



Universitat Autònoma de Barcelona

Màster Universitari en Ciència i Tecnologia Químiques

Mòdul d'Iniciació a la Recerca i Treball Fi de Màster

**Diseño y fabricación de micro/nanochips para
identificación y actuación en células vivas**

Autor:

Sara Durán Ibáñez

Director:

Dr. José Antonio Plaza Plaza

Tutor:

Dr. Julián Alonso Chamarro

Departament de Química - Facultat de Ciències (UAB)

1 de septiembre de 2010

*Memòria presentada per superar el mòdul Iniciació a la Recerca i Treball Fi de Màster
corresponent al Màster Universitari Ciència i Tecnologia Químiques*

Autor: Sara Durán Ibáñez

Vist i plau:

Director: José Antonio Plaza Plaza

Bellaterra, a 1 de septiembre de 2010

ÍNDICE

1 - Abstract	5
2 - Introducción	5
2.1 - Micro y Nanosistemas en Biología Celular	5
2.2 - Micro y Nanopartículas sintetizadas en Biología Celular	6
2.3 - Microchips intracelulares	7
2.3.1 - Microchips pasivos para etiquetado y seguimiento celular	8
2.3.2 - Microchips activos como sensores bioquímicos	10
3 - Nuevos diseños de micro y nanochips para identificación, detección y actuación en células vivas	11
3.1 - Fabricación de microcódigos para reconocimiento e identificación celular	11
3.2 - Fabricación de microchips intracelulares como sensores y actuadores	14
4 - Parte experimental	17
4.1 - Microcódigos de polisilicio con adhesión física sobre membranas celulares	18
4.2 - Microcódigos magnéticos como dispositivos para manipulación celular	22
4.3 - Microchips de oro y oro-polisilicio para doble funcionalización química	23
4.4 - Microchips de platino y platino-polisilicio para estudios de estrés oxidativo	25
4.5 - Microchips magnéticos para clasificación celular	27
5 - Resultados y discusión	28
5.1 - Microcódigos de polisilicio con nanohilos de silicio	28
5.2 - Microcódigos magnéticos	30
5.3 - Microchips de oro y oro-polisilicio	30
5.4 - Microchips de platino y platino-polisilicio	33
5.5 - Microchips magnéticos	34
6 - Conclusiones y próximos estudios	35
Agradecimientos y publicaciones	36
Bibliografía	37
Anexo	38

1 - Abstract

Este estudio abarca el diseño, desarrollo tecnológico y fabricación, mediante la utilización de tecnologías de Micro y Nanosistemas, de herramientas en el orden de las micras y los nanómetros. Estos dispositivos serán utilizados en el estudio, identificación e interacción con células vivas, ya que sus pequeñas dimensiones los hacen idóneos para su aplicación en el campo de la Biología Celular. Estas micro y nanoherramientas pueden usarse para el estudio, identificación o actuación de células vivas desde el exterior. Pero también pueden ser microinyectadas, lipofectadas o fagocitadas por parte de la misma célula, y de esta manera hacer estudios o actuar de forma intracelular.

2 - Introducción

Esta memoria se centra en el diseño y fabricación de micro y nanodispositivos con aplicaciones finales en Biología Celular. Estas aplicaciones se realizan en colaboración con los grupos de la Dra. Lluïsa Pérez (Àrea de Química Orgànica, Facultat de Farmàcia, UB), la Dra. Carme Nogués (Unitat de Biologia Cel.lular, Facultat de Ciències, UAB) y la Dra. Teresa Suarez (Centro de Investigaciones Biológicas CIB-CSIC).

2.1 - Micro y Nanosistemas en Biología Celular

Históricamente, los estudios del funcionamiento celular se han venido realizando en cultivos donde suele haber un elevado número de células, población, siendo difícil hasta ahora realizar el estudio de una misma célula de forma individual a lo largo del tiempo, lo que en inglés se conoce con el nombre de *single cell analysis*. De esta necesidad surge la idea de obtener herramientas con partes funcionales a la escala celular, capaces de estudiar o manipular células individuales vivas.

Por otro lado, la industria Microelectrónica y la de fabricación de MEMS (Sistemas Microelectromecánicos) y NEMS (Sistemas Nanoelectromecánicos) han realizado importantes avances en los procesos de miniaturización de sus dispositivos. Como consecuencia, durante los últimos años han aparecido nuevas líneas de investigación en el campo de los MEMS y NEMS para aplicaciones en células vivas desde el exterior de

las mismas. De forma que estructuras en la escala del micrómetro y submicrómetro abren nuevas oportunidades en Biología Celular [1].

Pero debido a que en nuestros días la industria microelectrónica permite construir herramientas con partes funcionales más pequeñas que la mayoría de las células, en nuestro grupo, surgió la idea de diseñar, desarrollar y fabricar microdispositivos que pudieran trabajar de manera intracelular.

2.2 - Micro y Nanopartículas sintetizadas en Biología Celular

Actualmente las nanopartículas son un área de intensa investigación científica, debido a que poseen una amplia variedad de aplicaciones potenciales en campos como la biomedicina, la óptica y la electrónica.

A modo de ejemplo cercano al objeto de este trabajo, diferentes estudios han demostrado la utilización de micro y nanopartículas como sistemas interactivos en reconocimiento biomolecular [2]. Algunos de los usos de las nanopartículas en el campo de la biomedicina y la biología celular se basan en el uso de éstas como etiquetadores fluorescentes, distribuidores de medicamentos, biodetectores de agentes patógenos, destructores de tejidos tumorales o separadores y purificadores de moléculas biológicas, etc. [3] entre otras muchas aplicaciones. Siendo además una ventaja sus elevados porcentajes de producción.

Pero a pesar de que su funcionalidad ha sido demostrada, su versatilidad es un factor limitante en determinadas aplicaciones. Ya que al tratarse de partículas sintetizadas químicamente, en la mayoría de los casos, no se tiene un gran control sobre la forma y el tamaño de las mismas. Control que si que existe sobre los microchips fabricados por la industria microelectrónica, como se explicará con más detalle en los próximos apartados.

Otro inconveniente de las partículas sintetizadas con respecto a las fabricadas en la industria microelectrónica reside en que todavía existe un cierto grado de incertidumbre con respecto a los efectos nocivos que pueden presentar para la salud cierto tipo de nanopartículas químicas con tamaños inferiores a los 100 nm [4].

2.3 - Microchips intracelulares

En cambio, la microelectrónica aunque no pueda alcanzar unos rendimientos de fabricación comparables a la síntesis química de micro y nanopartículas, puede conseguir una alta versatilidad en dispositivos basados principalmente en la tecnología del silicio a escala micro y nanométrica. Presentando además, las numerosas ventajas de las tecnologías MEMS como, control sobre el tamaño y la forma, producción en masa, construcción con diferentes materiales y con partes electrónicas y/o mecánicas.

Gracias a estos avances recientes en micro y nanotecnología se está comenzando a usar sistemas Microelectromecánicos (MEMS) en Biología Celular [5-9]. Utilizándose herramientas con dimensiones por debajo de los 100 nm, cuando la mayoría de las células tienen un rango de tamaño de decenas de micras. Con la ventaja de que una conexión directa de las células con el mundo exterior puede aportar grandes oportunidades para estudiar y manipular procesos biológicos que suceden en las células vivas [10,11].

Hasta ahora, como se ha comentado en el apartado 2.1, estos dispositivos usados en Biología Celular, realizan estudios sobre poblaciones, y de manera extracelular. Nuestro grupo ha querido innovar en este campo diseñando y fabricando micro y nanodispositivos fabricados mediante tecnologías de MEMS, de manera que el estudio celular pueda realizarse de manera individual, y además intracelular. El diseño de este tipo de micro y nanoherramientas ha constituido un salto revolucionario con respecto a las técnicas utilizadas hasta ahora en el estudio del funcionamiento celular. Además, muchos de estos dispositivos son de silicio y polisilicio, que como ha demostrado nuestro grupo en anteriores estudios son materiales biocompatibles [12].

Por todo ello, nuestro grupo ha conseguido que el uso de microchips de silicio, tanto de forma extracelular como intracelular, sea una realidad para el estudio, identificación o actuación en células vivas.

En este trabajo se presentaran diferentes diseños de microdispositivos con usos dentro del campo de la Biología Celular. Desde microchips pasivos para etiquetado y seguimiento celular, o activos como sensores o actuadores intracelulares.

2.3.1 - Microchips pasivos para etiquetado y seguimiento celular

Actualmente existe una demanda creciente de sistemas para etiquetado y rastreo a nivel celular. Este hecho ha provocado que en la última década haya habido un gran crecimiento en el desarrollo y fabricación de diferentes tipos de dispositivos que actúen como identificadores de células vivas.

Hasta ahora estos sistemas funcionaban rastreando poblaciones de células con características individuales [13]. Pero en nuestros días y gracias a los grandes avances conseguidos en la micro y nanotecnología respecto a la miniaturización de sus dispositivos, se tiene la posibilidad de producir códigos identificadores más pequeños que las células. Y así de forma similar que se rastreaban poblaciones de células, estos nuevos códigos permitirán evaluar el comportamiento de una célula individualmente (supervivencia, desplazamiento...).

Por todo ello en anteriores estudios, nuestro grupo decidió diseñar microcódigos para rastrear, etiquetar y estudiar células vivas individualmente y de forma intracelular, lo que es un avance novedoso en el estudio del funcionamiento celular.

Se diseñaron códigos de polisilicio intracelulares [12], donde una de sus principales ventajas es el tamaño, ya que son lo suficientemente pequeños como para poder adherirse o introducirse en células vivas, pero lo suficientemente grandes como para poder ser leídos e identificados al microscopio óptico o invertido. Otras de sus ventajas son su robustez y su biocompatibilidad. Además estos dispositivos deberán cumplir una serie de requerimientos a nivel biológico, óptico e industrial para poder seguir a una célula de forma individual.

Un ejemplo de aplicación de estos microcódigos de polisilicio, es el de etiquetado celular de macrófagos humanos. En este caso se fabricaron microcódigos con dimensiones de $10\ \mu\text{m} \times 6\ \mu\text{m}$ que consisten en una matriz de 0 y 1. La ausencia de un bit implica la asignación del número 0, y la presencia de éste dará como resultado el número 1. El sistema de codificado se explica en la figura 1.

