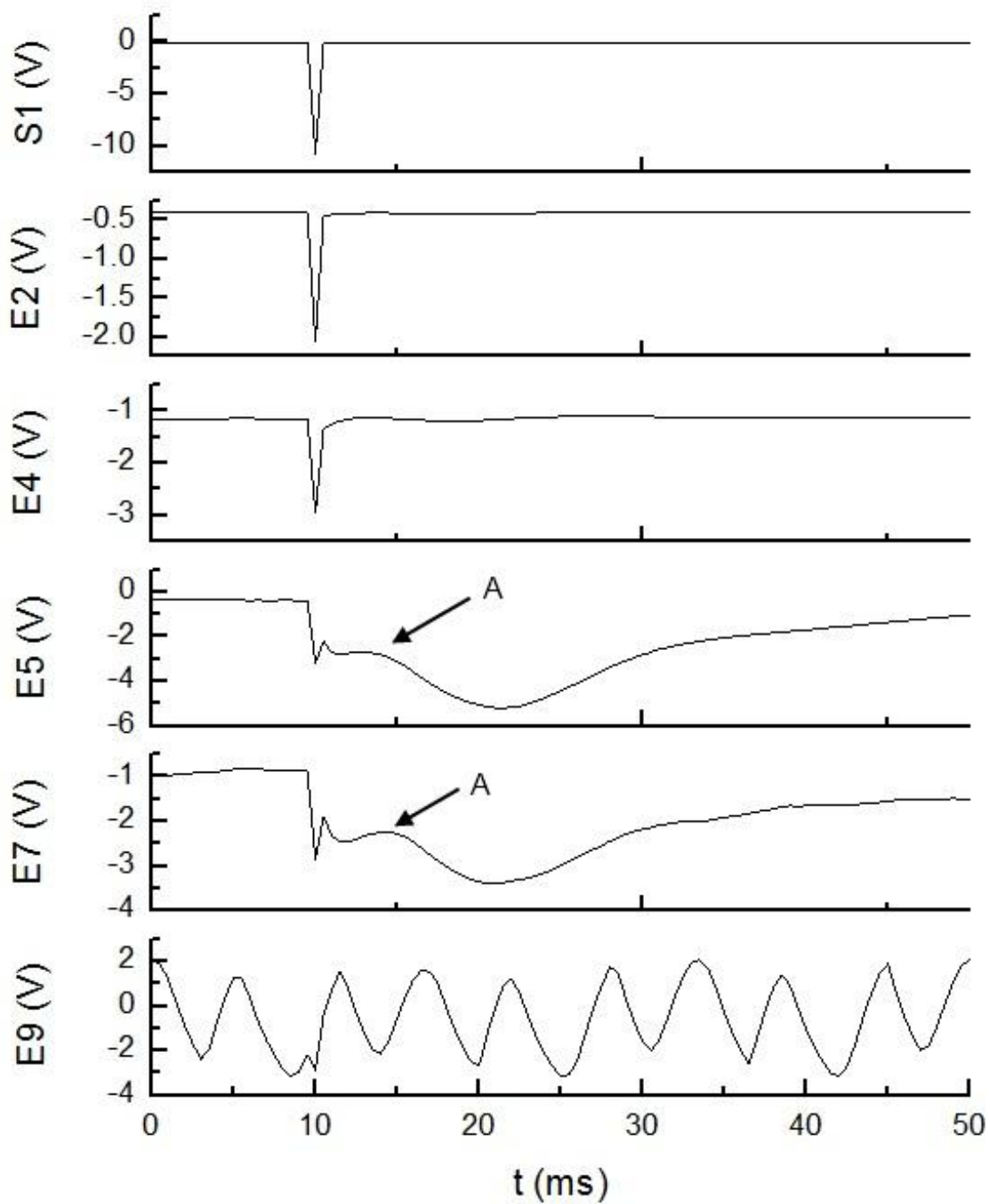


Figura 5.17. D2: Ápice de ventrículo de rana con estimulación negativa (S1). Un electrodo de estimulación (S1) y cinco electrodos de sensado (E2, E4, E5, E7 y E9). Se aprecia una subpoblación de células en A.

Los registros poblacionales obtenidos, de los cuales se muestran algunos en la Figura 5.15 y Figura 5.17, fueron analizados y se obtuvo que presentaron un periodo de actividad de 38 [ms] y una amplitud pico a pico promedio de 450 [mV] para estimulación positiva y un promedio de 2 [V] para estimulación negativa, lo que representa (debido a la amplificación por un factor de 100) un voltaje real sensado de 4.5 [mV] y 20 [mV] respectivamente. Las latencias observadas para la subpoblación "A" fueron de 11.5 [ms] para estimulación positiva y de 4 [ms] para estimulación negativa.

El potencial sensado durante la prueba con estimulación fue tan pequeño, comparado con su señal de estimulación, que se optó por remover la espiga de estimulación junto a los artefactos causados por la misma en la Figura 5.16. Gracias a esto se aprecian mejor los registros poblacionales.

Por último, los electrodos E2 y E9 presentaron problemas durante ésta etapa de experimentación. El electrodo E2 se mostró insensible a los potenciales generados por las células y el electrodo E9 presentó demasiado ruido, probablemente debido a una conexión defectuosa en algún punto entre él y el amplificador.

5.5 Pruebas empleando el diseño 3

5.5.1 D3: Estimulación sin presencia celular

Se sometió este arreglo de electrodos a una serie de impulsos positivos para determinar su comportamiento en ausencia de células, sumergiéndolo en el medio biológico. Los amplificadores fueron programados para tener un factor de amplificación de 50.

Se observa en la Figura 5.18 que la amplitud que los electrodos sensaron fue nuevamente atenuada por la impedancia propia del medio biológico y de la interfaz electrodo – electrolito.

Debido a la limitante que presentó el contar solo con cinco amplificadores durante las pruebas, se decidió emplear solo cinco de los ocho electrodos de sensado del diseño 3, siendo estos los electrodos E1, E3, E5, E7 y E8. Se empleó el electrodo S2 como electrodo de estimulación.

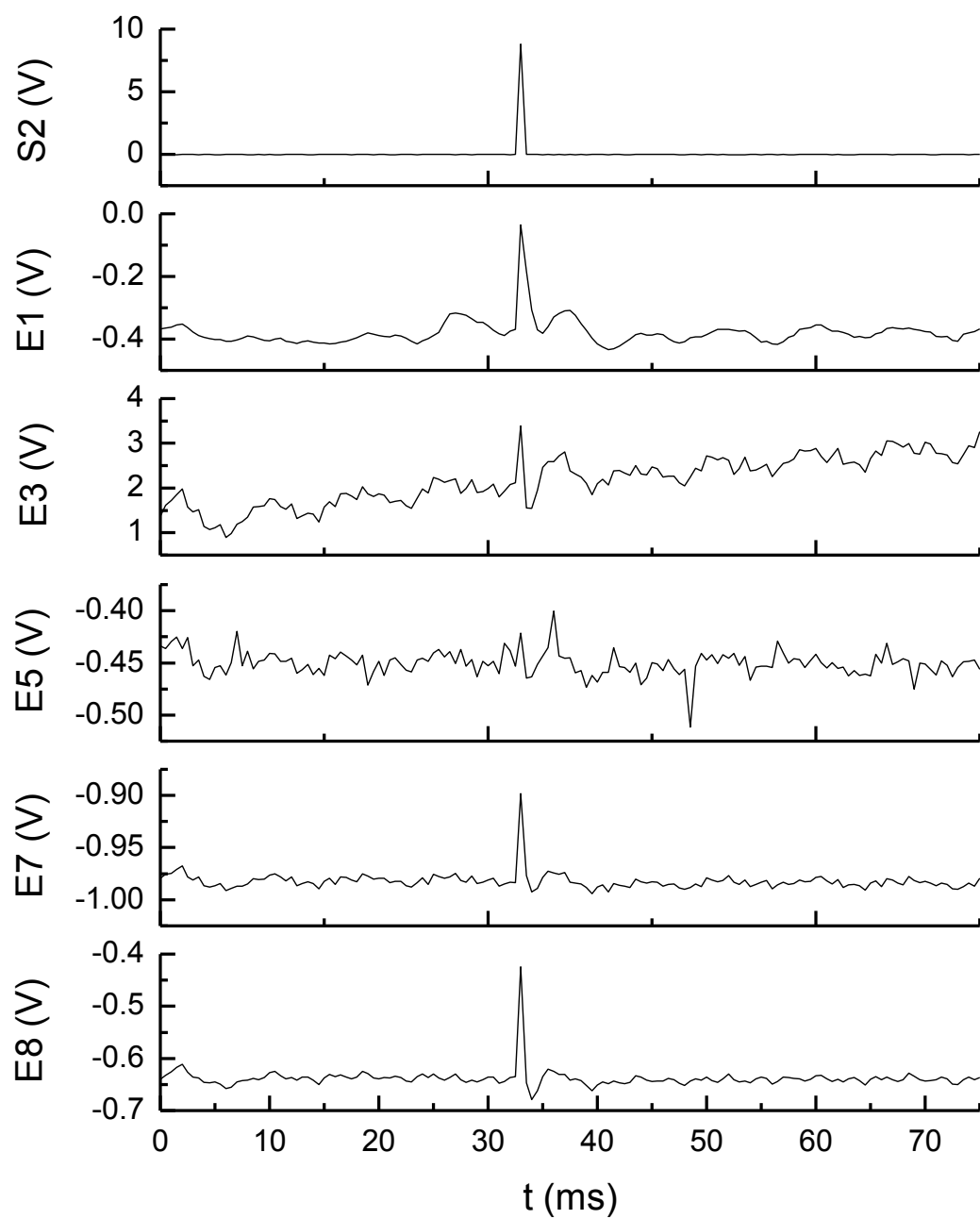


Figura 5.18. D3: Estimulación positiva (S2) del arreglo correspondiente al diseño 3 sin presencia de células. Un electrodo de estimulación (S2) y cinco electrodos de sensado (E1, E3, E5, E7, E8).

5.5.2 D3: Corazón de pez cebra con estimulación

Para esta prueba se utilizaron impulsos positivos y negativos con un periodo de 1 [s], duración de 1 [ms] y amplitud de 10 [V] para estimular un corazón completo de pez cebra. El factor de amplificación usado en esta prueba fue de 100.

