

Plataforma Multisensorial para Medidas Electroquímicas de Oxígeno Disuelto, pH, Na⁺ y K⁺ en Aplicaciones Biomédicas

A. Moya^{1,3}, X. Illa^{1,3}, N. Zine², E. Prats-Alfonso^{1,3}, G. Gabriel^{1,3}, A. Errachid², R. Villa^{1,3}

¹ Instituto de Microelectrónica de Barcelona, IMB-CNM (CSIC), Esfera UAB, Barcelona, España
{ana.moya, xavier.illa, elisabet.prats, gemma.gabriel, rosa.villa}@imb-cnm.csic.es

² Institut des Sciences Analytiques (ISA), Université Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, UMR 5280, Lyon, Francia
{nadia.zine, abdelhamid.errachid}@univ-lyon1.fr

³ Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), España

Resumen

En este trabajo se presenta una plataforma multisensorial fabricada en sustrato de poliamida usando materiales de bajo coste y técnicas de fotolitografía y rápido prototipado. La plataforma integra una matriz de microelectrodos de diversos tamaños para la realización de medidas electroquímicas de oxígeno disuelto (OD), Na⁺, K⁺ y pH. El sistema permite la monitorización de manera continua, simultánea y en tiempo real, de dichos parámetros para aplicaciones biomédicas. La plataforma integra 10 electrodos de trabajo (WE), varios electrodos que hacen la función de pseudo-referencia (pRE) y un electrodo auxiliar (CE). La respuesta de la plataforma con los distintos sensores es evaluada en condiciones in-vitro en términos de sensibilidad, límite de detección, tiempo de respuesta y tiempo de vida.

1. Motivación

El objetivo de este trabajo se basa en la integración de sensores de Oxígeno Disuelto (OD), Na⁺, K⁺ y pH en una misma plataforma para poder realizar medidas simultaneas y en tiempo real de los diferentes parámetros, los cuales son comúnmente requeridos en un amplio rango de aplicaciones biomédicas para determinar la actividad celular. La plataforma está fabricada con materiales de bajo coste usando como sustrato la poliamida Kapton[®] y mediante técnicas de prototipado rápido. La detección de Na⁺, K⁺ y pH se realiza mediante microelectrodos selectivos a iones (μ ISE) por técnicas de potenciometría, mientras que la medida del OD se realiza por amperometría. La modularidad y versatilidad de la plataforma le permite ser conectada a la entrada y salida de cualquier cámara de cultivo celular evitando interferir con el mismo.

2. Introducción

Los dispositivos conocidos como Lab-On-a-Chip (LOC) son hoy en día una novedosa herramienta que tienen como reto integrar diferentes funciones propias de un laboratorio en un único chip, de reducidas dimensiones y fabricado con nuevos materiales y tecnologías. El uso de estos sistemas permite la medida de importantes parámetros metabólicos de cultivos celulares para el diagnóstico en tiempo real y de manera no invasiva, con reducido consumo de flujo [1]. En la última década ha cobrado importancia el desarrollo de diversas plataformas multisensoriales para la detección simultánea de

parámetros de cultivos celulares como son, por ejemplo, el LOC de medidas de óxido nítrico y peróxido [2], o el LOC que integra sensores de pH, OD y glucosa [1]. La relevancia que aporta nuestra plataforma, por un lado, es su completa fabricación usando materiales de bajo coste. Los dispositivos biosensoriales basados en sustratos flexibles, como son el Cyclo Olefin Polymer (COP) y la película de poliamida (Kapton[®]), están cobrando importancia en las últimas décadas debido a su bajo coste y alta biocompatibilidad, con una alta estabilidad térmica y mecánica, alta resistencia química y bajas constantes dieléctricas [3]. Por otro lado, es la primera vez que se realizan medidas simultáneas de OD, pH, Na⁺ y K⁺ en la misma plataforma, parámetros que son de vital importancia para conocer la actividad de un cultivo celular. Es por ello que en este trabajo se ha llevado a cabo el desarrollo de una plataforma microfluídica de poliamida para la monitorización dinámica en tiempo real de parámetros de cultivos celulares usando sensores electroquímicos. Los cuatro tipos de sensores han sido completamente desarrollados y caracterizados en condiciones estáticas y de manera in-vitro como prueba de concepto en este trabajo preliminar.