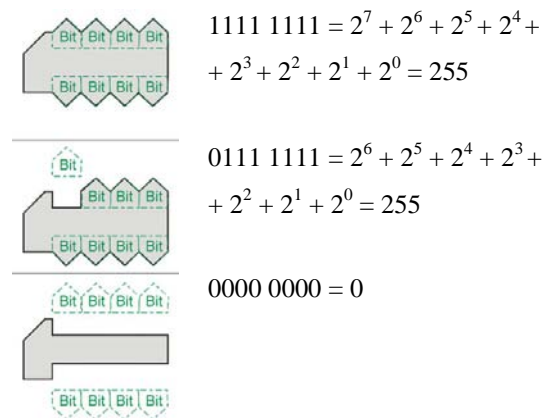
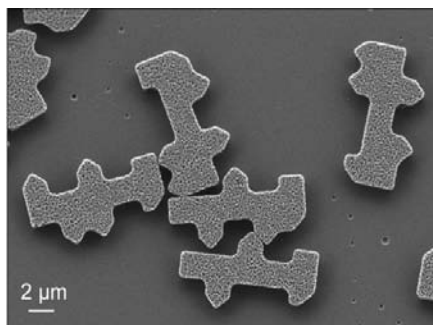


Figura 1. Imagen que muestra el sistema de codificación de los microcódigos de polisilicio.

Existen 256 valores de microcódigos según la variación de 0 y 1 del sistema de codificación, donde cada uno de ellos posee un codificado único. Pueden observarse distintos tipos de códigos en la figura 2 a). En este caso los códigos son fagocitados por macrófagos humanos donde quedan depositados en el interior de la célula. Como puede observarse en la figura 2 b) el código es perfectamente visible al microscopio invertido, pudiendo leerse el sistema de codificado de este microcódigo en concreto, en este caso el 11.

a)



b)

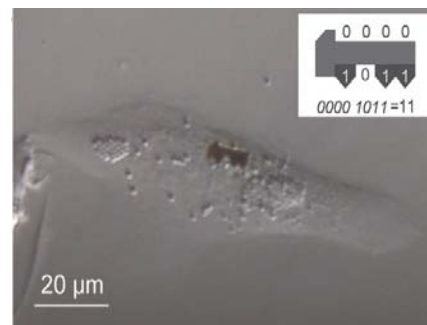


Figura 2. a) Imagen SEM de distintos códigos de polisilicio y b) imagen de microscopio de luz invertida de un macrófago con el microcódigo 11. (Fuente: Small, DOI: 10.1002/sml.200900733).

Los excelentes resultados obtenidos con respecto a la fabricación de microcódigos de polisilicio y su uso como etiquetadores en macrófagos animaron al grupo a trabajar en nuevos diseños y de esta manera amplificar el abanico de aplicaciones en Biología Celular. Estos nuevos microcódigos serán el objeto de estudio de esta memoria de investigación y se explicarán con detalle en los próximos apartados de este trabajo.

2.3.2 - Microchips activos como sensores bioquímicos

Anteriormente se ha explicado con detalle la utilización de microchips intracelulares pasivos para rastreo celular. Estos chips no poseen características activas, ya que su función radica en su forma para la identificación celular. Pero también existe la posibilidad de dotar al dispositivo de una característica activa, de manera que sea visible desde el exterior y que además posea funciones como actuador o como sensor celular.

En trabajos anteriores del grupo se diseñaron y fabricaron un tipo de microchips intracelulares de polisilicio [14]. En la Unitat de Biologia Cel·lular de la Facultat de Biociències de la Universitat Autònoma de Barcelona se funcionalizan con diacetato de fluoresceína (FDA), donde éste interacciona con las esterasas citoplasmáticas, hidrolizando los grupos acetato, y así produciendo emisiones de fluoresceína. Los dispositivos fueron introducidos en dos tipos de células, *D. discoideum*, como puede verse en la figura 3 a) y en células Hela que se muestra en la figura 3 b). Si el chip está introducido en una de las células se dan las emisiones de fluoresceína (flechas amarillas), presentando en ese caso fluorescencia. En cambio si el chip no está en el interior de la célula no se da la fluorescencia, ya que no existe la interacción del FDA con las esterasas intracelulares (flechas negras). Así se demostró por primera vez la posibilidad de tener microchips intracelulares como sensores activos.

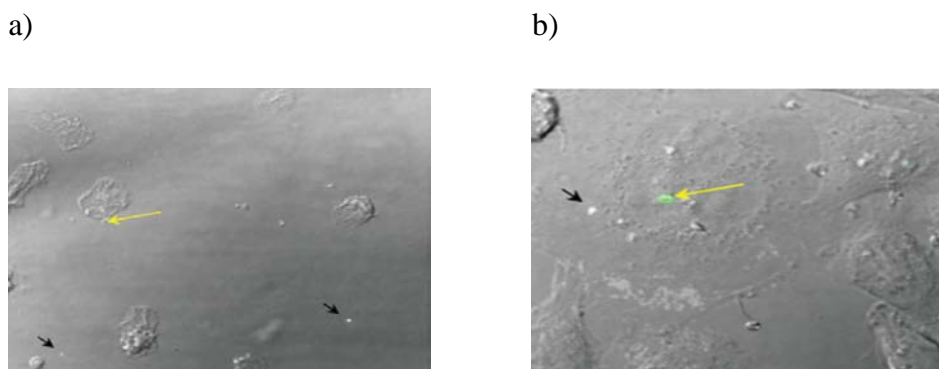


Figura 3. Imágenes de microscopio confocal de a) célula *D. discoideum* y b) célula Hela, con chips de polisilicio.

(Fuente: Small, DOI: 10.1002/sml. 200901041).

Los excelentes resultados obtenidos en la fabricación de microchips de polisilicio y su uso como sensores intracelulares en células vivas animaron al grupo a trabajar en nuevos diseños de microchips, implicando nuevas aplicaciones en Biología Celular. Todo ello se explicará con más detalle en el próximo apartado.

3 - Nuevos diseños de micro y nanochips para identificación, detección y actuación en células vivas

3.1 - Fabricación de microcódigos para reconocimiento e identificación celular

Microcódigos de polisilicio para adhesión física sobre membranas celulares

En el apartado 2.3.1 se han presentado microcódigos de polisilicio donde éstos eran fagocitados por macrófagos. Aunque en trabajos anteriores se demostró que estos dispositivos intracelulares no afectaban a la viabilidad celular, ya que macrófagos con o sin microcódigos poseían un tiempo de vida similar [12], se pensó en la posibilidad de que en vez de introducir los códigos dentro de las células, podrían anclarse a la pared exterior de las mismas. Pero para ello estos dispositivos de polisilicio han de ser funcionalizados químicamente. Sin embargo ciertas sustancias químicas pueden alterar o dañar el funcionamiento celular. Para resolver este problema, se pensó en utilizar un tipo de adhesión física que no afectara químicamente ni a los dispositivos ni a las células.

Esta nanoadhesión estaría inspirada en animales como los gecónidos o más conocidos por su nombre en inglés, *geckos*, los cuales poseen en sus extremidades la capacidad de adherirse fuertemente sobre superficies lisas. Esta capacidad de adhesión de los *geckos* deriva del principio mecánico *contact splitting* o contacto por huella. Cada pata termina en una almohadilla cubierta por una densa capa de pequeños filamentos de unos 200 nm de diámetro, proporcionándole un gran contacto y adhesión a las superficies. Otros insectos como moscas, abejas, arañas, etc. también utilizan esta estrategia de fijación, [15]. En la figura 4 pueden observarse estos nanofilamentos.

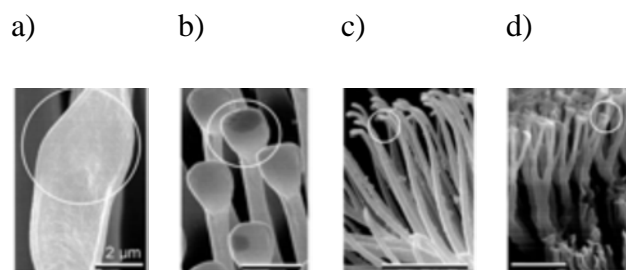


Figura 4. Filamentos de distintos animales con extremidades con capacidad de adhesión, a) escarabajo, b) mosca, c) araña y d) salamandriana. (Fuente: PNAS, DOI: 10.1073/pnas.1534701100).

Por ello, inspirándonos en este tipo de nanovelcro se propone un tipo de microcódigo que en lugar de ser introducido en la célula, será adherido a la membrana celular mediante unos nanohilos de silicio que crecen en la superficie del código [16]. De esta forma se pretende obtener un nuevo anclaje físico de sujeción a la nanoescala, uniendo entre sí la membrana celular con los microcódigos de polisilicio para reconocimiento e identificación celular.

La idea de hacer crecer nanohilos de silicio en una superficie de polisilicio, surgió en nuestro grupo al observar que en anteriores estudios se había conseguido hacer crecer nanohilos de silicio de forma paralela en la dirección $\langle 111 \rangle$ sobre silicio cristalino [16].

Pero nuestro grupo quería conseguir que estos nanohilos se entrecruzaran creando un efecto similar al velcro industrial. Por ello, se crecieron nanohilos sobre polisilicio, ya que éste está compuesto por infinidad de granos de silicio cristalino. Cada grano de silicio está orientado en una dirección diferente, por lo que aunque los nanohilos crezcan en la dirección $\langle 111 \rangle$, esta dirección en cada grano será distinta. Obteniendo así un entrecruzamiento de los nanohilos que dará como resultado un tipo de adhesivo similar al velcro industrial. Puede observarse el diferente crecimiento de los nanohilos sobre silicio cristalino y sobre polisilicio en la figura 5. Lo que en la figura se indica como circunferencias de color amarillo, representan las nanopartículas de oro que, como se explicará con más detalle en los próximos apartados, actúan como semillas catalíticas de los nanohilos de silicio.