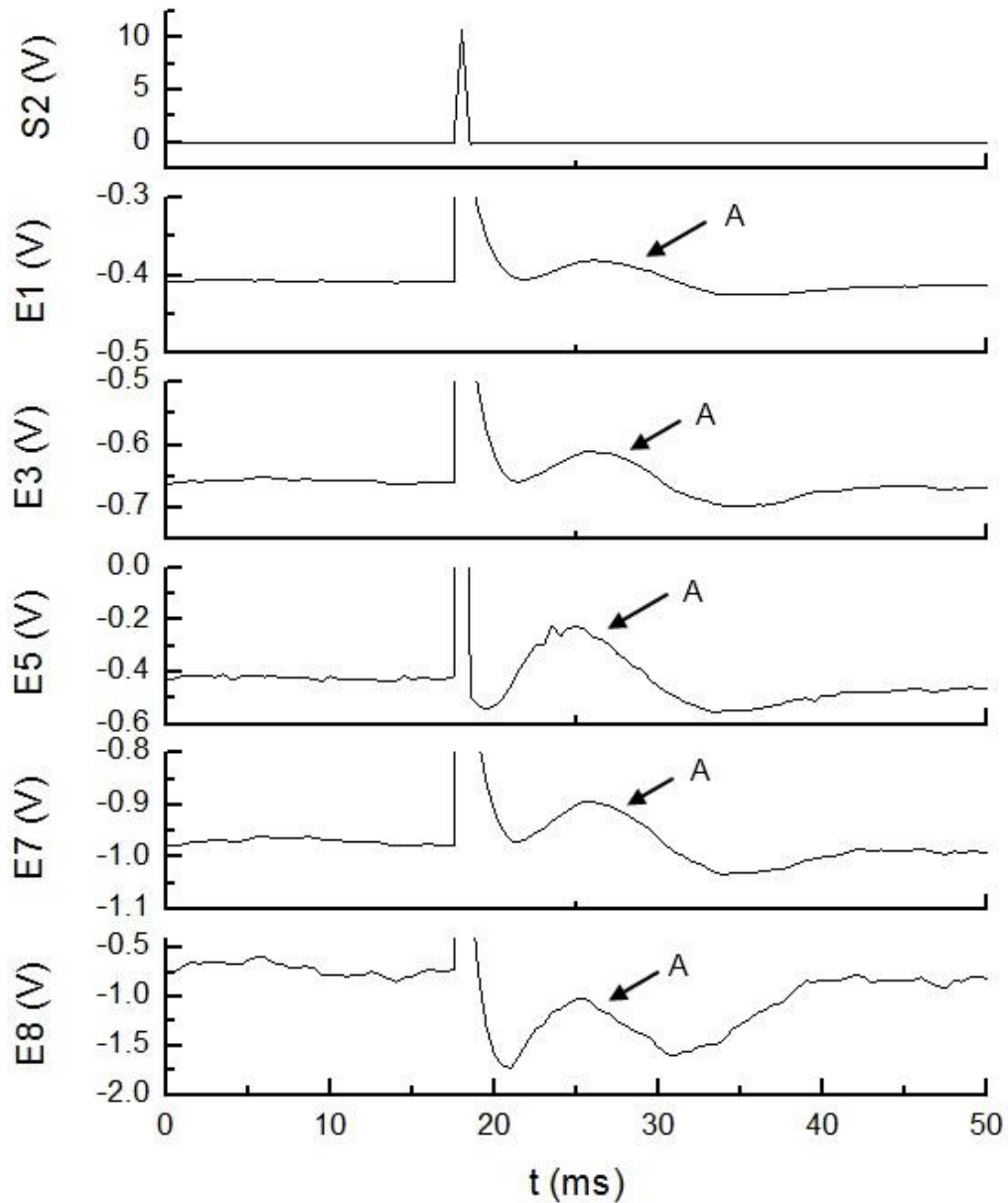


Figura 5.19. D3: Corazón de pez cebra con estimulación positiva (S2). Un electrodo de estimulación (S2) y cinco electrodos de sensado (E1, E3, E5, E7, E8). Se aprecia una subpoblación de células en A.

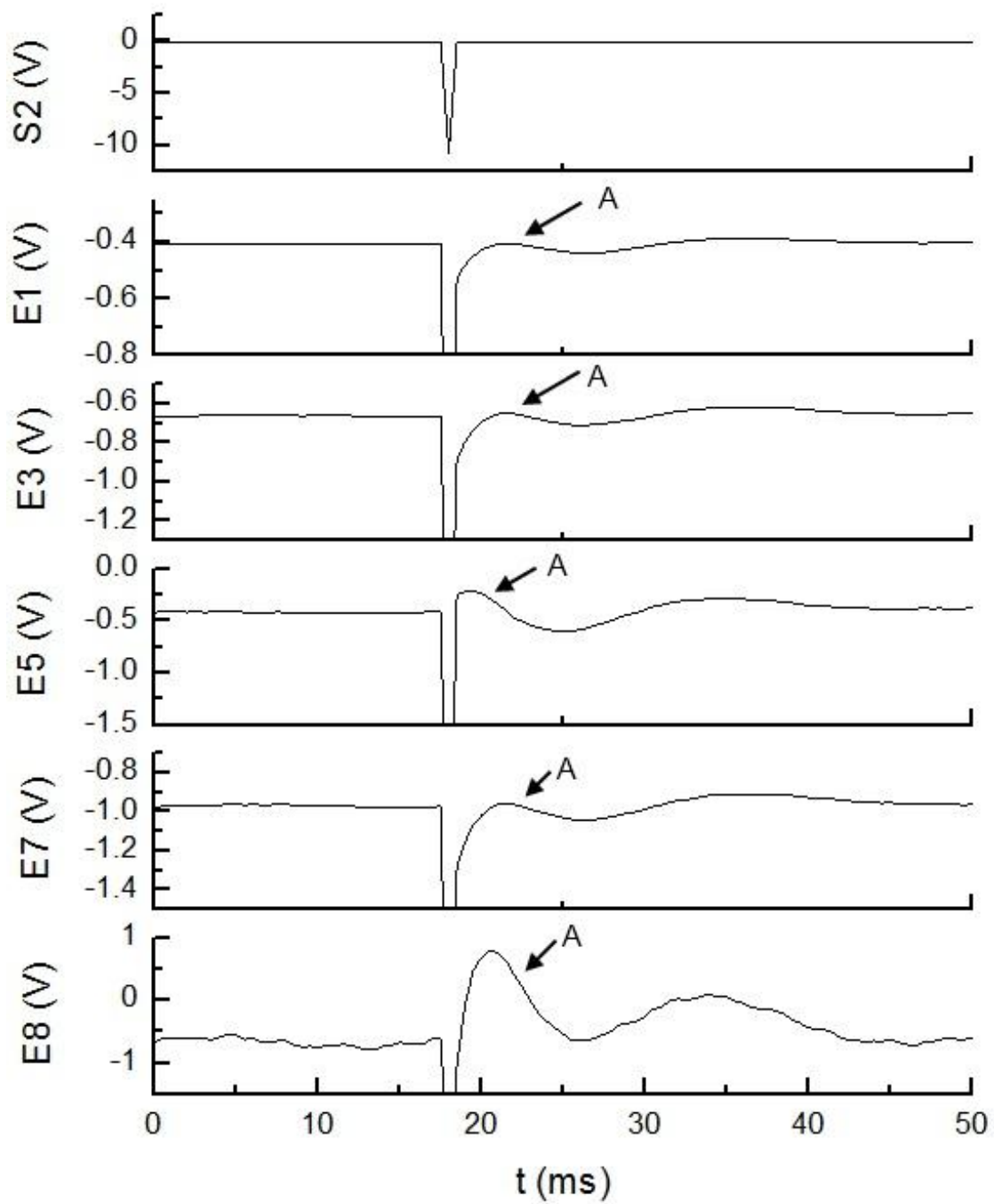


Figura 5.20. D3: Corazón de pez cebra con estimulación negativa (S2). Un electrodo de estimulación (S2) y cinco electrodos de sensado (E1, E3, E5, E7, E8). Se aprecia una subpoblación de células en A.

De la Figura 5.19 se obtuvo que, para una estimulación positiva, el periodo de actividad celular fue de 26 [ms] y la mayor amplitud se detectó en el electrodo más cercano a la fuente de excitación (E8), la cual fue de 1 [V] pico a pico o 10 [mV] reales debido al factor de amplificación de 100. Los demás electrodos de sensado también detectaron actividad celular, pero ésta fue atenuada rápidamente debido al incremento en la distancia que existe entre ellos (200 [μm] entre cada electrodo).

La Figura 5.20 arrojó los datos correspondientes a una estimulación negativa, donde se encontró que las células presentaban un periodo de actividad de 24 [ms] y la mayor amplitud la volvió a presentar el electrodo más cercano a la estimulación (E8) con 1.75 [V] o 17.5 [mV] reales.

Se observaron latencias de 7 [ms] con estimulación positiva y 2 [ms] con estimulación negativa para la subpoblación "A".

5.5.3 D3: Nervio ciático de rana toro con estimulación

Se utilizaron impulsos positivos y negativos como estimulación para esta prueba, con un periodo de 1 [s], duración de impulso de 1 [ms] y amplitud de 10 [V] para estimular una trozo de nervio ciático de rana toro. La adquisición de datos se realizó con un factor de amplificación de 100.

Se encontró que las células tuvieron un periodo excitable de 20 [ms] y una amplitud promedio de 3.5 [V] (35 [mV] reales) tanto para excitación positiva como para negativa (Figura 5.21 y Figura 5.22). Estos resultados son consistentes con las pruebas realizadas en el diseño 1 sobre la misma especie de células.

Las latencias observadas fueron de 10 [ms] para estimulación positiva y 2 [ms] para estimulación negativa de la subpoblación de células "A".