3. Plataforma multisensorial

3.1. Diseño versátil

La plataforma multisensorial incorpora un total de 20 microelectrodos rectangulares entre los que se encuentran 10 electrodos de trabajo (WE), 10 electrodos de pseudo-referencia (pRE) y 1 electrodo auxiliar (CE) (Figura 1a). En particular, hay cinco pares duplicados de WE de diferente ancho (50 μ m, 100 μ m, 200 μ m, 500 μ m y 1000 μ m). Cada pareja de electrodos incorpora dos posibles pRE de 100 μ m de ancho. El electrodo de mayores dimensiones (1000 μ m) se usa como CE. Este diseño dota a la plataforma de una gran versatilidad permitiendo al usuario la elección de la mejor combinación de electrodos requerida para las diferentes medidas electroquímicas según la aplicación biomédica.

3.2. Fabricación y encapsulado

La plataforma multisensorial ha sido fabricada usando materiales de bajo coste. Se han utilizado dos sustratos flexibles para su fabricación (COP y Kapton[®]), pero finalmente los experimentales fueron realizados en la

plataforma fabricada en la poliamida Kapton® (500HN, DuPont) debido a su compatibilidad con el tetrahidrofurano (THF), disolvente usado en el proceso de desarrollo de las membranas selectivas a iones de Na^+ , K^+ y pH. Para su fabricación se han usado técnicas de litografía estándar. En [3] se reporta el proceso completo de fabricación de una plataforma sensorial en COP, el mismo proceso seguido para la fabricación de la plataforma de Kapton®. En resumen, primero se depositó una capa de Ti (10 nm) para hacer de adherente entre el sustrato y el oro. Posteriormente, se depositó una segunda capa de Au (100 nm) dibujando los electrodos, pistas y contactos (Figura 1b). El área activa de los electrodos, así como el canal de microfluídica y la zona de los contactos, fue definida usando un adhesivo sensitivo a la presión (PSA), evitando así la etapa de pasivación y reduciendo los costes y el tiempo de fabricación (Figura 1c). El uso de PSA permite a su vez controlar la altura del canal para las medidas en dinámico, que en esta plataforma es de 180 μm . Por último, para cerrar el canal, se usó una lámina de COP debido a su transparencia óptica, permitiendo observar lo que sucede dentro del canal. Para encapsular la plataforma multisensorial se ha diseñado y desarrollado un soporte hecho en metacrilato que se usa para hacer más fácil la manipulación del sensor, permitiendo así el acceso al canal de microfluídica y a los contactos de conexión. Este encapsulado permite situar y cambiar el sensor con facilidad y puede ser reutilizado para diversos experimentales. La conexión con los contactos se realiza usando un conector de base de cero fuerza (ZIF). Con este sistema de encapsulado se evita usar el método de *wire-bonding*, reduciendo el coste por sensor y el tiempo de encapsulación.

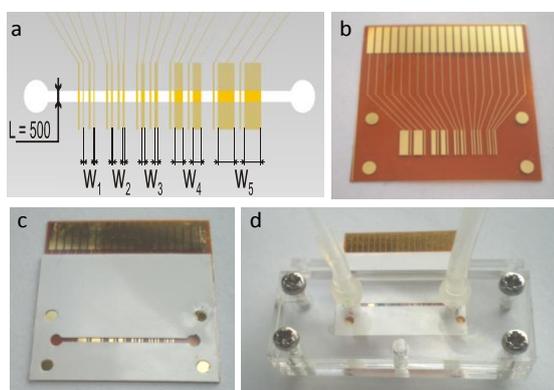


Figura 1. (a) Diseño de la plataforma multisensorial con los cinco pares de electrodos de diferentes anchos ($W = 50 \mu\text{m}$, $100 \mu\text{m}$, $200 \mu\text{m}$, $500 \mu\text{m}$ y $1000 \mu\text{m}$). La plataforma incorpora varios pRE ($W = 100 \mu\text{m}$) y un CE ($W = 1000 \mu\text{m}$), (b) Plataforma multisensorial fabricada sobre poliamida Kapton®, con unas dimensiones totales de $21 \times 21 \text{ mm}$, (c) Definición del área activa de los electrodos, contactos y canal de microfluídica usando PSA, (d) Encapsulado final usando un soporte de metacrilato.