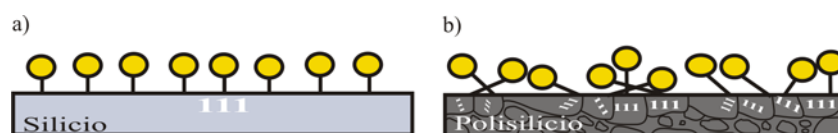


Figura 5. Crecimiento de los nanohilos en la dirección $\langle 111 \rangle$, a) sobre silicio monocristalino de forma alineada y b) sobre polisilicio de forma desalineada.

Microcódigos magnéticos como dispositivos para manipulación celular

La idea de fabricar dispositivos para manipulación celular surgió a raíz de la experiencia obtenida en anteriores estudios, ya que en ocasiones el dispositivo quedaba localizado dentro de la célula en zonas de difícil visualización, y por lo tanto era complicado leer el sistema de codificado. Para que la observación del código sea lo más clara posible al microscopio óptico convencional o al invertido, éste debe estar lo más plano posible con respecto al observador.

Por ello se trabajó en un nuevo diseño que incorpora una característica novedosa respecto a anteriores dispositivos, se fabricaron microcódigos sobre los cuales se puedan ejercer fuerzas desde el exterior, y de esta manera orientar la célula ó código para que la lectura del dispositivo sea a la vez clara e inequívoca.

Se diseñó y fabricó un tipo de microcódigo magnético, el cual se introduce en células vivas, cumpliendo una doble funcionalidad. Por un lado, las células son portadoras de un código y por lo tanto podemos identificarlas. Y por otro lado, al tratarse de un código magnético la célula o código podrá orientarse en la dirección deseada mediante campos magnéticos generados, por ejemplo, con imanes permanentes.

En la figura 6 pueden observarse las diferentes etapas del sistema propuesto; desde inyección del código, en este caso, en una célula embrionaria, hasta su orientación por imanes en la dirección deseada.

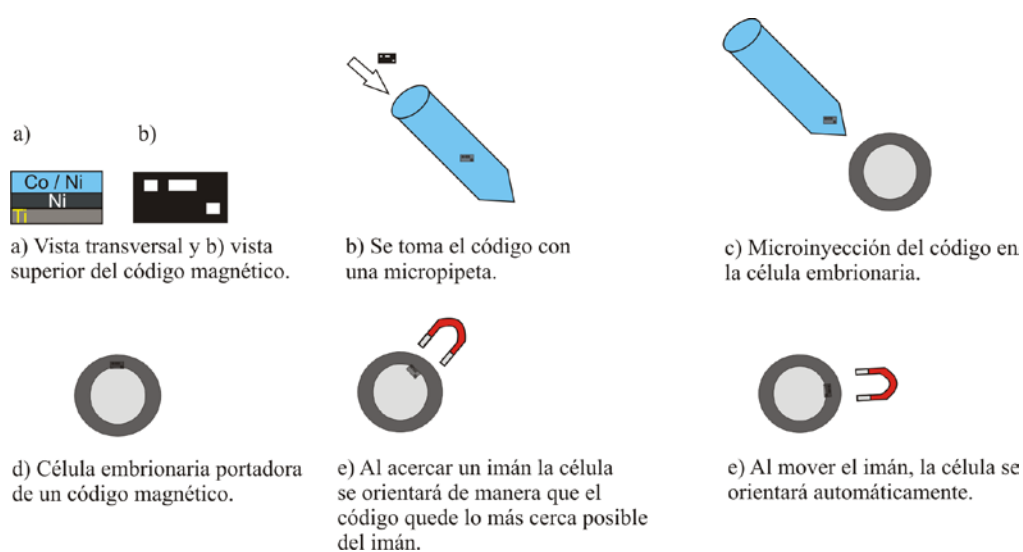


Figura 6. Manipulación celular mediante imanes y códigos magnéticos.

3.2 - Fabricación de microchips intracelulares como sensores y actuadores

Tras los prometedores resultados obtenidos con los microchips intracelulares como sensores bioquímicos [14], se pensó en el diseño de nuevos microchips que pudieran poseer la capacidad de operar como sensores de parámetros celulares o como actuadores de manera intracelular.

Hasta ahora se había trabajado con dispositivos con un solo material y monofuncionales, por ello el siguiente paso fue dotar a los dispositivos de una bifuncionalidad y para conseguirlo se diseñaron dispositivos con diferentes materiales. La posibilidad de tener varios materiales con espesores y formas controladas es una ventaja competitiva de los microchips fabricados con tecnologías microelectrónicas en comparación con las micro/nanopartículas sintetizadas químicamente.

La aplicación de estos dispositivos bifuncionales intracelulares reside en que cada material puede ser funcionalizado con distinto tipo de, por ejemplo, proteínas. De forma que cada material funcionalizado tenga una función concreta, uno por ejemplo puede poseer la función de dirigir el dispositivo a un espacio celular concreto y el segundo material puede actuar como sensor de un parámetro específico. O incluso pueden actuar ambos como sensores, registrando varios parámetros celulares distintos en una misma localización.

Microchips de oro y oro-polisilicio para doble funcionalización química

Uno de los nuevos materiales con el que se trabajó fue con el oro, esta elección se tomó por el hecho de que del oro puede funcionalizarse químicamente, por ejemplo, con tioles y de forma ortogonal al silicio. Es decir, que la funcionalización del oro y la del silicio pueden ser diferentes y una no afectar a la otra. Además de ser un material noble y resistente.

Primero se fabricaron chips de oro para realizar estudios de viabilidad celular. Recordar que, la biocompatibilidad de los microchips de silicio ya se había comprobado en estudios anteriores del grupo [14]. Así mismo también, se diseñaron y fabricaron dispositivos bifuncionales de oro-polisilicio. De esta manera se presentan dispositivos donde sus materiales pueden poseer funcionalizaciones distintas y ortogonales.

Microchips de platino y platino-polisilicio para estudios de estrés oxidativo

Otro de los nuevos materiales con el que se trabajó fue con el platino, esta elección se tomó por el hecho de que éste tiene propiedades antioxidantes, por lo que disminuye el estrés oxidativo de las células, mejorando así su calidad y su tiempo de vida [17]. Primero se fabricaron chips de platino para realizar estudios de toxicidad, y también, se diseñaron y fabricaron dispositivos bifuncionales de platino-polisilicio.

Microchips magnéticos para clasificación celular

Una de las áreas de estudio que está teniendo un gran interés en la actualidad es la de separación celular o en inglés *cell sorting*. Por ello, aplicando el mismo principio de fabricación que en los microcódigos magnéticos del apartado 3.1 y surgiendo la necesidad de realizar un tipo de clasificación celular, se diseñaron y fabricaron microchips con materiales magnéticos.

Un ejemplo de aplicación de este tipo de dispositivos sería que teniendo un cultivo de, por ejemplo, macrófagos, con otro tipo de células, los macrófagos fagocitarían el dispositivo magnético, mientras el otro tipo de célula no lo haría. De esta manera al aplicar un campo magnético, por ejemplo, con un imán, podríamos separar los macrófagos del otro tipo celular gracias al dispositivo. En este ejemplo se fagocitan, pero también podrían inyectarse o lipofectarse.

Del mismo modo, estos microchips también podrían funcionalizarse de tal manera que se unieran de forma específica a un tipo de célula y así separar los diferentes tipos celulares. El interés de tener chips intracelulares fabricados con tecnologías microelectrónicas comparado con micropartículas sintetizadas, es que de nuevo es posible su combinación con otros dispositivos pasivos u otros sensores y/o actuadores (microcódigos, sensores bioquímicos, etc.).

En la figura 7 se ilustra por etapas esta clasificación celular.

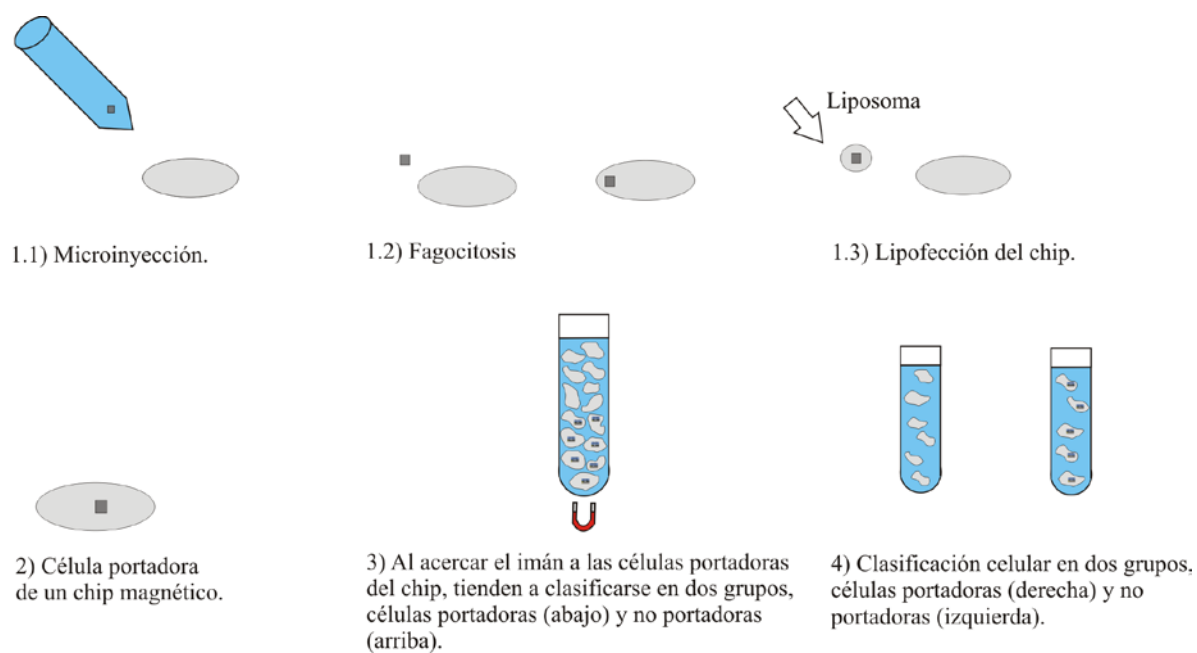


Figura 7. Clasificación celular mediante campos magnéticos y chips magnéticos.