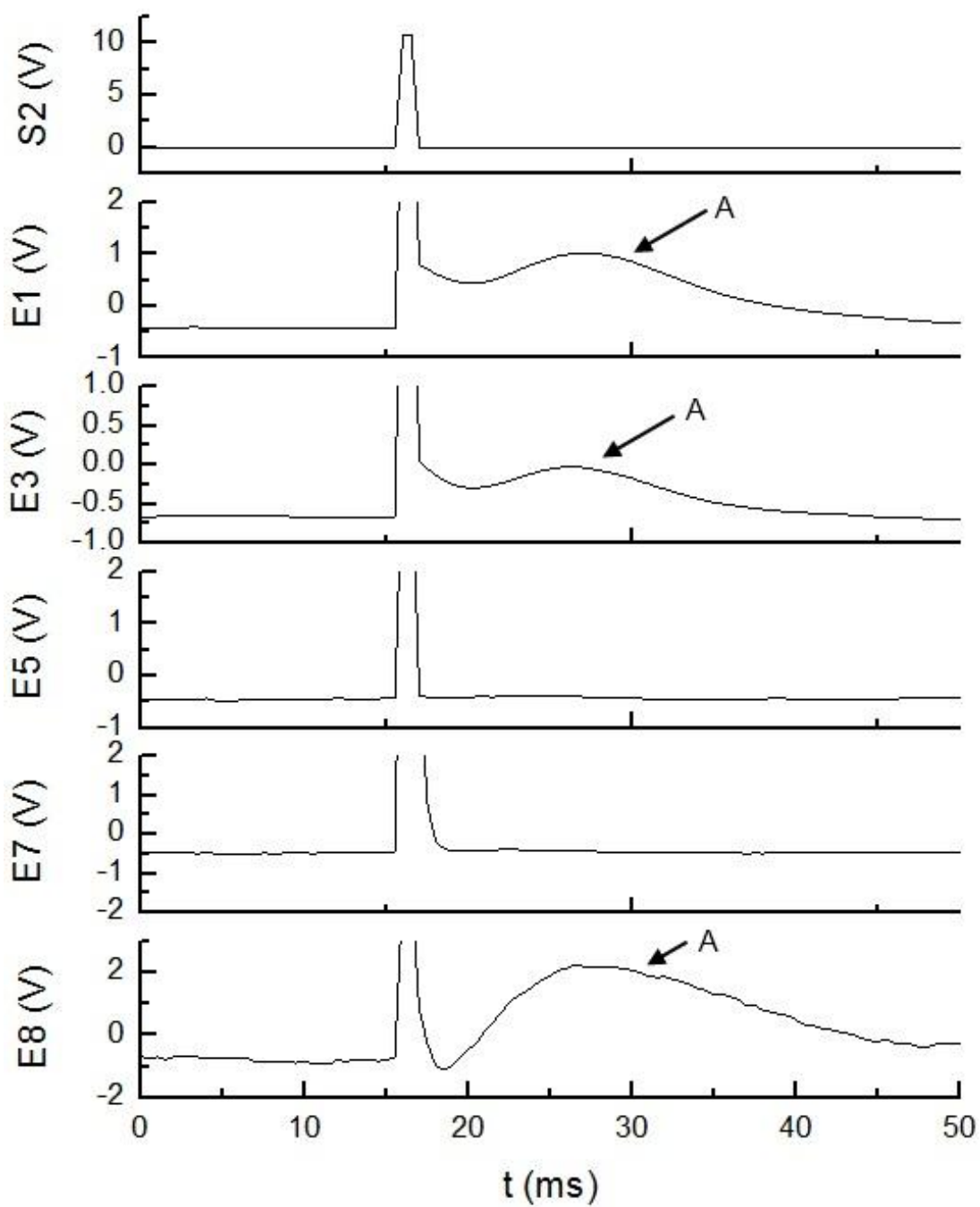


Figura 5.21. D3: Nervio ciático de rana con estimulación positiva (S2). Un electrodo de estimulación (S2) y cinco electrodos de sensado (E1, E3, E5, E7, E8). Se aprecia una subpoblación de células en A.

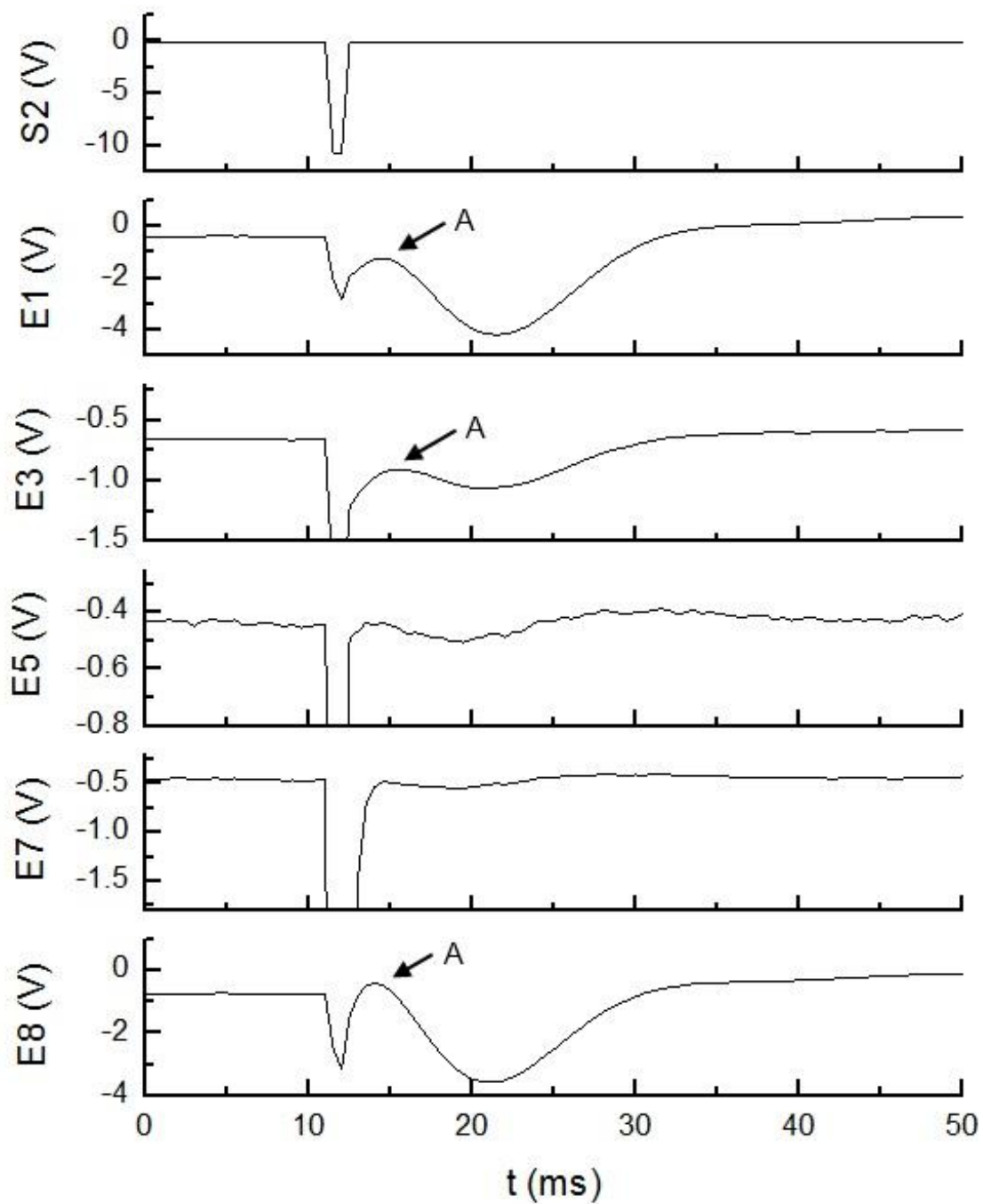


Figura 5.22.D3: Nervio ciático de rana con estimulación negativa (S2). Un electrodo de estimulación (S2) y cinco electrodos de sensado (E1, E3, E5, E7, E8). Se aprecia una subpoblación de células en A.

Discusión y conclusiones

En el presente trabajo se presentan los parámetros de diseño, selección de materiales, proceso de fabricación y prueba de tres arreglos diferentes de micro electrodos para la estimulación y el sensado eléctricos de células excitables.

Se cumplieron los objetivos propuestos al diseñar un arreglo de electrodos planares con una interfaz electrodo-electrolito de plata - cloruro de plata para estimulación y sensado de diferentes objetos de estudio basados en células excitables (agregados celulares, porciones de tejido, etc.), construir dicho dispositivo empleando materiales y tecnologías existentes en la República Mexicana y validar su viabilidad en presencia de varios tipos de células excitables.

Durante el desarrollo del diseño se analizaron diferentes materiales para la construcción de micro electrodos. Algunos de éstos han sido más utilizados (oro, platino) que otros (plata, iridio) sin mayor documentación y análisis que pruebe si el material empleado para el electrodo es adecuado para la tarea que deben realizar los electrodos. En el presente trabajo se presentó una discusión de estos materiales y se seleccionó el compuesto plata – cloruro de plata para la fabricación de los micro electrodos por su baja resistividad eléctrica ($15.9 \times 10^{-9} [\Omega m]$), facilidad de manejo, bajo potencial de *offset* y bajo costo relativo a electrodos fabricados con otros metales como oro y platino.

Se presentó una metodología para diseñar microelectrodos planares, basada en el modelo de Helmholtz para analizar la impedancia de la interfaz electrodo-electrolito y el modelo de Arrhenius para obtener las propiedades eléctricas del medio biológico.

Se diseñaron tres tipos diferentes de arreglos de micro electrodos para solucionar problemas específicos de sensado y estimulación celular haciendo uso de los parámetros definidos por la forma y tamaño del objeto de estudio (trozo de tejido o agregado celular), la forma y tamaño de las células objetivo, la impedancia de la interfaz electrodo – electrolito y los efectos derivados de la impedancia del medio biológico.

Dos de estos diseños buscaron solucionar el sensado y estimulación de un agregado celular o una porción de tejido contenidos en un área circular menor a 800 [μm] de diámetro, el primero (diseño 1) usando pocos electrodos de sensado con una área superficial grande y el segundo (diseño 2) usando mas electrodos de sensado pero con menor área. Para esto se diseñaron cinco electrodos con un área individual de 4536.0 [μm^2] para el diseño 1 y nueve electrodos con 1256.6 [μm^2] de área individual para el diseño 2.

Para el tercer diseño se buscó solucionar la estimulación y sensado de una porción de tejido de hasta 5 [mm] de largo, por lo que se diseñó el arreglo lineal de electrodos cuadrados del diseño 3 con área individual de sensado de 2000 [μm^2].

Se fabricó un prototipo de micro plataforma de estimulación y sensado conformado por una réplica del diseño 1, una réplica del diseño 2 y dos réplicas del diseño 3; empleando la técnica de *lift-off*, depositando cromo (promotor de adhesión) y plata sobre un substrato transparente de vidrio.

Además, el prototipo fabricado incluye varios arreglos de micro electrodos diferentes en un mismo chip, lo que permite llevar a cabo diversas pruebas a diferentes partes de un objeto de estudio grande, o a varios objetos de estudio pequeños al mismo tiempo. Lo anterior permite reducir tiempos de desarrollo en pruebas de laboratorio, cantidad de sustancias químicas por prueba y aumenta la cantidad de pruebas lo que a su vez beneficia a la confianza en los resultados.

Se midieron cinco electrodos de sensado de cada arreglo durante la experimentación realizada con células excitables y se obtuvo el periodo en el que las células presentaron actividad eléctrica observable. Se encontró que puede reducirse notablemente la intensidad de estimulación necesaria para obtener una respuesta, así como la duración del estímulo aplicado.

El desarrollo de esta plataforma presentó varias dificultades, entre las cuales figuran el ruido electromagnético excesivo durante algunas pruebas, la dificultad de realizar conexiones eléctricas al delicado sustrato de vidrio y la necesidad de las células de mantenerse a una temperatura estable con flujo de perfusión continuo durante las pruebas para ayudar a mantenerlas vivas y mejorar la confianza de los datos arrojados por el estudio. Situaciones que pueden solucionarse como trabajo a futuro para mejorar la facilidad de uso y características de la presente plataforma.