3.3 Activación y caracterización de los electrodos

Antes del desarrollo de cada uno de los sensores, es necesario caracterizar el funcionamiento de la plataforma y estudiar la respuesta de los electrodos tanto en condiciones estáticas como en dinámicas. Primeramente

se realizó el proceso de limpieza y activación de los electrodos sumergiéndolos en etanol y aplicando ultrasonidos durante cinco minutos para limpiar las partículas orgánicas que pudiese haber sobre la superficie, y seguidamente se activaron electroquímicamente sumergiéndolos en una solución de nitrato de potasio (KNO_3) 0.1 M y aplicando pulsos alternando entre -2 V y 0 V repetidos durante cinco ciclos. La comprobación del estado de activación de los electrodos, tanto en condiciones estáticas como dinámicas, se realizó mediante voltametría cíclica (CV) en una solución de ferro/ferricianuro (10 mM). La caracterización se realizó para cada uno de los diferentes WE, usando el CE y el pRE integrados en la misma plataforma. La Figura 2 muestra los resultados de las CV registradas para las diferentes condiciones probadas. En la Figura 2a se muestran las CV en condiciones estáticas para los cinco WE de diferente ancho a una velocidad de barrido de 100 mV/s. Las corrientes de pico experimentales obtenidas en las CV han sido comparadas con las predichas por Randles-Sevcik [4] (Figura 2b). La Figura 2c muestra las CV registradas para los diferentes WE a una velocidad de flujo constante de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Las CV en dinámico muestran que los valores de corriente crecen al incrementar las velocidades de flujo. Este comportamiento es el esperado considerando un flujo laminar dentro de un microcanal. Las corrientes medidas fueron comparadas con las predichas por la ecuación descrita por Levich [5] (Figura 2d). Estos resultados corroboran el buen funcionamiento de los electrodos tanto en condiciones estáticas como dinámicas.

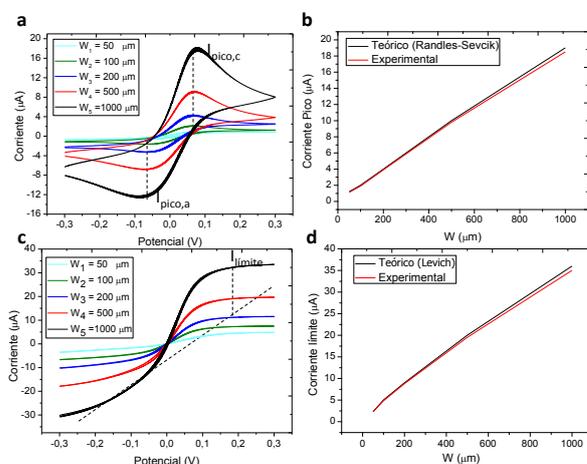


Figura 2. (a) CV en ferro/ferricianuro (10 mM) para diferentes WE a una velocidad de barrido de 100 mV/s en condiciones estáticas, (b) Comparación de las corriente de pico experimentales con la ecuación teórica de Randles-Sevcik, (c) CV de diferentes WE en condiciones dinámicas para una velocidad de flujo de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ y (d) Comparación de las corrientes límite experimentales con la ecuación teórica de Levich.

4. Desarrollo y calibración de los sensores

4.1 Integración de la pseudo-referencia de Ag/AgCl

Para poder realizar medias de manera continuada en experimentales de larga duración, es necesario disponer de un electrodo de referencia estable, como son los de

Ag/AgCl. Es por ello que se han integrado varios pRE de Ag/AgCl en la plataforma multisensorial. El método usado está descrito en [6]. En resumen, el pRE fue fabricada mediante la electrodeposición de una solución de AgNO_3 (25 mM) + NaNO_3 (1 M) sobre la superficie de los electrodos aplicando CV desde 0.3 V a -0.5 V con una velocidad de barrido de 30 mV/s. Una vez depositada la capa de Ag, ésta fue cloronizada sumergiendo los electrodos en una solución de HCl (1 M) durante toda noche a temperatura ambiente. El potencial de cada pRE se ha registrado durante 24 h usando una solución de KCl (3 M). Los electrodos presentaron una buena estabilidad, con una derivada de potencia inferior a 0.11 mV/h.