4 - Parte experimental

Desarrollo de tecnologías para la fabricación de microcódigos y microchips intracelulares

Como se ha comentado en apartados anteriores, en la actualidad la industria microelectrónica y las tecnologías MEMS y NEMS tienen la capacidad de fabricar dispositivos en la escala del micrómetro. Por ello, se diseñó un protocolo de fabricación, específico en cada caso, basado en tecnologías de fabricación de MEMS, entre las cuales cabe destacar los procesos fotolitográficos para definir los dispositivos, pudiendo así fabricar microchips a la escala celular. Teniendo en cuenta además que estas herramientas tienen que fabricarse en masa, a bajo precio y con tamaños menores a las células.

Solicitud de *Run* y fabricación de obleas en el IMB-CNM

Para fabricar este tipo de dispositivos hay que diseñar un *Run*, que se trata de una secuencia de pasos que han de seguirse para fabricar una oblea con dispositivos en la Infraestructura Científica y Tecnológica Singular (ICTS). Denominada como “Sala Blanca Integrada de Micro y Nanofabricación”.

Según la necesidad, se diseñan obleas de diferentes materiales para fabricar distintos tipos de dispositivos. Entre ellos el caso que nos ocupa, la fabricación de pequeños dispositivos como microcódigos y microchips intra y extracelulares.

Para ello se diseña una secuencia de pasos (*Run*) que regirá la fabricación de la oblea. Estos pasos se introducen en el programa informático *BACO+*, (programa diseñado *ad hoc* en el IMB-CNM) que se utiliza para realizar la solicitud. Además de especificar el tipo de materiales que se crecerán o depositarán sobre la oblea, debe especificarse la máscara diseñada específicamente para estos dispositivos. Esta máscara posee los motivos geométricos necesarios para fabricar los microcódigos (máscara CNM460), o microchips (máscara CNM311). También hay que ser consciente de las limpiezas y los ataques requeridos para fabricar los dispositivos.

Por lo que, mediante el programa *BACO+* se insertan las diferentes etapas del proceso de fabricación de la oblea. Después de realizar la solicitud de *Run*, y que los

ingenieros de Sala Blanca certifiquen que es correcto, debe ser firmado por el director de proyecto y el director de la ICTS.

En los próximos apartados se especificarán con detalle las tecnologías desarrolladas para fabricar este tipo de microdispositivos en la Sala Blanca del IMB-CNM.

4.1 - Microcódigos de polisilicio con adhesión física sobre membranas celulares

El diseño y fabricación de los códigos con nanohilos de silicio y sus aplicaciones se creó como un trabajo conjunto de varios grupos de investigación con diferentes competencias. Por un lado en el IMB-CNM, y siendo el objeto de este estudio, se realizó el diseño, desarrollo y fabricación de los códigos de polisilicio, y el pegado de los dispositivos entre materiales inorgánicos.

El crecimiento de los nanohilos de silicio se llevó a cabo por el grupo del Dr. Álvaro San Paulo del IMB-CNM. Este grupo tenía experiencia en el crecimiento de nanohilos de silicio sobre superficies de silicio cristalino en la dirección $\langle 111 \rangle$ [16]. Nuestro grupo introdujo la idea de hacer crecer nanohilos sobre granos de polisilicio, provocando un cambio en la orientación de crecimiento de los nanohilos, como se ha explicado con detalle en el apartado 3.1.

Y por último, la aplicación como método adhesivo entre dispositivos inorgánicos y material biológico, en este caso células embrionarias de ratón, se llevó a cabo por el grupo de la Dra. Carme Nogués, de la Unitat Biologia Cel·lular de la Facultat de Biociències de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Fabricación de los códigos de polisilicio

Los códigos de polisilicio consisten en una matriz de códigos binarios, con dimensiones de $10 \mu\text{m} \times 6 \mu\text{m}$. Pueden leerse sus características en la tabla 1. Y verse sus etapas de fabricación en la figura 8.

Material	Espesor
Polisilicio	$1 \mu\text{m}$

Tabla 1. Materiales y espesores de los microcódigos de polisilicio.

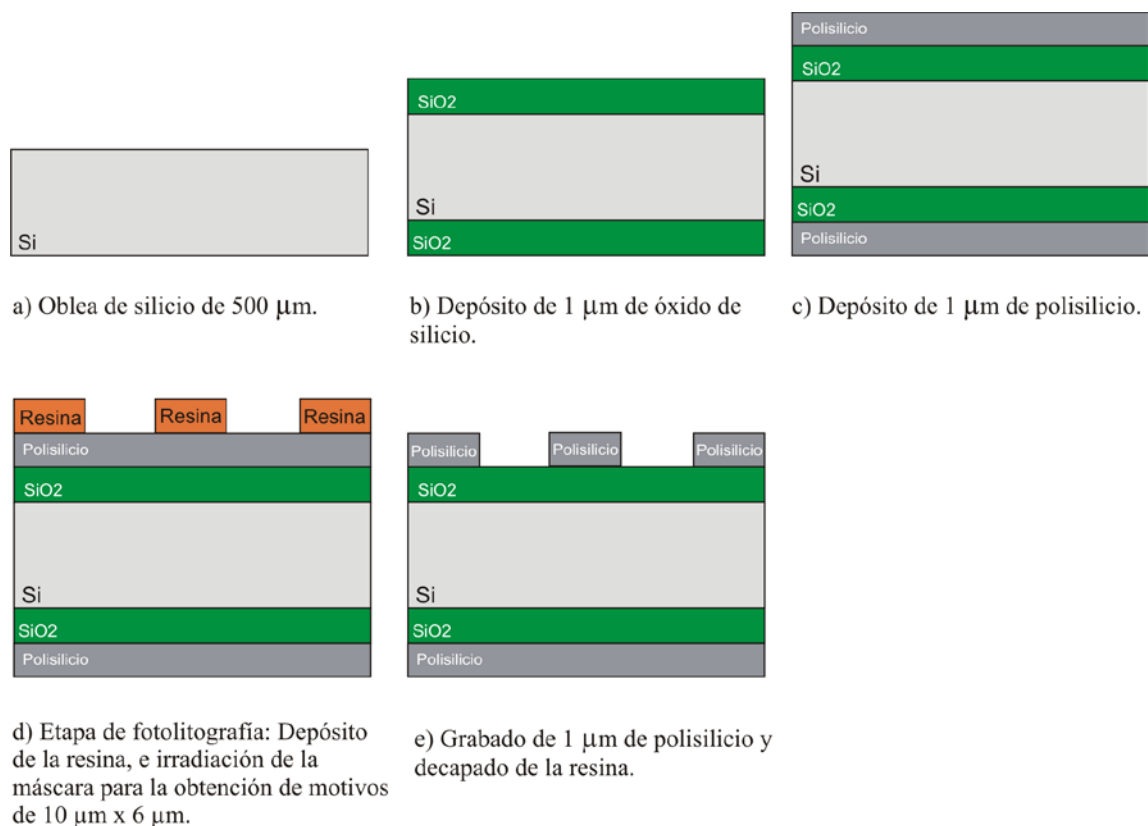


Figura 8. Secuencia de pasos para la fabricación de microcódigos de polisilicio.

Crecimiento de los nanohilos de silicio

Se depositan nanopartículas de oro sobre la superficie de polisilicio y éstas actúan como semillas catalíticas para la síntesis de los nanohilos.

Los nanohilos tienen un rango de diámetro de entre 30 y 80 nanómetros y una longitud de aproximadamente de 3 μm . Su orientación final dependerá de la orientación cristalográfica del grano de polisilicio donde la nanopartícula de oro haya sido depositada. Éstos crecen a una temperatura de entre 750°C y 850°C en una mezcla de vapores químicos como, SiCl_4 actuando como precursor, BBr_3 como dopante y Ar/H_2 como portador, en un horno de tubo mediante deposición química, este proceso tiene una duración de 20 minutos.

Debido a que las nanopartículas de oro son catalizadoras de la deposición, la localización del crecimiento del nanohilo y su tamaño vendrán determinados por el lugar de deposición de la nanopartícula y el tamaño de ésta. Cuando se han fabricado las

oblas en Sala Blanca, el responsable del *Run* las recoge para poder continuar la fabricación de códigos de polisilicio.

En la figura 9 pueden observarse las diferentes etapas de las que consta el crecimiento de los nanohilos.

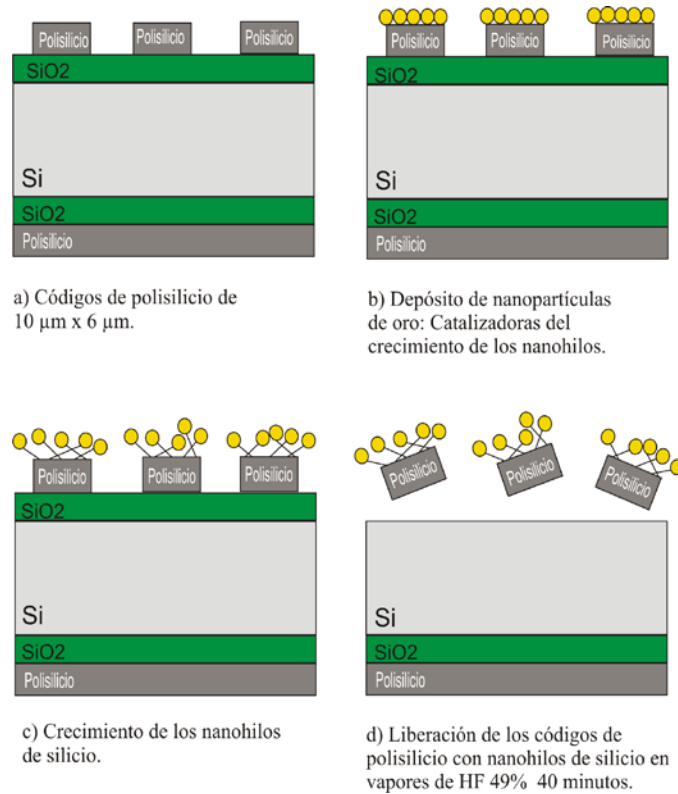


Figura 9. Secuencia de pasos para el crecimiento de los nanohilos de silicio y la liberación de los microcódigos de polisilicio de la oblea de silicio.

Liberación de los microcódigos

La última etapa es el ataque sacrificial de la capa de óxido para poder liberar los dispositivos de la oblea, y se realizará en el laboratorio de Microsistemas, figura 9 d). Este proceso debe realizarse con especial cuidado, debido al pequeño diámetro de los nanohilos.