Para mejorar el entendimiento de la relación que existe entre los patrones medidos en las pruebas experimentales y el estado del grupo de células estudiado, pueden usarse otros tipos de pruebas reconocidas por la academia de biología (pruebas de fluorescencia por ejemplo), sincronizadas con las mediciones eléctricas realizadas en el arreglo de micro electrodos para poder correlacionarlas, mediante amarres de fase o gatillos (*trigger*) electrónicos. Además, disminuir la diafonía entre electrodos de estimulación y electrodos de sensado, mediante cambios en el diseño y posición de los electrodos de tierra, ayudaría en el estudio de las respuestas celulares. Esto también se propone como trabajo a futuro.

Finalmente, se probó la viabilidad del uso del compuesto plata – cloruro de plata para la micro fabricación de electrodos planares destinados a la estimulación y sensado de células excitables, al observarse en los resultados experimentales un cambio notable en la respuesta de los arreglos a una estimulación sin presencia de células contrastada con la respuesta obtenida por los mismos arreglos a una estimulación en presencia de células excitables; con lo que se ha probado la viabilidad de este prototipo como módulo de un futuro sistema *Lab On a Chip*, dedicado a pruebas celulares, de diseño y fabricación Mexicana.

Anexo 1: Limpieza de substratos

1. Sumergir el substrato en un recipiente con acetona (C_3H_6O) y sonicar durante 5 minutos.
2. Reemplazar la acetona por alcohol isopropílico (C_3H_8O) y volver a sonicar durante 5 minutos.
3. Reemplazar el alcohol isopropílico por agua desionizada y sonicar por otros 5 minutos.
4. Retirar el substrato del recipiente y secar empleando aire filtrado o nitrógeno a presión.
5. Colocar el substrato en una parrilla caliente a 200 [°C] durante 10 minutos para evaporar cualquier residuo líquido que quede en la superficie.
6. Retirar el substrato de la parrilla y dejarlo enfriar en una superficie limpia.

Anexo 2: Depósito de plata y fotolitografía de diseños

El proceso de *lift off*, empleado para el depósito y moldeo de metales, es listado a continuación en general. En la Figura 4.11 se muestra el proceso particular empleado en el presente trabajo.

Preparar el sustrato a usar. Limpiarlo con algún protocolo de limpieza de sustratos para micro fabricación, por ejemplo el mostrado en el

1. Anexo 1.
2. Depositar una capa de algún material para sacrificio. En el presente trabajo se depositó una capa delgada de LOR 10A de Microchem.
3. Depositar una capa de material fotosensible para realizar el proceso de fotolitografía que transmitirá el patrón deseado al chip. Para éste paso se uso una capa de microposit S1813 de Shipley.
4. Exponer la resina al patrón deseado.
5. Grabar la resina fotosensible.
6. Grabar el material de sacrificio dejando un perfil de sub corte (*under cut*). Este perfil es importante porque en el paso de liberación permite la completa remoción del material de sacrificio.
7. Depósito de promotor de adhesión. Este paso se puede omitir en algunos casos, para el presente trabajo se necesitó depositar una capa de cromo como promotor de adhesión entre la plata y el sustrato de vidrio.
8. Depósito del material objetivo, plata para el presente trabajo.
9. Liberación de la estructura. En este paso el sustrato se somete a un tratamiento químico que consume la capa de sacrificio y remueve todo el material depositado sobre ella, dejando solamente el material depositado directamente sobre el sustrato.

A continuación se presenta el proceso de *lift-off* completo usado para fabricar el prototipo de micro electrodos.

1. Depositar una capa delgada de resina LOR 10A de Microchem (desarrollada para *lift-off*), empleando un *spin coater* con los siguientes parámetros:
 - a. Velocidad angular de 400 [rpm], aceleración de 400 [rpm/s] y duración de 5 [s].
 - b. Velocidad angular de 3000 [rpm], aceleración de 10000 [rpm/s] y duración de 45 [s].
2. Calentar el sustrato en una parrilla caliente a 160 [°C] durante 2 [min].
3. Retirar el sustrato de la parrilla y dejar enfriar durante 15 [min] sobre una superficie limpia y no disipadora de calor (ej. paños de cuarto limpio), para evitar un gradiente de temperatura muy brusco el cual produciría fisuras en la capa de resina.
4. Depositar una capa delgada de resina microposit S1813 de Shipley (Resina fotosensible positiva), empleando un *spin coater* con los siguientes parámetros:
 - a. Velocidad angular de 400 [rpm], aceleración de 400 [rpm/s] y duración de 5 [s].
 - b. Velocidad angular de 3000 [rpm], aceleración de 10000 [rpm/s] y duración de 45 [s].
5. Calentar el sustrato en una parrilla caliente a 95 [°C] durante 2 [min].
6. Alinear la máscara que porta el diseño de los electrodos con el sustrato y exponer. Para este paso se utilizó una máquina para alineación y exposición OAI modelo 200 con un tiempo de exposición de 3.6 [s].
7. Revelar la resina S1813 en una solución de revelador microposit 351 de Shipley en proporción 5:1 con agua desionizada durante 90 [s].
8. Enjuagar el sustrato en agua des ionizada durante 5 [min].
9. Calentar el sustrato en una parrilla caliente a 95 [°C] durante 3 [min].
10. Revelar la resina LOR 10A en una solución de revelador microposit CD-26 de Shipley 75 [s].

11. Depositar una capa de cromo de 30 [nm]. Para este paso se empleo una máquina para depósito por sputtering con un control de depósito de película delgada INFICON SQC-310 con los parámetros mostrados en las tablas para depósito de cromo (Tabla XIX y Tabla XX).
12. Depositar una capa de plata de 140 [nm]. Para este paso se empleo una máquina para depósito por sputtering con un control de depósito de película delgada INFICON SQC-310 con los parámetros mostrados en las tablas para depósito de plata (Tabla XXI y Tabla XXII).
13. Sumergir el sustrato en removedor PG de Microchem calentado a 80 [°C] hasta que se desprendan las capas de resina y sólo quede en el sustrato el patrón de metal deseado.
14. Enjuagar el sustrato en agua des ionizada durante 2 [min].
15. Secar empleando aire filtrado o nitrógeno a presión.

Tabla XIX: Parámetros de proceso para depósito de Cromo.

Parámetro	Valor	Unidades
Init Rate	0.5	A/s
Final Thickness	0.3	kA
Time Setpoint	0:00:00	H:mm:ss
Thickness Setpoint	0.0	kA
Start Mode	Auto	Auto/Man.
Sensor 1	On	On/Off
Sensor 2	Off	On/Off
Sensor 3	Off	On/Off
Sensor 4	Off	On/Off
Source	Src1	Src1/Src2
Max. Power	85.0	%
Min. Power	0.0	%
Power Alarm Delay	99	Sec.
Slew Rate	3.0	%/sec
Rate Dev. Attention	0.0	%
Rate Dev. Alert	0.0	%
Rate Dev. Alarm	0.0	%
Ramp1	Enabled	En/Dis
Start Thickness	0.25	kA
Ramp Time	0:01:30	h:mm:ss
New Rate	0.7	A/s
Ramp2	Enabled	En/Dis
Start Thickness	0.45	kA
Ramp Time	0:01:30	h:mm:ss
New Rate	0.7	A/s
Ramp3	Disabled	En/Dis

Tabla XX: Condiciones de la película delgada de Cromo.

Parámetro	Valor	Unidades
Ramp1 Power	40.0	%
Ramp1 Time	0:02:00	h:mm:ss
Soak1 Time	0:01:00	h:mm:ss
Ramp1 Power	60.0	%
Ramp1 Time	0:01:30	h:mm:ss
Soak1 Time	0:02:00	h:mm:ss
Feed Power	0.0	%
Ramp Time	0:00:30	h:mm:ss
Feed Time	0:00:00	h:mm:ss
Idle Power	0.0	%
Ramp Time	0:00:00	h:mm:ss

Tabla XXI: Parámetros de proceso para depósito de Plata.

Parámetro	Valor	Unidades
Init Rate	0.5	A/s
Final Thickness	1.4	kA
Time Setpoint	0:00:00	H:mm:ss
Thickness Setpoint	0.0	kA
Start Mode	Auto	Auto/Man.
Sensor 1	Off	On/Off
Sensor 2	On	On/Off
Sensor 3	Off	On/Off
Sensor 4	Off	On/Off
Source	Src1	Src1/Src2
Max. Power	75.0	%
Min. Power	0.0	%
Power Alarm Delay	99	Sec.
Slew Rate	3.0	%/sec
Rate Dev. Attention	0.0	%
Rate Dev. Alert	0.0	%
Rate Dev. Alarm	0.0	%
Ramp1	Disabled	En/Dis
Ramp2	Disabled	En/Dis
Ramp3	Disabled	En/Dis

Tabla XXII: Condiciones de la película delgada de Plata.

Parámetro	Valor	Unidades
Ramp1 Power	28.0	%
Ramp1 Time	0:01:30	h:mm:ss
Soak1 Time	0:00:30	h:mm:ss
Ramp1 Power	0.0	%
Ramp1 Time	0:00:00	h:mm:ss
Soak1 Time	0:00:00	h:mm:ss
Feed Power	0.0	%
Ramp Time	0:00:00	h:mm:ss
Feed Time	0:00:00	h:mm:ss
Idle Power	0.0	%
Ramp Time	0:00:00	h:mm:ss

Anexo 3: Proceso de fabricación de la capa de pasivación de trazas conductoras

1. Procediendo a partir de las condiciones finales del proceso anterior, se deposita una capa delgada ($5\text{ }\mu\text{m}$) de resina SU-8 5 de Microchem (Resina fotosensible negativa), empleando un *spin coater* con los siguientes parámetros:
 - a. Velocidad angular de 500 [rpm], aceleración de 100 [rpm/s] y duración de 10 [s].
 - b. Velocidad angular de 2000 [rpm], aceleración de 300 [rpm/s] y duración de 30 [s].
2. Calentar el sustrato en una parrilla caliente a 95 [°C] durante 2 [min].
3. Alinear la máscara que porta el diseño de la máscara de pasivación con el sustrato y exponer. Para este paso se utilizó un equipo de alineación y exposición OAI modelo 200 con un tiempo de exposición de 1.8 [s].
4. Calentar el sustrato en una parrilla caliente a 95 [°C] durante 2 [min].
5. Revelar la resina en una solución concentrada de revelador para SU-8 de Microchem durante 60 [s].
6. Enjuagar el sustrato en agua desionizada durante 5 [min].
7. Secar empleando aire filtrado o nitrógeno a presión.
8. Calentar el sustrato en una parrilla caliente a 150 [°C] durante 30 [min].