4.2. Sensor de Oxígeno Disuelto

La medida de concentración de OD se realiza mediante la técnica de amperometría. Los sensores tipo Clark son los más comunes en este tipo de medidas y son ampliamente usados en el campo de la biomedicina y el medio ambiente [7] y [8]. Su principio de funcionamiento se basa en aplicar un potencial de polarización en el WE, registrando la corriente de reducción generada sobre éste la cual es directamente proporcional a la concentración de OD en la solución [9]. Estas medidas se realizan usando un sistema de tres electrodos: WE, RE y CE. En nuestra plataforma multisensorial, el electrodo de menores dimensiones, 50 μm , se usó como WE, el primer electrodo que se encuentra a la entrada del canal fue usado como pRE y el de mayores dimensiones como CE. Para realizar este tipo de medidas es necesario activar el WE. La calibración del sensor se realizó en el rango de concentración de oxígeno entre 0 y 8 mg/L. Estos valores de concentración fueron ajustados mediante el burbujeo de diferentes cantidades de nitrógeno y aire en una solución de 0.1 M KNO_3 . Para poder controlar la concentración de oxígeno en la solución y poder correlacionar los valores de OD con las corrientes de reducción medidas, se usó una sonda de oxígeno comercial OXI-325 de WTW. El potencial de reducción aplicado fue de -0.85 V. Un potencioestado 1030A de CH Instruments fue usado para el registro de las medidas amperométricas. Se realizaron medidas de diez niveles diferentes de concentración de OD para realizar la curva de calibración, dando por resultado una sensibilidad de $5.20 \text{ nA/mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el rango entre 0 – 8 mg/L y con un coeficiente de correlación de 0.986. La Tabla 1 muestra el resumen de las características de cada sensor comparándolas con las de los sensores Clark de Unisens.

4.3. Sensores selectivos a iones de Na^+ , K^+ y H^+

Las medidas de las variaciones de Na^+ , K^+ y pH se realizaron mediante la técnica de la potenciometría usando membranas sensitivas a iones. La primera etapa para preparar estos μISE fue la electrodeposición de una capa de polipirrol electropolimerizado (PPy) en presencia del ion Cobaltabis(discarbollide) ($[\text{3.3}^-\text{Co}(\text{1,2-C}_2\text{B}_9\text{H}_{11})_2]$) [10]. La alta resistencia a la oxidación y alta conductividad que presenta el Cobaltabis(discarbollide) representa una gran mejora en términos de la estabilidad y la transferencia iónica del sensor. La capa de PPy fue electrodepositada aplicando 10 CV entre -0.2 V y 1 V, a una velocidad de barrido de 100 mV/s. Una vez

electrodepositada la capa de PPy, se prepararon las membranas de policloruro de vinilo (PVC) con cada ionóforo comercial específico para la detección de los diferentes cationes. Las membranas fueron preparadas usando diferentes plastificantes para estudiar la respuesta de cada uno, ya que se usa como disolvente mediador e influye en la respuesta de las membranas en términos de constante dieléctrica y movilidad de las moléculas del ionóforo [11][12] y [13]. La composición usada para preparar las membranas fue la siguiente: 1% ionóforo comercial (Hidrógeno ionóforo I, Sodio ionóforo X, Potasio ionóforo I, de Fluka), 33 % PVC, 65.5 % de plastificante (DBP, DOS o o_NPOE) y 0.5 % de potasio terakis(4chlorophenyl)borate. Todos estos componentes fueron mezclados en 5 mL de THF y 0.5 mL de cloroformo [11], [12] y [13]. La mezcla preparada se depositó manualmente sobre los electrodos y el disolvente se dejó evaporar durante toda la noche a temperatura ambiente. La figura 3 muestra la imagen de microscopio de la plataforma con todos los sensores integrados, así como las imágenes SEM del pRE, la capa de PPy y una de las membranas de PVC.

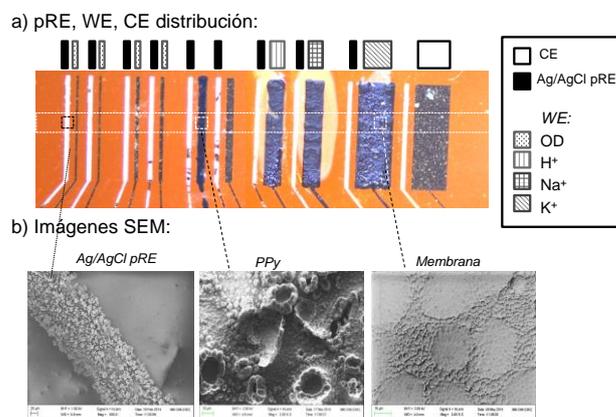


Figura 3. (a) Imagen de la plataforma multisensorial después del desarrollo de cada microsensors. Incorpora 10 pRE de Ag/AgCl, 4 electrodos de trabajo para la medidas de OD, Na^+ , K^+ y pH y un CE. (b) Imágenes SEM de un pRE, una capa de PPy y una membrana sensitiva a iones.