La secuencia constará de las siguientes etapas:

1 - Corte

Se corta la oblea con una punta de diamante en dados de 1 cm x 1cm.

2 - Limpieza

Se limpia la superficie de los dados con un flujo de nitrógeno, de esta manera se elimina la suciedad y los cascotes que puedan haberse adherido.

3 - Ataque

Se prepara un baño de HF 49% y se colocan los dados en un recipiente sobre el baño sin llegar a estar en contacto directo con el ácido, tan sólo con los vapores desprendidos por éste. Este paso tiene una duración de 40 minutos. El ácido fluorhídrico ataca al óxido de silicio liberando los códigos. Posteriormente se prepara un baño de agua a 80°C y se colocan los dados boca abajo sobre el baño. Al igual que en el paso anterior no se introducen completamente, si no que se colocan sobre el baño, neutralizando el ácido con los vapores desprendidos del agua. La etapa de neutralización tiene una duración de 5 minutos.

4 - Recogida

Retiramos los dados uno a uno del baño de agua y se introducen boca abajo en un vial con etanol que previamente se ha introducido en el aparato de ultrasonidos, y se aplican breves pulsos de pocos segundos. Los códigos se desprenden fácilmente de la oblea, quedando suspendidos en el etanol.

El vial con los códigos recogidos se homogeniza en el agitador y se distribuye en una serie de tubos de microcentrífuga dependiendo del número de dados recogidos. Habitualmente se recogen 1 o 2 tubos por dado, dependiendo de lo concentrada que queramos que sea la muestra. Se etiquetan los tubos convenientemente, indicando número de *Run*, número de oblea, letra designando el número de tubo, y el nombre del dispositivo. **Ejemplo:** 5075-1-A-CódigoPolisilicio+NH (nº de *Run* - nº de oblea - nº de tubo - nombre). Por último se introducen los tubos en la centrifugadora MiniSpin Plus a 14000 rpm durante 5 minutos.

4.2 - Microcódigos magnéticos como dispositivos para manipulación celular

Se desarrolló una tecnología característica para la fabricación microcódigos magnéticos con dimensiones de $10\text{ }\mu\text{m} \times 6\text{ }\mu\text{m}$. Éstos están formados por distintas capas de aluminio, titanio, níquel y una aleación de cobalto/níquel. Por indicación de los ingenieros de Sala Blanca, no se utilizó SiO_2 por requerimientos del equipo utilizado, por ello, en este caso se utilizará aluminio como primera capa para el resto de deposiciones. Donde el titanio hará funciones de capa sacrificial, el níquel de capa de adherencia, y la capa de cobalto/níquel aportará las propiedades magnéticas, características de este tipo de dispositivo. Pueden leerse sus características en la tabla 2, y verse sus etapas de fabricación en la figura 10.

Material	Espesor
Aluminio	$1\text{ }\mu\text{m}$
Titanio	50 nm
Níquel	50 nm
Co/Ni	$2\text{ }\mu\text{m}$

Tabla 2. Materiales y espesores de los microcódigos magnéticos.

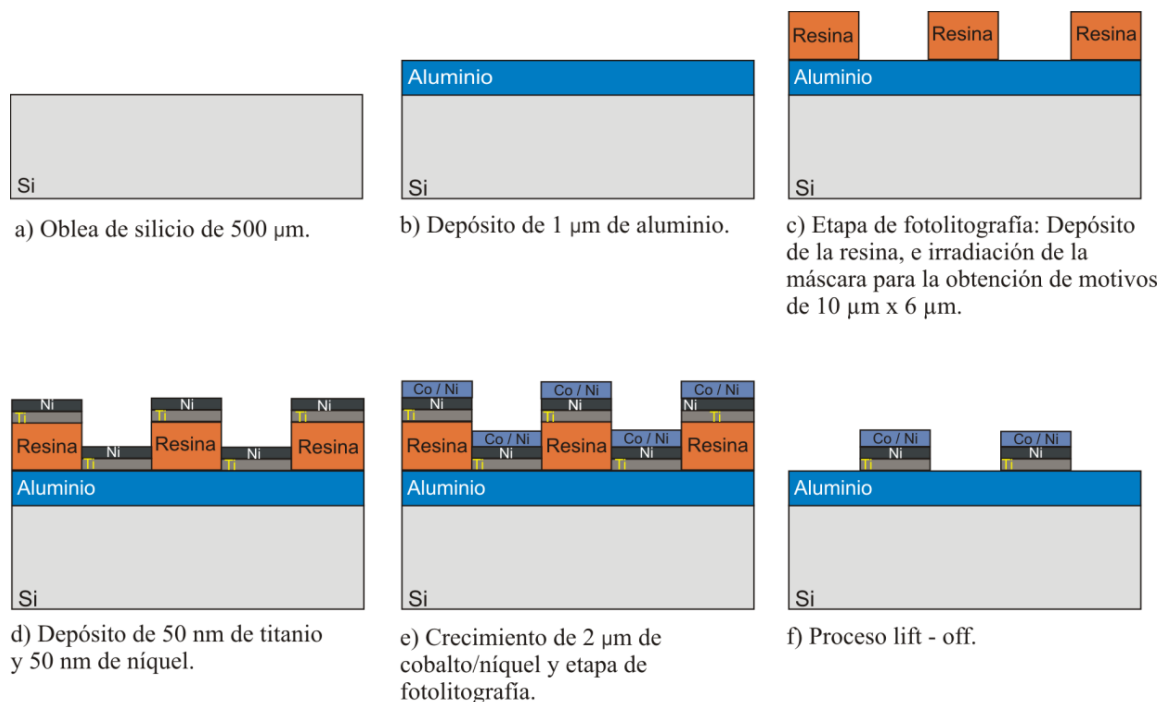


Figura 10. Secuencia de pasos para la fabricación de microcódigos magnéticos

El siguiente paso es la liberación de los códigos magnéticos. Se sigue el mismo protocolo que para los microcódigos de polisilicio, que se ha explicado con detalle en el apartado 4.1. A excepción del paso de limpieza previa antes del ataque de HF, ya que en

este caso, además de limpiar con flujo de nitrógeno los dados de oblea, se introducen en una cubeta con agua doblemente desionizada durante 5 minutos, y ésta será introducida en el aparato de ultrasonidos durante 5 minutos. Además, el paso final de recogida en etanol de los dispositivos en este caso tiene una duración de 5 minutos. Ver figura 11.

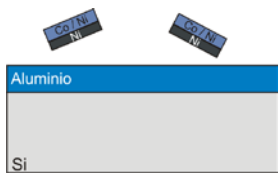


Figura 11. Microcódigos magnéticos liberados de la oblea de silicio.

4.3 - Microhips de oro y oro-polisilicio para doble funcionalización química

Primero se diseñaron y fabricaron chips de oro con dimensiones de 3 μm x 3 μm , con tan sólo 100 nm de espesor, de manera que el grupo de la Dra. Carme Nogués de la Unitat de Biologia Cel·lular de la Facultat de Biociències de la Universitat Autònoma de Barcelona pudiera realizar estudios de citotoxicidad. Pueden leerse sus características en la tabla 3. Y verse sus etapas de fabricación en la figura 12.

Material	Espesor
Oro	100 nm

Tabla 3. Materiales y espesores de los microchips de oro.

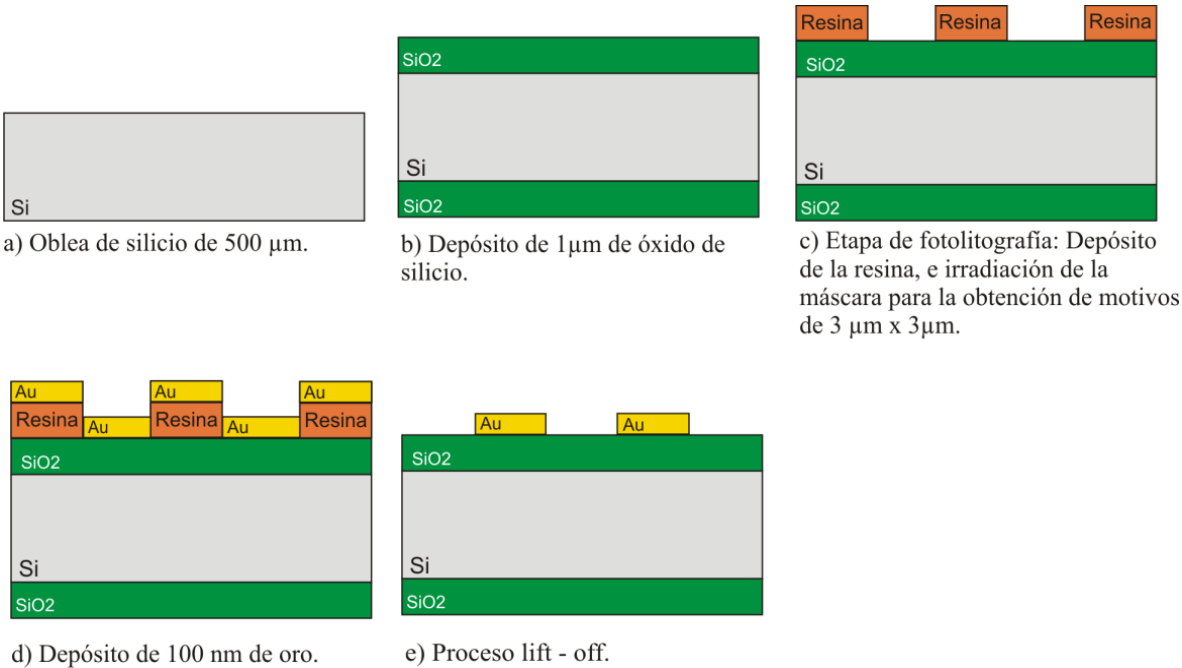


Figura 12. Secuencia de pasos para la fabricación de microchips de oro.

Posteriormente tras comprobar su biocompatibilidad, se diseñaron y fabricaron chips de polisilicio-oro con dimensiones de 3 μm x 3 μm . Pueden leerse sus características en la tabla 4. Y verse sus etapas de fabricación en la figura 13.