Anexo 4: Proceso de fabricación de la capa para microfluídica

1. Preparar el diseño de la microfluídica deseada y generar un molde a partir de él. Para el presente trabajo se emplearon dos técnicas para la generación de estos moldes, reproducción por litografía tradicional y por litografía suave, explicadas en el Anexo 6 y Anexo 7, respectivamente.
2. Medir una cantidad de PDMS Dow Corning Kit Sylgard 184 tal que el grosor total de la réplica sea de 1 [mm].
3. Medir en una balanza de precisión una cantidad de curante para PDMS, suficiente para el polímero medido en el paso anterior, en una relación de 1 [g] de curante por cada 10 [g] de PDMS.
4. Mezclar el curante con el PDMS durante 60 [s] o hasta conseguir una mezcla homogénea.
5. Desgasificar la mezcla de PDMS en una campana de vacío a 150 [mTorr] hasta que en su superficie exista una baja densidad de burbujas.
6. Colocar el molde en un recipiente y verter la mezcla de PDMS sobre él.
7. Colocar el molde con PDMS de nuevo en la campana de vacío a 150 [mTorr] y permitirle desgasificar por otros 20 [min] o hasta que no haya burbujas en la superficie del PDMS.
8. Colocar el molde con PDMS en una parrilla caliente a 80 [°C] durante 30 [min] para catalizar su fraguado.
9. Retirar el PDMS fraguado del recipiente y cortar a las dimensiones deseadas.
10. Desmoldar la réplica de PDMS y agregar agujeros de interconexión mediante el uso de un sacabocado.
11. Finalmente, alinear la capa de Microfluídica y colocarla en el sustrato.

Anexo 5: Electro platinado

1. Limpiar la superficie a electro platar empleando alcohol isopropílico.
2. Lavar los residuos de alcohol empleando agua desionizada.
3. Preparar una solución de nitrato de plata al 0.3 [Mol].
4. Empleando una fuente de poder, conectar el polo negativo a los electrodos receptores de plata y el polo positivo a un electrodo donador de plata. Para el presente trabajo el electrodo donador fue un alambre de plata 99.99% pura.
5. Conectar al circuito un voltímetro y un amperímetro para monitorear el voltaje entre terminales y la corriente que pasa a través de los electrodos.
6. Sumergir los electrodos receptores y al electrodo donador en la solución de nitrato de plata.
7. Encender la fuente de poder y regular la corriente eléctrica a $1\ [\mu A]$, esto se consiguió a un voltaje de 18 [mV]. Estos ajustes fueron realizados considerando una densidad de corriente por electrodo de $13\ [\frac{mA}{cm^2}]$.
8. Mantener los ajustes anteriores durante 300 [s] y al finalizar apagar la fuente de poder.
9. Desconectar los electrodos receptores y retirar el electrodo donador.
10. Lavar el nitrato de plata de los electrodos empleando agua desionizada.

Anexo 6: Fotolitografía tradicional

La fotolitografía consiste en transferir un patrón desde una máscara a la superficie de un sustrato empleando radiación lumínica. Es un proceso metódico que engloba los pasos descritos a continuación.

Preparación del sustrato

Para garantizar una buena adhesión y distribución de las resinas empleadas en este proceso, es necesario que el sustrato que se emplee se encuentre limpio y sea lo más uniforme posible. Para lograr lo anterior se han desarrollado diferentes protocolos de limpieza (como el descrito en el

Anexo 1). Dependiendo del tipo de sustrato y el grado de limpieza que se necesite manejar, este proceso de limpieza se puede realizar empleando desde solventes (acetona) hasta algunos ácidos fuertes (ácido sulfúrico).

Aplicación de resina fotosensible

Después de su preparación, al sustrato se le aplica una delgada capa de resina fotosensible. Esta clase de resinas reaccionan químicamente a la exposición lumínica a ciertas longitudes de onda, reforzando sus lazos químicos en la región expuesta (resinas negativas) o debilitándolos (resinas positivas), cambiando así las zonas que son susceptibles a ser removidas en el proceso de revelado, el cual consiste en un baño químico que ataca las zonas expuestas en resina positiva y las regiones no expuestas en resina negativa. Después de ser depositada la resina, el sustrato se somete a un proceso de horneado (*soft bake*) a una temperatura adecuada para la resina que se esté usando para que ésta se endurezca un poco y soporte los subsecuentes procesos sin deformarse.

Exposición

El substrato y la resina se exponen a una fuente luminosa enmascarada con el diseño deseado y a una longitud de onda correspondiente a la requerida por la resina fotosensible.

Existen diferentes formas para realizar esta etapa: empleando una máscara física colocada sobre el substrato y en contacto con éste (litografía de contacto), empleando una máscara física suspendida sobre el substrato a una distancia controlada (litografía de proyección) o empleando algún equipo de proyección para irradiar la superficie con el patrón desasado desde una imagen directamente desde una computadora (sin máscara física o *maskless*). Acto seguido, se vuelve a hornear el substrato (*post exposure bake*) a una temperatura adecuada a la resina empleada.

Revelado

El proceso de revelado consiste en sumergir el substrato en un baño químico destinado a remover las partes no deseadas de la resina. El químico empleado o revelador para este propósito depende de la resina empleada. Por último, el substrato se puede someter a un horneado final (*hard bake*) a una temperatura elevada, dependiente de la resina, para reforzar aún más sus lazos químicos y su resistencia a la corrosión.

Anexo 7: Litografía suave

La litografía suave es un proceso en el cual se transfiere un patrón a algún material elástico, principalmente elastómeros como el PDMS, de aquí su denominación "suave". Una diferencia entre este proceso y el de fotolitografía tradicional radica en el tipo de patrones que se pueden obtener: en fotolitografía se emplean patrones 2D para fabricar superficies con características 3D, en litografía suave se emplean moldes 3D para generar replicas 3D. Al igual que la litografía óptica tradicional, es un proceso metódico que engloba una serie de pasos bien definidos.

Molde

Como primer paso se genera un molde de la pieza que se desea fabricar. Existen varias opciones para la generación de moldes con características a micro escala. Por ejemplo, empleando fotolitografía donde la forma del molde está dada por el patrón transferido a la resina fotosensible.

Otro ejemplo de técnicas para generación de moldes a micro escala se encuentra en el uso de hojas pre-estiradas de algún polímero termoplástico. Sobre estas superficies se puede imprimir el patrón que se desea reproducir y al someterlas a una temperatura elevada (~ 80 [°C] dependiendo del polímero empleado) se reducen a su tamaño original, miniaturizando el patrón previamente impreso en ellas.

Preparación del polímero para la réplica

Como se explicó anteriormente, el nombre de la técnica proviene de usar alguna clase de polímero suave para crear una réplica a partir del molde. Algunos polímeros requieren de un agente curante para comenzar su proceso de fraguado, es en este paso donde es agregado y mezclado con la cantidad de polímero a usar.

A micro escala es de gran importancia prepara el polímero elegido desgasificándolo antes de verterlo en el molde para evitar la formación de burbujas en la réplica, las cuales tienen el potencial de inhabilitarla.

Fraguado

Después de su preparación, el polímero se vierte sobre el molde y se debe someter nuevamente a un proceso de desgasificado para eliminar cualquier burbuja de aire atrapada durante el vertido.

A partir de este momento se le permite fraguar al polímero, lo que sucede naturalmente, aplicando un agente curante o sometiéndolo a una temperatura alta, dependiendo del tipo de polímero empleado. Este paso puede tardar desde algunos minutos hasta varias horas, dependiendo de la temperatura a la que se realice el proceso y las propiedades químicas específicas del polímero empleado.

Desmolde

Como paso final, la réplica es desmoldada después de que concluye el fraguado del material. Usualmente, dependiendo del material del molde, el desmolde no destruye el molde empleado en la fabricación de la réplica, por lo cual se puede emplear para fabricar un gran número de éstas.

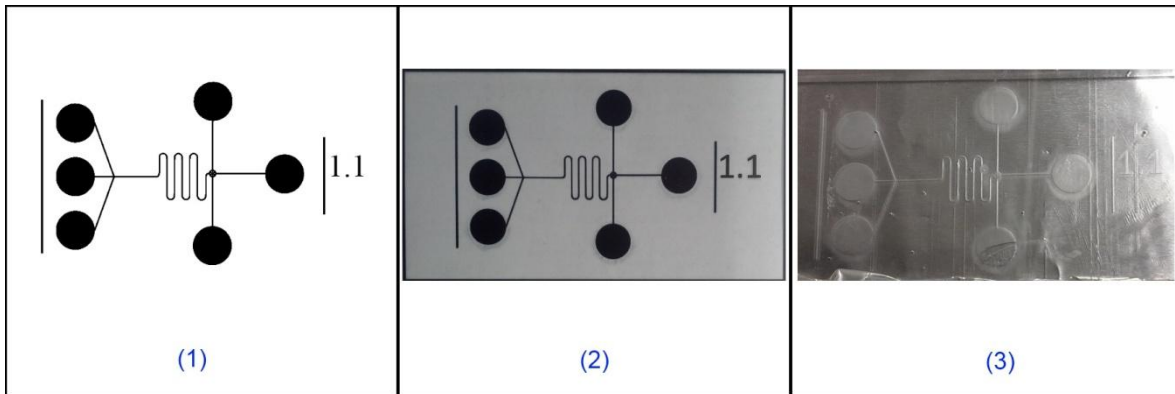


Figura A 1. Algunos de los elementos de un proceso por litografía suave. (1) Imagen generada por computadora para el diseño del molde. (2) Molde fabricado en un polímero termoplástico. (3) Réplica en PDMS del molde. Las dimensiones del molde y de la réplica son 5.5 [mm] de largo por 3 [mm] de alto.