Una vez preparado cada μISE se realizó su calibración en condiciones estáticas y haciendo uso de una referencia externa para validar el funcionamiento de cada sensor. De cada tipo de μISE se estudió la sensibilidad, rango de medida lineal, límite de detección, tiempo de respuesta y tiempo de vida. Estos resultados se muestran en la Tabla 1 donde también se comparan con las características de algunos sensores comerciales. En resumen, las membranas de sodio mostraron una mejor respuesta usando el plastificante DBP, con una respuesta lineal a la actividad de variaciones de Na^+ en el rango comprendido entre $1\cdot 10^{-5}$ M y $1\cdot 10^{-1}$ M con una sensibilidad de 55.19 mV/década de Na^+ y un coeficiente de correlación de 0.999. El límite de detección fue de $5\cdot 10^{-7}$ M y el tiempo de respuesta inferior a 5 s. Su tiempo respuesta es menor a los comerciales y a la mayoría de los reportados hasta el momento [12]. Para los μISE de potasio, su mejor respuesta se obtuvo usando el plastificante DOS, con una respuesta lineal en el rango comprendido entre $8\cdot 10^{-5}$ M y $1\cdot 10^{-1}$ M, una sensibilidad de 50.98 mV/década de K^+ y

un coeficiente de correlación de 0.994. El límite de detección fue de $0.5 \cdot 10^{-5}$ M y el tiempo de respuesta inferior a 5 s, que vuelve a ser casi 3 veces inferior al sensor comercial y a otros reportados con anterioridad [13]. Por último, las membranas de hidrógeno fueron preparadas usando el plastificante o_NPOE. Presentaron una respuesta lineal en el rango comprendido entre pH 3 y pH 9, con una sensibilidad de 60.70 mV/década de pH y un coeficiente de correlación de 0.995. El límite de detección fue de pH 3. Todos los sensores presentaron un tiempo de vida superior a 3 meses.

	Sensibilidad	Rango Lineal	Límite de detección	Tiempo respuesta
OD	5.20 nA/mgL ⁻¹	0-8 mg/L	0.04 mg/L	< 10 s
OD_{Unisense}		0-8 mg/L	0.01 mg/L	1- 3 s
Na⁺	57.33 mV/ pNa ⁺	1·10 ⁻⁵ - 1·10 ⁻¹ M	5·10 ⁻⁷ M	< 5 s
Na⁺_{Crison}	55±4 mV/ pNa ⁺	4·10 ⁻⁵ - 0.8·10 ⁻¹ M	2·10 ⁻⁶ M	< 14 s
K⁺	51.19 mV/ pK ⁺	8·10 ⁻⁵ - 1·10 ⁻¹ M	0.5·10 ⁻⁵ M	< 5 s
K⁺_{Crison}	55±4 mV/ pK ⁺	2·10 ⁻⁵ - 1 M	1·10 ⁻⁵ M	< 14 s
pH	60.70 mV/ pH ⁺	pH 3 - 9	pH 3	< 5 s
pH_{Crison}	59 mV/ pH ⁺	pH 1 - 11	pH 1	< 20 s

Tabla 1. Resumen de las principales características de cada biosensor: OD, Na⁺, K⁺ y pH, comparándolas con las de sensores comerciales.

5. Conclusiones y trabajo futuro

En este trabajo se ha presentado la fabricación y caracterización de una plataforma multisensorial de bajo coste, que incorpora sensores electroquímicos para la medida de OD, Na⁺, K⁺ y pH simultáneamente y de manera continuada, para ser usada en un amplio rango de aplicaciones biomédicas. Los resultados muestran que los microelectrodos de oro integrados en la plataforma de poliamida Kapton[®] presentan una buena respuesta tanto en estático como en dinámico después de su limpieza y activación electroquímica. Cada sensor se ha caracterizado de manera individual en condiciones in-vitro presentando una buena sensibilidad con un amplio rango de respuesta lineal, con bajos límites de detección y sobre todo rápidos tiempos de respuesta. El uso del PPy como capa de contacto entre los microelectrodos y las membranas presentó una buena respuesta con una alta estabilidad. La respuesta de los μ ISE usando el pRE integrada así como la caracterización en condiciones dinámicas está siendo estudiada y se presentarán en un trabajo futuro.

Agradecimientos

Este trabajo se enmarca dentro del proyecto DPI2011-28262-C04, financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (España), y de los proyectos europeos: SensorART_IP (N°248763), SMARTCANCERSENS (N°318053) y SPS (NUKP.SFPP984173) NATO. A. M. agradece a su beca pre-doctoral FPI-2012 que financia sus

estudios de doctorado en la Universidad Autónoma de Barcelona.