Material	Espesor
Polisilicio	400 nm
Oro	100 nm

Tabla 4. Materiales y espesores de los microchips de oro-polisilicio.

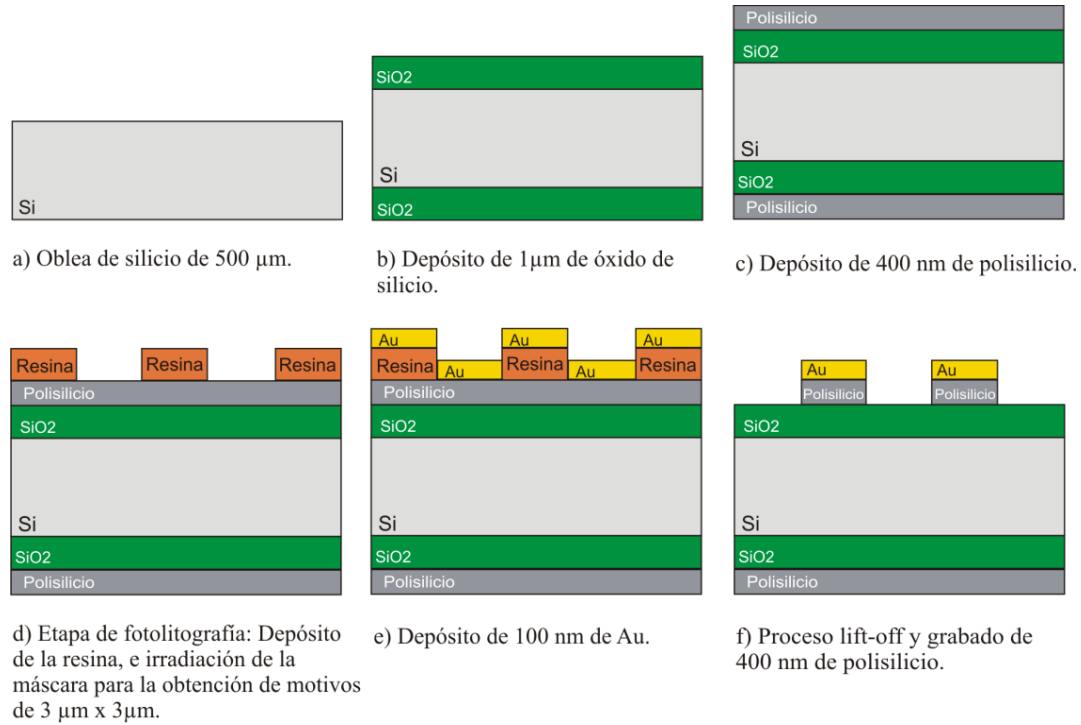


Figura 13. Secuencia de pasos para la fabricación de microchips de oro – polisilicio.

Por último, se procede a la liberación de los chips mediante el ataque del óxido. Se sigue el mismo protocolo que en el apartado 4.2 para los microcódigos magnéticos. En este caso, se utiliza papel de filtro con un diámetro de poro de 5 μm , asegurando que los dispositivos finales no posean ningún tipo de impureza.

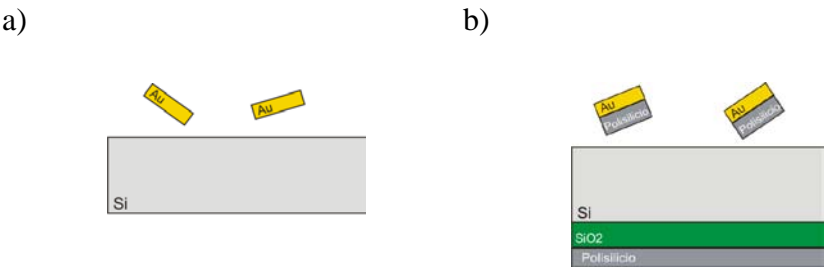


Figura 14. Microchips intracelulares de a) oro y b) oro-polisilicio liberados de la oblea de silicio.

4.4 - Microchips de platino y platino-polisilicio para estudios de estrés oxidativo

Primero se diseñaron y fabricaron chips de platino con dimensiones de 3 μm x 3 μm , con tan sólo 100 nm de espesor, de manera que el grupo de la Dra. Carme Nogués de la Unitat de Biologia Cel·lular de la Facultat de Biociències de la Universitat Autònoma de Barcelona pudiera realizar estudios de citotoxicidad. Pueden leerse sus características en la tabla 5. Y verse sus etapas de fabricación en la figura 15.

Material	Espesor
Platino	100 nm

Tabla 5. Materiales y espesores de los microchips de platino.

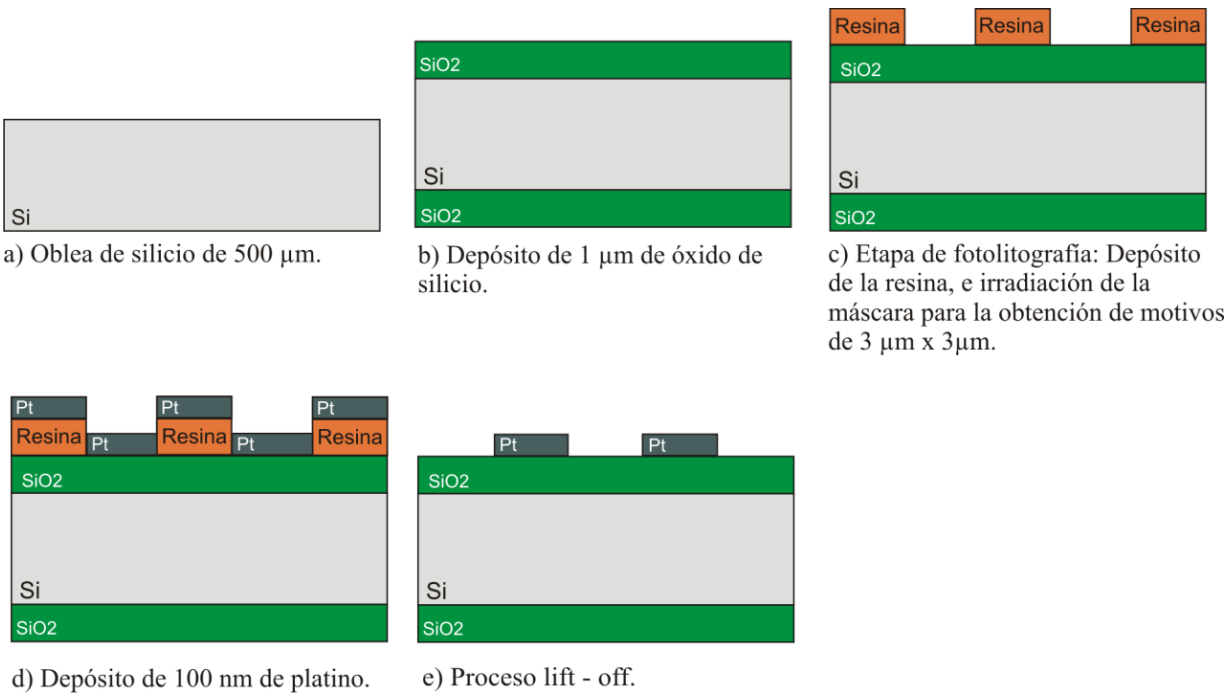


Figura 15. Secuencia de pasos para la fabricación de microchips de platino.

Posteriormente tras comprobar su biocompatibilidad, se diseñaron y fabricaron chips de platino-polisilicio con dimensiones de 3 μm x 3 μm . Pueden leerse sus características en la tabla 6. Y verse sus etapas de fabricación en la figura 16.

Material	Espesor
Polisilicio	100 nm
Platino	100 nm

Tabla 6. Materiales y espesores de los microchips de platino-polisilicio.

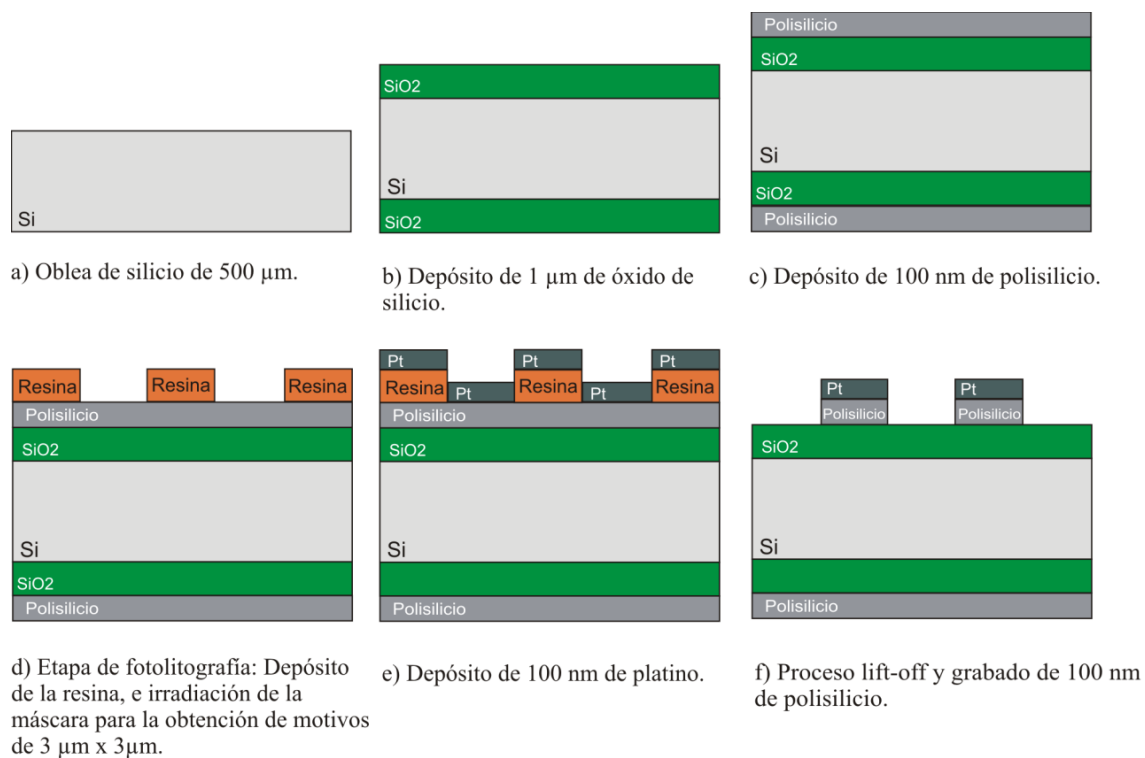


Figura 16. Secuencia de pasos para la fabricación de microchips de platino - polisilicio.