Anexo 8: Programa en MATLAB para el cálculo de los valores teóricos del modelo eléctrico de la interfaz electrodo - electrólito

```
%% Acondicionar el espacio de trabajo
clear
clc

%% Constantes Absolutas
e0=8.85419e-12;      %[F/m] Permitividad del vacio
q=1.60219e-19;      %[C] Carga eléctrica de un electrón
k=1.3806488e-23;    %[J/K] Constante de Boltzman
NA=6.02214129e23;   %[1/mol] Constante de Avogadro

%% Dimensiones de los electrodos
%Orden: Diseño, Elec Sen, Elec Est
elecRad = [1 38e-6 50e-6;...
           2 20e-6 33e-6]; %[m] Radio de los electrodos circulares
%Orden: 1-Elec Sen (largo, ancho), 2-Elec Est (largo, ancho)
elecCua = [1 100e-6 20e-6;...
           2 100e-6 40e-6]; %[m] Dimensiones de les electrodos
rectangulares
for a=1:1:2
for b=1:1:2
    areaElec(b,a) = pi.*(elecRad(b,a+1)^2); %[m^2] Area de los
electrodos circulares
end
end
for a=1:1:2
    areaElec(3,a) = elecCua(a,2).*elecCua(a,3); %[m^2] Area de los
electrodos rectangulares
end

%% Propiedades del medio de cultivo
erAgua = 5.7;      %[1] Permitividad relativa del agua a 30°C
er=69;             %[1] Permitividad relativa del medio
dOHP=5e-10;        %[m] Tamaño del plano exterior de Helmholtz
CT=125e-3;         %[mol] Concentración molar de sustancia en el
medio
z=1;               %[1] Valencia de los iones del medio
n0=CT*NA;          %[iones/L]Concentración de iones por volumen de
medio
J0 = 20;           %[A/m] Densidad de corriente del par Ag/AgCl

%% Variables de experimento
T=273+30;          %[K] Temperatura
Vt=k*T/q;          %[V] Voltage termico
V0=50e-3;          %[V] Potencial del electrodo
```

```

%% Componentes del medio biológico
componentes = ['NaCl' ';...
'KCl' ';...
'CaCl2' ';...
'MgCl' ';...
'NaHCO3' ';...
'NaH2PO4';...
'Glucosa'];

%% Concentraciones medio biológico [mol]
cmNaCl = 136e-3;
cmKCl = 5.4e-3;
cmCaCl2 = 8e-3;
cmMgCl = 1e-3;
cmNaHCO3 = 26e-3;
cmNaH2PO4 = 40.3e-3;
cmGlucosa = 5e-3;

%% Masas atómicas [g/mol]
H = 1.00794;
C = 12.0107;
N = 14.0067;
O = 15.9994;
Na = 22.98977;
Mg = 24.3050;
P = 30.973761;
S = 32.065;
Cl = 35.453;
K = 39.0983;
Ca = 40.078;

%% Masas moleculares [g/mol]
mmNaCl = Na+Cl;
mmKCl = K+Cl;
mmCaCl2 = Ca+Cl*2+ 6*(H*2+O);%Hexahydrate
mmMgCl = Mg+Cl+ 6*(H*2+O);%Hexahydrate
mmNaHCO3 = Na+H+C+O*3;
mmNaH2PO4 = Na+H*2+P+O*4;
mmGlucosa = C*6+H*12+O*6;

%% Conductancias equivalentes limitantes [uS/(cm mol)]
%Cationes
lecCa = 59.50e3;
lecH = 349.8e3;
lecK = 73.52e3;
lecMg = 53.06e3;
lecNa = 50.11e3;
%Aniones
lecCl = 76.35e3;
lecHCO3 = 44.5e3;
lecSO4 = 80e3;
%Sales
lecNaH2PO4 = 80.2e3;

```

```

%% Conductividad de cada compuesto [S/m]
cond(1) = (lecNa+lecCl)*cmNaCl;           %NaCl
cond(2) = (lecK+lecCl)*cmKCl;             %KCl
cond(3) = (lecCa+2*lecCl)*cmCaCl2;        %CaCl2
cond(4) = (lecMg+lecCl)*cmMgCl;           %MgCl
cond(5) = (lecNa+lecHCO3)*cmNaHCO3;       %NaHCO3
cond(6) = lecNaH2PO4*cmNaH2PO4;          %Na2HPO4
cond(7) = 0;                             %Glucosa
condMicro = cond;
cond = cond.*1e-4;

%% Capacitancias por unidad de area
CH=e0*er/(dOHP);                          % [F/m^2]  Capacitancia de
Helmholtz
LD=sqrt(e0*er*Vt/(2*n0*(1/0.001)*z^2*q)); % [m]      Radio de Debye
CG=e0*er/LD*cosh(z*V0/(2*Vt));            % [F/m^2]  Capacitancia de
Gouy-Chapman
CI=1/(1/CH+1/CG);                         % [F/m^2]  Capacitancia de
Interfaz

%% Capacitancia por electrodo
CHe = CH.*areaElec;                       % [F]
CGe = CG.*areaElec;                       % [F]
CIe = CI.*areaElec;                       % [F]

%% Resistencia por transferencia de carga
Rtc = Vt./(z*J0.*areaElec);

%% Resistividad del medio [ohm m]
rho = 1/sum(cond);

%% Resistencia de dispersión a la membrana celular [ohm]
L=0:0.2e-6:1e-3;                          % [m]
tam = size(areaElec);
Rcelula = zeros(tam(1),tam(2),length(L));
c = 1;
Rtemp = zeros(tam(1)*tam(2),length(L));
for a=1:1:tam(1)
for b=1:1:tam(2)
    Rcelula(a,b,:) = rho.*L./areaElec(a,b);
for d=1:1:length(L)
    Rtemp(c,d) = Rcelula(a,b,d);
end
    c = c+1;
end
end
distCelula = 50e-6;                       % [m] Distancia de la célula al electrodo
Rtemp(:,round(length(L)*distCelula/2e-3)+1) %Vector que contiene los
valores de Rd1
%Orden:Diseño1-S,Diseño1-E,Diseño2-S,Diseño2-E,Diseño3-S,Diseño3-E

```

```

figure(1)
subplot(3,2,1)
plot(L,Rtemp(1,:))
title('Diseño 1 - Sensado');
xlabel('Distancia [m]')
ylabel('Resistencia [Ohms]')

subplot(3,2,2)
plot(L,Rtemp(2,:))
title('Diseño 1 - Estimulación');
xlabel('Distancia [m]')
ylabel('Resistencia [Ohms]')

subplot(3,2,3)
plot(L,Rtemp(3,:))
title('Diseño 2 - Sensado');
xlabel('Distancia [m]')
ylabel('Resistencia [Ohms]')

subplot(3,2,4)
plot(L,Rtemp(4,:))
title('Diseño 2 - Estimulación');
xlabel('Distancia [m]')
ylabel('Resistencia [Ohms]')

subplot(3,2,5)
plot(L,Rtemp(5,:))
title('Diseño 3 - Sensado');
xlabel('Distancia [m]')
ylabel('Resistencia [Ohms]')

subplot(3,2,6)
plot(L,Rtemp(6,:))
title('Diseño 3 - Estimulación');
xlabel('Distancia [m]')
ylabel('Resistencia [Ohms]')

%% Resistencia de dispersión a tierra de electrodos circulares
RsC = rho./(4*elecRad(:,2:3)); % [ohm]
Rs = RsC;

%% Resistencia de dispersión a tierra de electrodos rectangulares
for a=1:1:2
    RsR(a) = rho.*(4*elecCua(a,2)./elecCua(a,3))./(pi.*elecCua(a,2));
    % [ohm]
end
Rs(3,:) = RsR;

%% Resistencia de dispersión inter electrodos
Dee = 150e-6; % [m] Distancia de electrodo a electrodo
Aee = elecRad(1,3)*distCelula; % [m^2]
Rsee = rho*Dee/Aee;

```

```

%% Masa en solución [g]
masas(1) = mmNaCl*cmNaCl;
masas(2) = mmKCl*cmKCl;
masas(3) = mmCaCl2*cmCaCl2;
masas(4) = mmMgCl*cmMgCl;
masas(5) = mmNaHCO3*cmNaHCO3;
masas(6) = mmNaH2PO4*cmNaH2PO4;
masas(7) = mmGlucosa*cmGlucosa;

%% Impedancias totales
ftest = 2; %[Hz]
s = 1i*ftest*2*pi;

%Impedancia por total D1
ZD1 = (Rtc(1,1)/(1+s*Rtc(1,1)*CIe(1,1))) + Rs(1,1)+Rs(1,2);
ZD1 = ZD1 + (Rtc(1,2)/(1+s*Rtc(1,2)*CIe(1,2)));

%Impedancia por total D2
ZD2 = (Rtc(2,1)/(1+s*Rtc(2,1)*CIe(2,1))) + Rs(2,1)+Rs(2,2);
ZD2 = ZD2 + (Rtc(2,2)/(1+s*Rtc(2,2)*CIe(2,2)));

%Impedancia por total D3
%Orden: E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8
%Referenciados a S1
ZD3 = zeros(1,8);
for ele=1:1:8
    ZD3(ele) = (Rtc(3,1)/(1+s*Rtc(3,1)*CIe(3,1))) +
    ele*(Rs(3,1)+Rs(3,2));
    ZD3(ele) = ZD3(ele) + (Rtc(3,2)/(1+s*Rtc(3,2)*CIe(3,2)));
end

%% Salida
ZD1
ZD2
ZD3'

```

Anexo 9: Programa en MATLAB para el cálculo de la resistencia de trazas conductoras de cada diseño, como función del grosor de la capa de plata

A continuación se presenta un programa que permite el cálculo de la resistencia por traza conductiva, tomando en cuenta las dimensiones del diseño y la resistividad del material empleado. En la Figura A 2 se muestran gráficas de la resistencia vs grosor de capa de metal depositado para cada tipo de traza diseñada. En la Figura A 3 se muestra el tipo de traza conductora que se empleó para cada diseño de micro electrodos. Por último, se presentan en la Tabla XXIII los valores de resistencia de cada traza para la cantidad de plata depositada en el prototipo (140 [nm]).

```
% Acondicionar el espacio de trabajo
clear
clc
%% Constantes de experimento
rho = 29.03e-9;           %Resistividad de la plata 99.99% pura [ohm m]
t = 10:1:300;
t = t*1e-9;              %Grosor de la capa de plata [m]

%% Pads y Lineas de interconexión (LI)
%Longitud de las trazas conductoras [m] Orden2: Pad-LI1-LI2-LI3
%Estos parámetros son iguales para cualquiera de los tres diseños
LL = [3000 19500 5480 0; ... %Traza 1
      3000 19000 3800 600; ... %Traza 2
      3000 18500 1700 1000; ... %Traza 3
      3000 18000 1500 0; ... %Traza 4
      3000 18500 1700 1000; ... %Traza 5
      3000 19000 3800 600; ... %Traza 6
      3000 19500 5480 0].*1e-6; %Traza 7
AL = [1500 1000 200 200].*1e-6; %Ancho de las trazas conductoras [m]

%% Calculo de resistencia de cada traza como función del grosor de plata
RL = zeros(7);
figure(1)
tt = 140; %Grosor de plata elegido [nm]
for a=1:1:size(LL,1)
for b=1:1:size(LL,2)
%Suma de las resistencias geométricas de cada traza
RL(a) = RL(a) + rho.*LL(a,b)./(AL(1,b));
end
%Obtención de la resistencia y grafica
temp = RL(a)./t;
figure(1)
subplot(3,3,a)
plot(t,temp)
title({'Traza ' num2str(a)})
xlabel('Ag [m]')
```

```

ylabel('Resistencia [Ohms]')
%Valor de resistencia por traza para el grosor de plata elegido
temp(tt+10)
end