Referencias

- [1] A. Weltin, K. Slotwinski, J. Kieninger, I. Moser, G. Jobst, M. Wego, R. Ehret, and G. A. Urban, "Cell culture monitoring for drug screening and cancer research: a transparent, microfluidic, multi-sensor microsystem," *Lab. Chip*, vol. 14, no. 1, pp. 138–146, Nov. 2013.
- [2] D. Quinton, A. Girard, L. T. T. Kim, V. Raimbault, L. Griscom, F. Razan, S. Griveau, and F. Bedioui, "On-chip multi-electrochemical sensor array platform for simultaneous screening of nitric oxide and peroxynitrite," *Lab. Chip*, vol. 11, no. 7, pp. 1342–1350, Apr. 2011.
- [3] X. Illa, O. Ordeig, D. Snakenborg, A. Romano-Rodríguez, R. G. Compton, and J. P. Kutter, "A cyclo olefin polymer microfluidic chip with integrated gold microelectrodes for aqueous and non-aqueous electrochemistry," *Lab. Chip*, vol. 10, no. 10, pp. 1254–1261, May 2010.
- [4] D. C. Johnson, "Analytical electrochemistry: theory and instrumentation of dynamic techniques," *Anal. Chem.*, vol. 52, no. 5, p. 131R–138R, Apr. 1980.
- [5] R. G. Compton, A. C. Fisher, R. G. Wellington, P. J. Dobson, and P. A. Leigh, "Hydrodynamic voltammetry with microelectrodes: channel microband electrodes; theory and experiment," *J. Phys. Chem.*, vol. 97, no. 40, pp. 10410–10415, Oct. 1993.
- [6] A. Baraket, M. Lee, N. Zine, M. Sigaud, N. Yaakoubi, M. G. Trivella, M. Zabala, J. Bausells, N. Jaffrezic-Renault, and A. Errachid, "Diazonium modified gold microelectrodes onto polyimide substrates for impedimetric cytokine detection with an integrated Ag/AgCl reference electrode," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 189, pp. 165–172, Dec. 2013.
- [7] L. C. Clark, R. Wolf, D. Granger, and Z. Taylor, "Continuous Recording of Blood Oxygen Tensions by Polarography," *J. Appl. Physiol.*, vol. 6, no. 3, pp. 189–193, Sep. 1953.
- [8] X. Guimerà, A. Moya, A. D. Dorado, R. Villa, D. Gabriel, G. Gabriel, and X. Gamisans, "Biofilm dynamics characterization using a novel DO-MEA sensor: mass transport and biokinetics," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, May 2014.
- [9] A. Moya, X. Guimerà, F. J. del Campo, E. Prats-Alfonso, A. D. Dorado, M. Baeza, R. Villa, D. Gabriel, X. Gamisans and G. Gabriel, "Profiling of oxygen in biofilms using individually addressable disk microelectrodes on a microfabricated needle," *Microchimica Acta*, Accepted.
- [10] C. Masalles, F. Teixidor, S. Borrós, and C. Viñas, "Cobaltabisdicarbollide anion [Co(C2B9H11)2]– as doping agent on intelligent membranes for ion capture," *J. Organomet. Chem.*, vol. 657, no. 1–2, pp. 239–246, Sep. 2002.
- [11] N. Zine, J. Bausells, F. Teixidor, C. Viñas, C. Masalles, J. Samitier, and A. Errachid, "All-solid-state hydrogen sensing microelectrodes based on novel PPy[3,3'-Co(1,2-C2B9H11)2] as a solid internal contact," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 26, no. 2–3, pp. 399–404, Mar. 2006.
- [12] I. A. M. de Oliveira, D. Risco, F. Vocanson, E. Crespo, F. Teixidor, N. Zine, J. Bausells, J. Samitier, and A. Errachid, "Sodium ion sensitive microelectrode based on a p-tert-butylcalix[4]arene ethyl ester," *Sens. Actuators B-Chem.*, vol. 130, no. 1, pp. 295–299, Mar. 2008.
- [13] N. Zine, J. Bausells, F. Vocanson, R. Lamartine, Z. Asfari, F. Teixidor, E. Crespo, I. A. M. de Oliveira, J. Samitier, and A. Errachid, "Potassium-ion selective solid contact microelectrode based on a novel 1,3-(di-4-oxabutanol)-calix[4]arene-crown-5 neutral carrier," *Electrochimica Acta*, vol. 51, no. 24, pp. 5075–5079, Jul. 2006.