Una vez finalizada la fabricación de las obleas con dispositivos de platino y platino-polisilicio, se procede a la liberación de los chips mediante el ataque del óxido. Se sigue el mismo protocolo que en el apartado 4.2, para los microcódigos magnéticos. Ver figura 17. En este caso se utiliza también, papel de filtro con un tamaño de poro de 5 μm (Hydrophilic PVDF, Millipore).

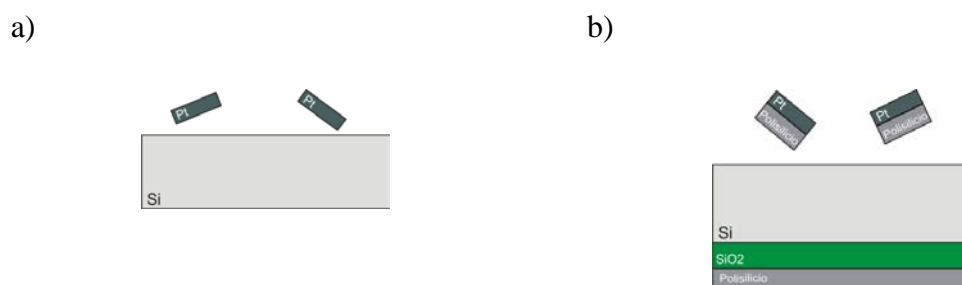


Figura 17. Microchips intracelulares de a) platino y b) platino-polisilicio liberados de la oblea de silicio.

4.5 - Microchips magnéticos para clasificación celular

Se desarrolló una tecnología para fabricar microchips magnéticos con dimensiones de 3 μm x 3 μm . El chip estará compuesto por una tricapa de Ti, Ni, Au que actúan como capas de adherencia y Co/Ni como material magnético. Pueden leerse sus características en la tabla 7. Y verse sus etapas de fabricación en la figura 18.

Material	Espesor
Titanio	100 nm
Níquel	100 nm
Oro	100 nm
Co/Ni	2 μm

Tabla 7. Materiales y espesores de los microchips magnéticos.

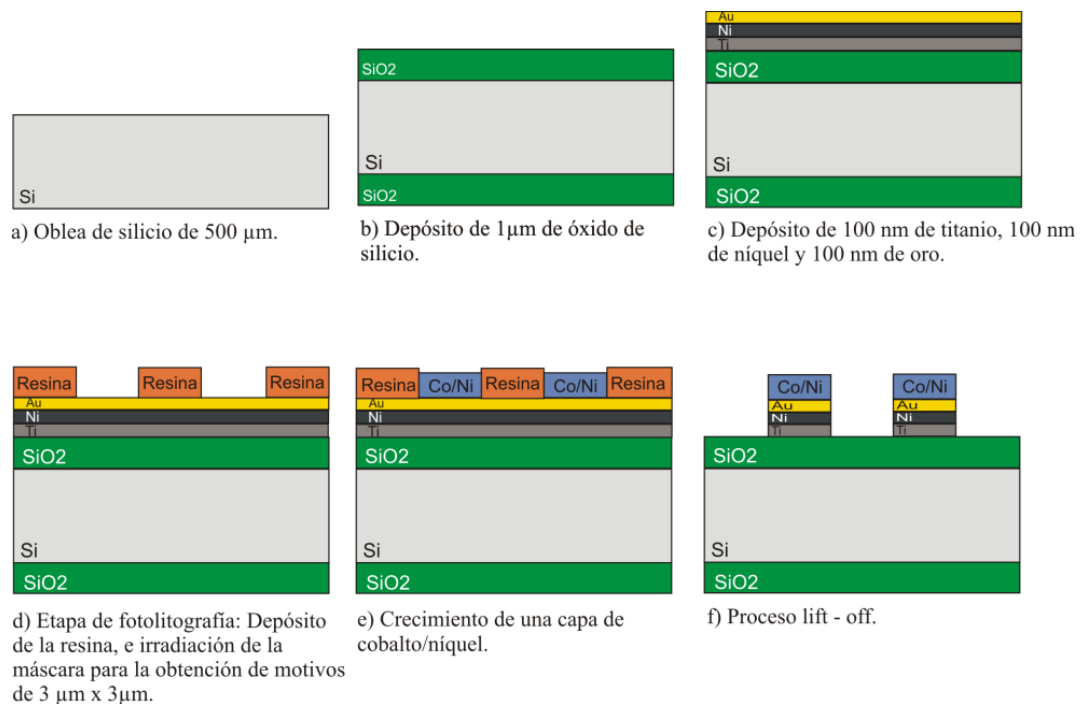


Figura 18. Secuencia de pasos para la fabricación de microchips magnéticos.

Una vez finalizada la fabricación de las obleas con dispositivos magnéticos, se procede a la liberación de los chips mediante el ataque del óxido.

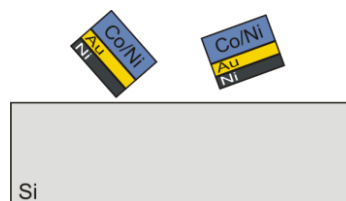


Figura 19. Microchips intracelulares magnéticos liberados de la oblea de silicio.

5 - Resultados y discusión

5.1 - Microcódigos de polisilicio con nanohilos de silicio

Se obtuvo una oblea de microcódigos de polisilicio con dimensiones de $10\ \mu\text{m} \times 6\ \mu\text{m}$, figura 20 a), donde posteriormente se hicieron crecer nanohilos de silicio de $3\ \mu\text{m}$ de longitud y aproximadamente unos $50\ \text{nm}$ de diámetro, figura 20 b).

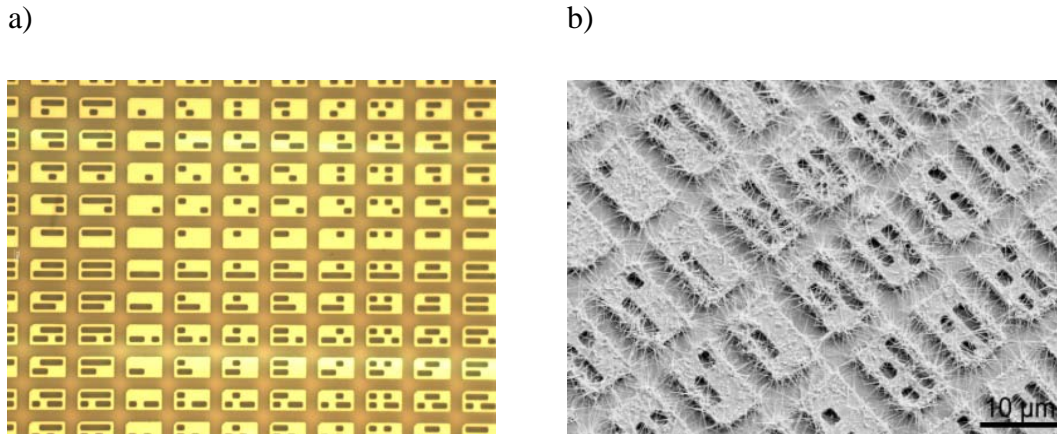


Figura 20. a) Fotografía al microscopio óptico a 1000x de códigos de polisilicio, b) imagen SEM de códigos de polisilicio con nanohilos creciendo sobre ellos antes del ataque de HF 49%.

Teniendo un especial cuidado en el paso de liberación de los dispositivos de la superficie de la oblea, se obtienen microcódigos de polisilicio con nanohilos, donde éstos actuarán como adhesivo físico. Pueden observarse estos microcódigos en la figura 21.

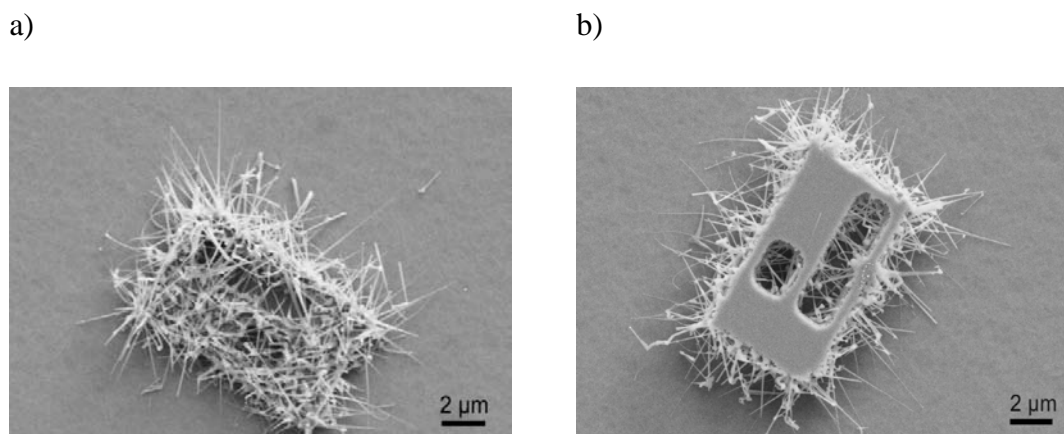


Figura 21. Imágenes SEM de un microcódigo de polisilicio con nanohilos después del ataque en vapores de HF 49%, a) del derecho y b) del revés.

Tras observar las muestras en el microscopio electrónico de barrido pudo verificarse que los nanohilos tenían además propiedades adherentes entre sí (pegado inorgánico-inorgánico). Esta capacidad puede observarse en la figura 22 a).

Posteriormente en la Unitat de Biologia Cel·lular de la Facultat de Biociències de la Universitat Autònoma de Barcelona se realiza el pegado de los microcódigos sobre la zona pelúcida de células embrionarias de ratón.

Pueden verse dos imágenes en la figura 22 b) donde en ambas se ve claramente un código adherido sobre la membrana celular (las imágenes no corresponden a la misma célula embrionaria).