```

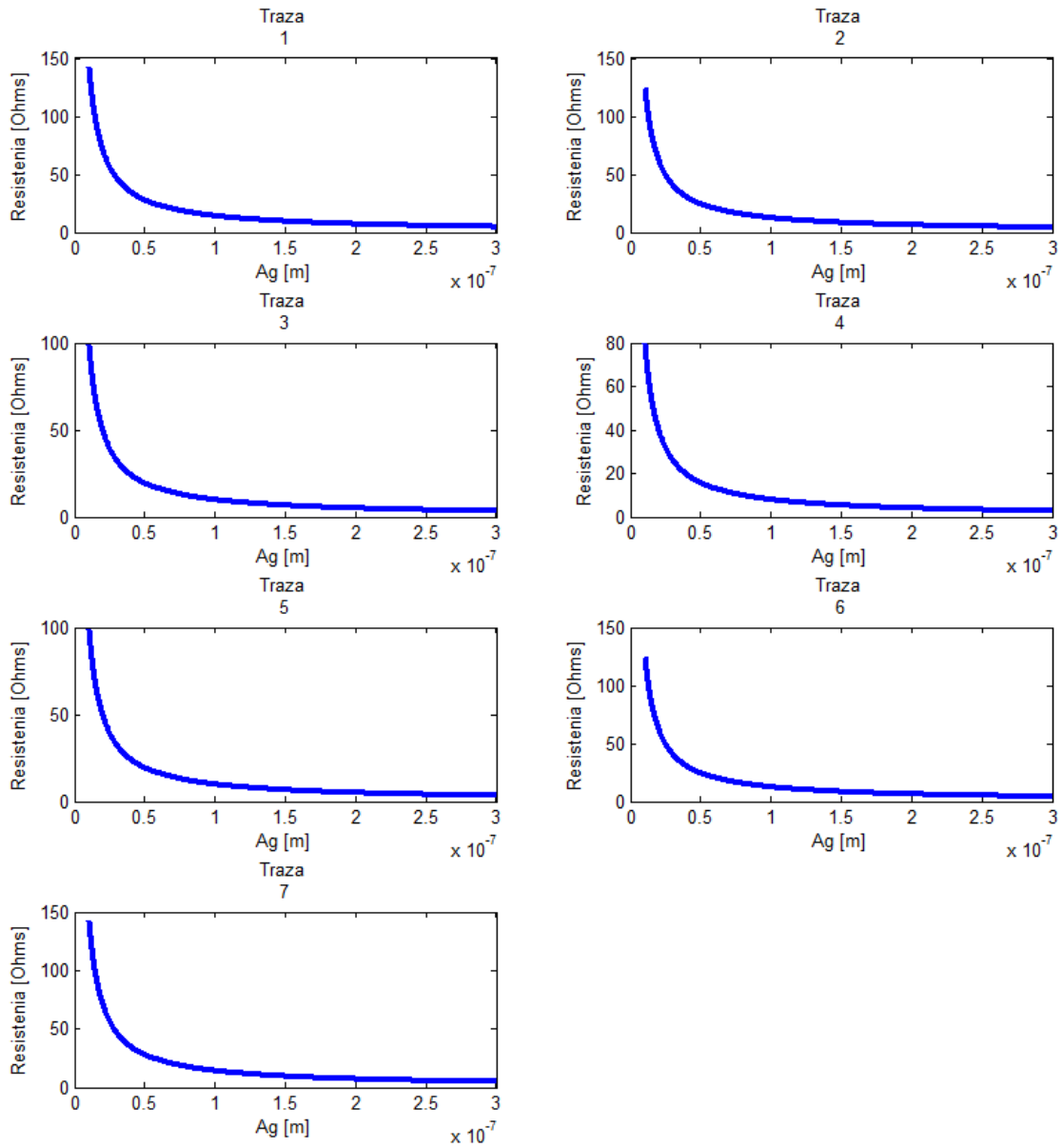


Figura A 2. Grosor de la capa de plata vs resistencia de las trazas conductivas para cada traza.

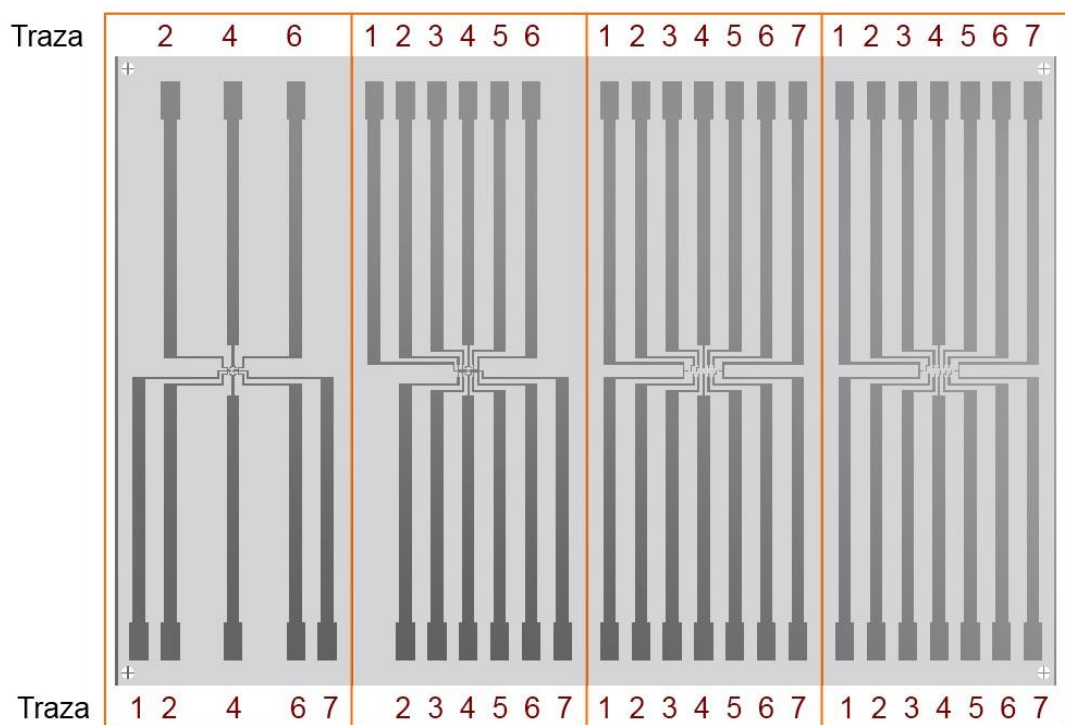


Figura A 3. Identificadores del tipo de traza conductora empleada en cada diseño de micro electrodos.

Tabla XXIII: Resistencia eléctrica de cada traza conductiva, calculadas a partir de un deposito de plata de 140 [nm] de grosor.

Traza	Resistencia [Ω]
1	8.928
2	7.851
3	6.208
4	5.021
5	6.208
6	7.851
7	8.928

Anexo 10: Identificadores de electrodos

A continuación se presentan los identificadores que distinguen a cada electrodo de los arreglos propuestos.

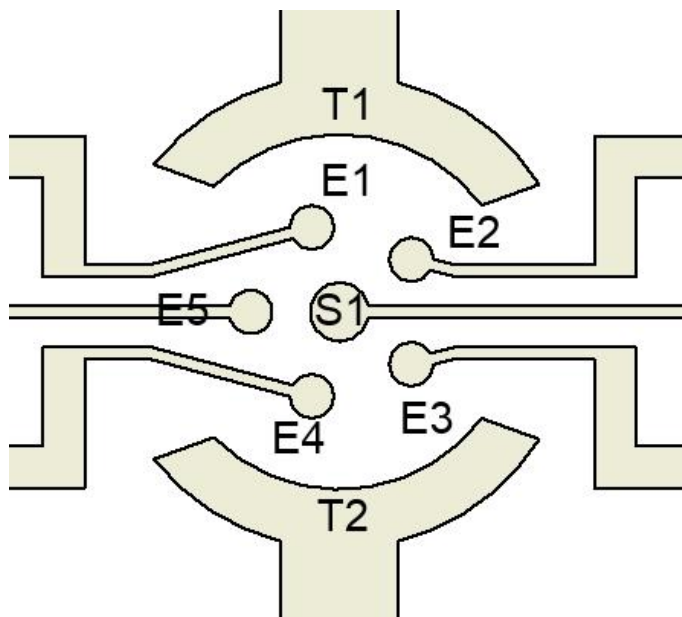


Figura A 4. Identificadores del diseño 1.

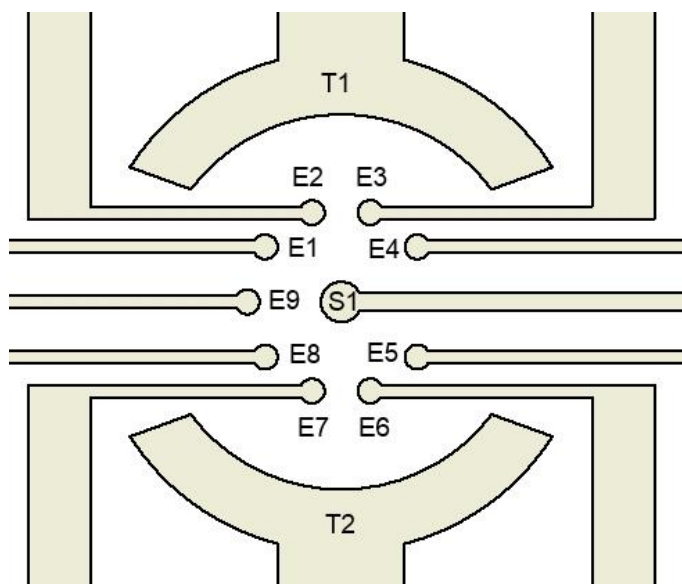


Figura A 5. Identificadores del diseño 2.

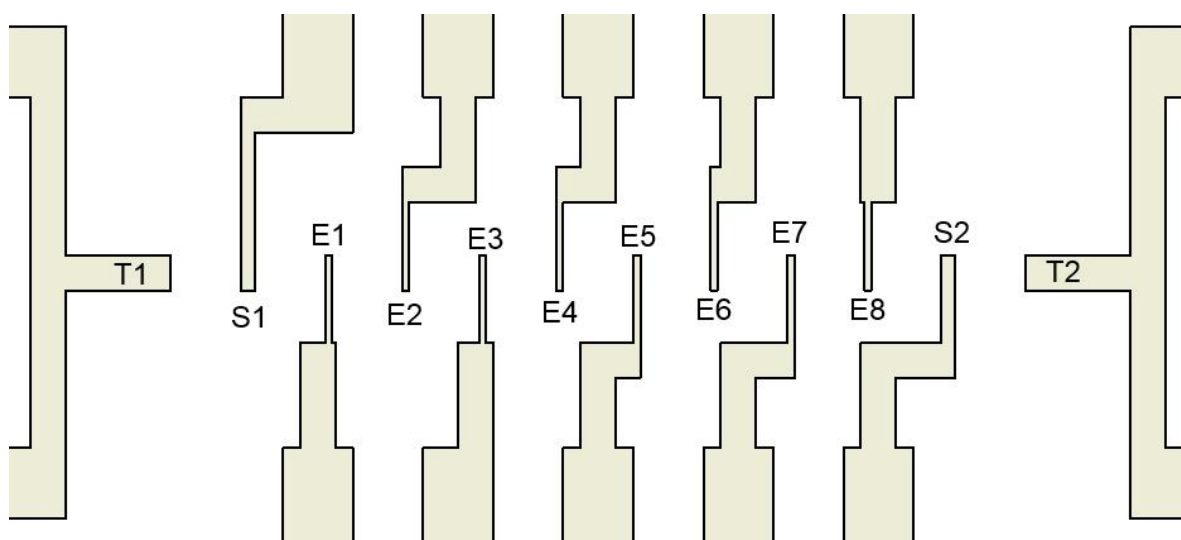


Figura A 6. Identificadores del diseño 3.

Referencias

- [1] University of Utah, “*Genetic Science Learning Center*” 2013. [Online]. Available: <http://learn.genetics.utah.edu/content/begin/cells/scale/>. [Accessed: 18-Sep-2013].
- [2] R. Sherman-Gold, “*The Axon Guide*,” *Axon Instruments*, no. 2500. pp. 1–4, 8–16, 1993.
- [3] M. Kutz, “*Biomedical Engineering and design Handbook*”, 2nd ed. Mc Graw Hill, 2009, pp. 481–504.
- [4] S. S. Demir, “Electrophysiology” *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation*. pp. 141–149, 2006.
- [5] E. E. W. K. Young and D. J. D. Beebe, “Fundamentals of microfluidic cell culture in controlled microenvironments” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, no. 3, pp. 1036–48, Mar. 2010.
- [6] G. M. Whitesides, “The origins and the future of microfluidics” *Nature*, vol. 442, no. 7101, pp. 368–373.
- [7] G. M. Whitesides, E. Ostuni, S. Takayama, X. Jiang, and D. E. Ingber, “Soft lithography in biology and biochemistry” *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 3, pp. 335–73, Jan. 2001.
- [8] T. M. Folch A, A. Folch, and M. Toner, “Microengineering of cellular interactions” *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, no. 2, pp. 227–56, 2000.
- [9] Voldman J, Gray ML, Schmidt MA, “Microfabrication in biology and medicine,” *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, no. 1, pp. 401–25, 1999.
- [10] J. K. El-Ali J, Sorger PK, “Cells on chips,” *Nature*, pp. 442:403–11, 2006.
- [11] I. Meyvantsson, D. J. Beebe, and I. Meyvantsson and D. J. Beebe, “Cell culture models in microfluidic systems,” *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto. Calif.)*, vol. 1, no. 1, pp. 423–49, Jan. 2008.
- [12] D. Huh, Y. Torisawa, G. a Hamilton, H. J. Kim, and D. E. Ingber, “Microengineered physiological biomimicry: organs-on-chips,” *Lab Chip*, vol. 12, no. 12, pp. 2156–64, Jun. 2012.
- [13] J.-H. Kim, K.-H. Na, C. J. Kang, and Y.-S. Kim, “A disposable thermopneumatic-actuated micropump stacked with PDMS layers and ITO-coated glass,” *Sensors Actuators A Phys.*, vol. 120, no. 2, pp. 365–369, May 2005.

- [14] C. Simmons, B. Petzold, and B. Pruitt, "Microsystems for biomimetic stimulation of cardiac cells," *Lab Chip*, vol. 12, no. 18, pp. 3235–48, Oct. 2012.
- [15] P. Gomes, "Electric field stimulation of cardiac myocytes during postnatal development," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 48, no. 6, pp. 630–636, 2001.
- [16] N. Tandon, C. Cannizzaro, P.-H. G. Chao, R. Maidhof, A. Marsano, H. T. H. Au, M. Radisic, and G. Vunjak-Novakovic, "Electrical stimulation systems for cardiac tissue engineering," *Nat. Protoc.*, vol. 4, no. 2, pp. 155–73, Jan. 2009.
- [17] N. Klauke, G. Smith, and J. Cooper, "Stimulation of single isolated adult ventricular myocytes within a low volume using a planar microelectrode array," *Biophys. J.*, vol. 85, no. 3, pp. 1766–1774, 2003.
- [18] N. P.- D'hahan, "Live Cell Analysis: When Electric Detection Interfaces Microfluidics," *J. Biochips Tissue Chips*, vol. 01, no. 01, pp. 1–9, 2011.
- [19] M. Maghnbi, J. Hamilton, D. Polla, T. Wilson, P. Krulevitch, and M. Maghribi, "Stretchable Micro-Electrode Array," in *IEEE-EMBS Special Topic Conference on Microtechnologies in Medicine & Biology*, 2002, pp. 80–83.
- [20] M. Khraiche and J. Muthuswamy, "Multi-modal biochip for simultaneous, real-time measurement of adhesion and electrical activity of neurons in culture," *Lab Chip*, vol. 12, no. 16, pp. 2930–41, Aug. 2012.
- [21] E. McAdams, "Bioelectrodes," *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation*. pp. 120 – 166, 2006.
- [22] R. L. Miller, W. L. Brandford, and N. E. Peters, "Specific Conductance: Theoretical Considerations and Application to Analytical Quality Control," 1988.
- [23] D. Pethybridge, J. D. R. Talbot, and W. House, "Precise Conductance Measurements on Dilute Aqueous Solutions of Sodium and Potassium Hydrogenphosphate and Dihydrogenphosphate," *J. Solution Chem.*, vol. 35, no. 3, pp. 381–393, May 2006.
- [24] E. N. Tsurko, R. Neueder, J. Barthel, and A. Apelblat, "Conductivity of Phosphoric Acid , Sodium , Potassium , and Ammonium Phosphates in Dilute Aqueous Solutions from 278 . 15 K to 308 . 15 K," vol. 28, no. 8, 1999.
- [25] J. Bockris and A. Reddy, *Electroquímica moderna*. Reverte, 1979, pp. 4–43, 359–382.
- [26] E. Gongadze, S. Petersen, U. Beck, and U. Van Rienen, "Classical Models of the Interface between an Electrode and an Electrolyte," in *COMSOL Conference*, 2009.

- [27] J. Newman, "Resistance for flow of current to a disk," *J. Electrochem. Soc.*, pp. 11–12, 1966.
- [28] P. Olivarez, "Caracterización de un microsensor por espectroscopia electroquímica de impedancia," *Rev. Mex. Ing. Biomédica*, no. 461, pp. 110–120, 2007.
- [29] A. Lasia, "Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications," *Mod. Asp. Electrochem.*, vol. 32, pp. 143–248, 2002.
- [30] N. Ramírez, A. Regueiro, O. Arias, and R. Contreras, "Espectroscopía de impedancia electroquímica, herramienta eficaz para el diagnóstico rápido microbiológico," *Biotechnol. Apl.*, vol. 31, no. 2, 2009.
- [31] E. Berthier, E. E. W. K. Young, and D. Beebe, "Engineers are from PDMS-land, Biologists are from Polystyrenia.," *Lab Chip*, vol. 12, no. 7, pp. 1224–37, Apr. 2012.
- [32] J. Wang, B. Feng, and W. Wu, "Conductive-carbon-black filled PDMS chemiresistor sensor for the detection of volatile organic compounds," *2011 6th IEEE Int. Conf. Nano/Micro Eng. Mol. Syst.*, pp. 449–452, Feb. 2011.
- [33] J. Gawron, R. S. Martin, and S. M. Lunte, "Fabrication and evaluation of a carbon-based dual-electrode detector for poly(dimethylsiloxane) electrophoresis chips.," *Electrophoresis*, vol. 22, no. 2, pp. 242–8, Jan. 2001.
- [34] J. C. Agar, J. Durden, R. Zhang, D. Staiculescu, E. Gebara, and C. Wong, "Electrically conductive silicone nano-composites for stretchable RF devices," *2011 IEEE MTT-S Int. Microw. Symp.*, pp. 1–1, Jun. 2011.
- [35] H. Cong and T. Pan, "Microfabrication of conductive PDMS on flexible substrates for biomedical applications," *2009 4th IEEE Int. Conf. Nano/Micro Eng. Mol. Syst.*, pp. 731–734, 2009.
- [36] A. T. Sepúlveda, A. J. Pontes, and J. C. Viana, "Flexible sensor for blood pressure measurement," *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, vol. 2011, pp. 512–5, Jan. 2011.
- [37] Q. Xu, L. Bi, H. Zheng, D. Fan, and W. Wang, "PDMS-based gold electrode for sensing ascorbic acid.," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 88, no. 1, pp. 362–5, Nov. 2011.
- [38] J. Zhou, K. Ren, Y. Zheng, J. Su, Y. Zhao, D. Ryan, and H. Wu, "Fabrication of a microfluidic Ag/AgCl reference electrode and its application for portable and disposable electrochemical microchips.," *Electrophoresis*, vol. 31, no. 18, pp. 3083–9, Sep. 2010.
- [39] L. Cromwell, *Biomedical Instrumentation and Measurements*. Prentice-Hall, 1980.

- [40] T. Gray, "Electrical Conductivity of the Elements," 2013. [Online]. Available: <http://periodictable.com/Properties/A/ElectricalConductivity.html>. [Accessed: 03-Dec-2013].
- [41] H.-S. Chuang and S. Wereley, "Design, fabrication and characterization of a conducting PDMS for microheaters and temperature sensors," *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 19, no. 4, pp. 1–7, Apr. 2009.
- [42] M. S. Fernandes, K. S. Lee, R. J. Ram, J. H. Correia, and P. M. Mendes, "Flexible PDMS -based dry electrodes for electro-optic acquisition of ECG signals in wearable devices.," *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, vol. 2010, pp. 3503–6, Jan. 2010.
- [43] J. Agar, K. Lin, and R. Zhang, "Novel PDMS (silicone)-in-PDMS (silicone): Low cost flexible electronics without metallization," in *Electronic Components and Technology Conference*, 2010, pp. 1226–1230.
- [44] X. Z. Niu, S. L. Peng, L. Y. Liu, W. J. Wen, and P. Sheng, "Characterizing and Patterning of PDMS-Based Conducting Composites," *Adv. Mater.*, vol. 19, no. 18, pp. 2682–2686, Sep. 2007.
- [45] J. Engel, J. Chen, and N. Chen, "Multi-Walled Carbon Nanotube Filled Conductive Elastomers: Materials and Application to Micro Transducers," *Micro Electro ...*, no. 22–26 January, pp. 246–249, 2006.
- [46] J. G. Webster and D. Beebe, *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation Vol 1*, vol. 1. 2006, pp. 120–145.
- [47] David A. Borkholder, "Cell Based Biosensors Using Microelectrodes," Stanford, 1998.
- [48] F. Chollet, "MEMScyclopedia," 1999. [Online]. Available: <http://memscyclopedia.org/su8.html>. [Accessed: 20-Jan-2014].
- [49] R. Pal, K. Ananthasivan, S. Anthonysamy, and V. Ganesan, "Development and electrochemistry of a novel Ag/AgCl reference electrode suitable for mixed chloride–fluoride melts," *Electrochim. Acta*, vol. 56, no. 11, pp. 4276–4280, Apr. 2011.
- [50] V. P. Connaughton and G. Maguire, "Differential expression of voltage-gated K⁺ and Ca²⁺ currents in bipolar cells in the zebrafish retinal slice.," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 10, no. 4, pp. 1350–62, Apr. 1998.