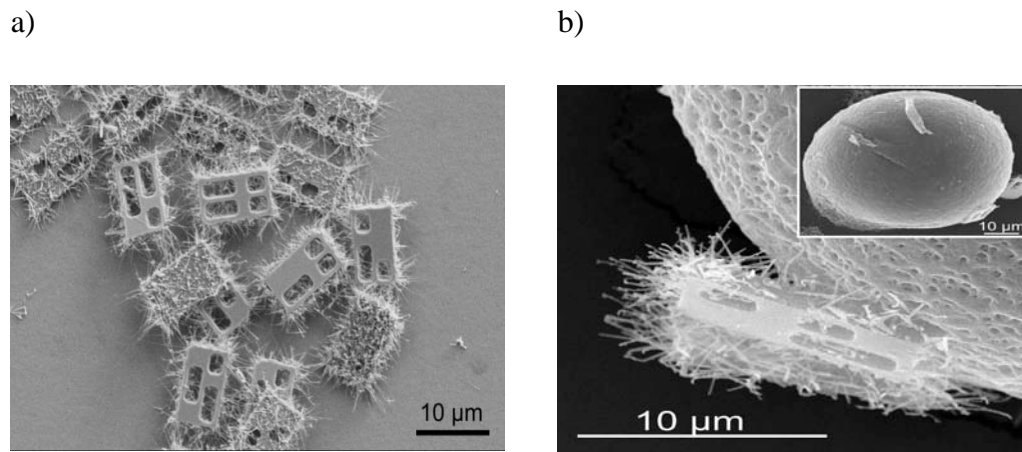


Figura 22. Imágenes SEM de a) códigos de polisilicio pegados entre sí y b) de un código pegado a la zona pelúcida de un embrión de ratón gracias a los nanohilos de silicio.

Como se ha podido demostrar, la fabricación de microcódigos de barras con nanohilos de silicio como sistema de anclaje físico, puede tener una aplicación real en el etiquetado y rastreo de células vivas, pudiéndose adherir estos dispositivos sobre la membrana celular gracias al efecto velcro conseguido por el entrecruzamiento de los nanohilos de silicio.

5.2 - Microcódigos magnéticos

La fabricación de los códigos magnéticos en el momento de la entrega de esta memoria se encuentran en el periodo final de su fabricación en la “Sala Blanca Integrada de Micro y Nano fabricación” del IMB-CNM. Donde se realizó la deposición de titanio y níquel, observando buenos resultados de fabricación, ver figura 23.

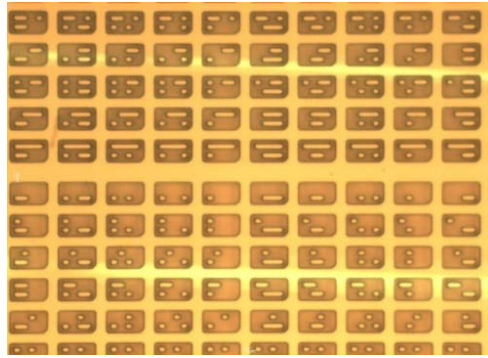


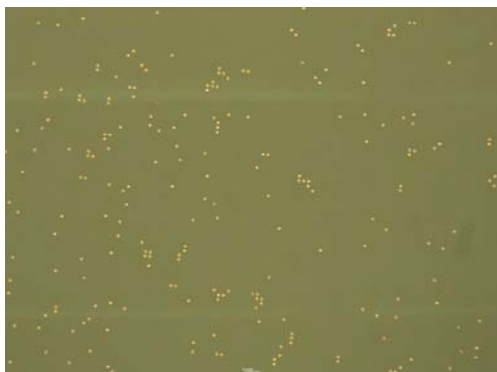
Figura 23. Imagen de microscopio óptico a 1000x antes del crecimiento de Co/Ni.

5.3 - Microchips de oro y oro-polisilicio

Microchips de oro

Como se observan en las fotografías del microscopio óptico en la figura 24 a), los chips de oro no se adhirieron bien a la capa de SiO_2 , ya que muchos saltaron de la oblea antes del proceso de liberación, provocando bajos rendimiento de fabricación. Además presentaban una alta aglomeración entre sí tras el secado, como se ve en la figura 24 b).

a)



b)

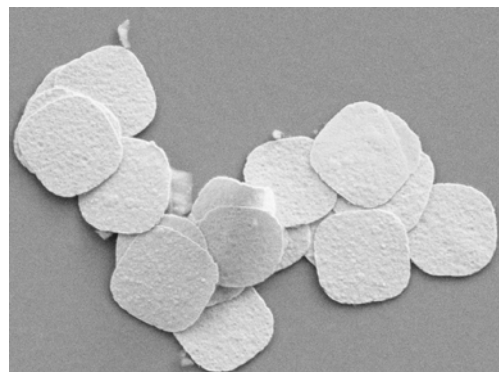


Figura 24. a) Fotografía de microscopio óptico a 200x sobre la oblea de silicio, y b) imagen SEM de chips de oro después del ataque de HF.

Después de que la fabricación de los microchips de oro haya terminado en el IMB-CNM, en la Unitat de Biologia Cel·lular, se llevan a cabo los estudios de citotoxicidad. En este caso se ponen en contacto los macrófagos con los microchips de oro, donde éstos los fagocitan. Este hecho puede apreciarse claramente en la figura 25.

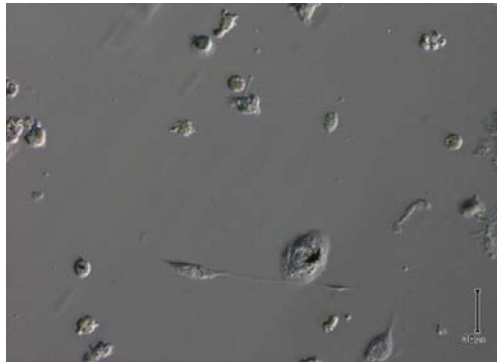
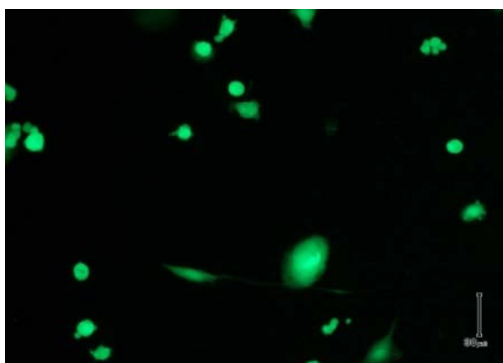


Figura 25. Imagen de microscopio invertido de macrófagos portando chips intracelulares de oro.

Para realizar el estudio de viabilidad celular de los microchips de oro sobre los macrófagos, los chips se han funcionalizado previamente con un kit comercial de calceína no fluorescente y con dímero de etidio. La calceína es convertida por las células vivas en fluorescente, dando una coloración verde, como se observa en la figura 26 a). En el caso de que la célula esté muerta no se observa esta actividad. El dímero de etidio sólo puede tener acceso a las células muertas, y su función radica en que marca el núcleo de la célula muerta con una característica coloración roja. Como puede observarse en la figura 26 b).

a)



b)

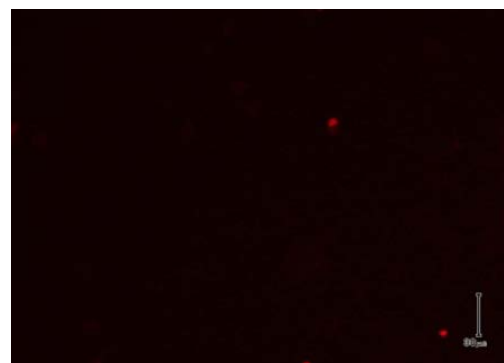


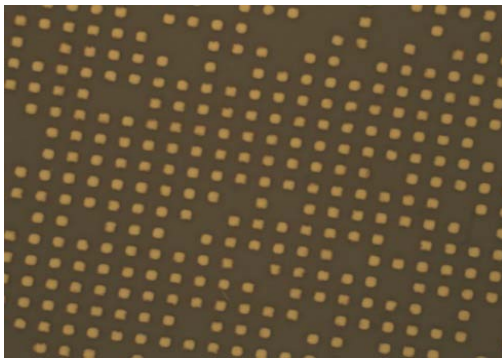
Figura 26. a) Macrófagos con fluorescencia verde provocada por la calceína en células vivas, y b) con fluorescencia roja provocada por el dímero de etidio en las células muertas.

Estas imágenes están tomadas a 7 días de la fagocitosis del chip por parte del macrófago. Y viendo que la cantidad de células vivas es muy superior a las células muertas se puede concluir que la viabilidad y la biocompatibilidad de los chips de oro en macrófagos son muy buenas.

Microchips de oro-polisilicio

Los chips de oro-polisilicio dieron mejores resultados de fabricación, ya que la capa de oro se depositaba sobre una de polisilicio, figura 27 a). De esta manera se evitaba el problema de la falta de adherencia, obteniendo mejores porcentajes de fabricación de los dispositivos. En la figura 27 b) se pueden ver los microchips después de la liberación de la oblea.

a)



b)

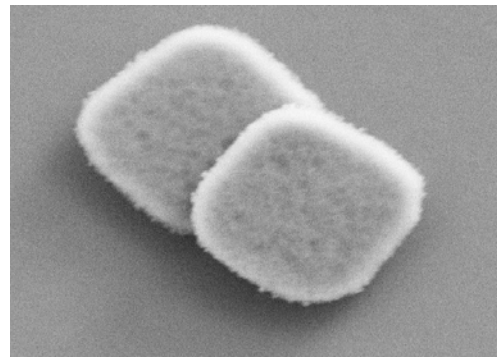


Figura 27. a) Fotografía de microscopio óptico a 1000x de chips de oro – polisilicio, b) imagen SEM de chips de oro– polisilicio después del ataque de HF.

5.4 - Microchips de platino y platino-polisilicio

Se fabricaron chips de platino, con los cuales se realizarán estudios de viabilidad celular para su aplicación biológica en el grupo de la Dra. Teresa Suarez (CIB-CSIC). Posteriormente se fabricaron chips de platino-polisilicio, se espera que su aplicación sea favorable gracias a las propiedades antioxidantes del platino, reduciendo así el estrés oxidativo que presentan las células vivas. En las figuras 28 y 29 pueden verse imágenes de los chips después de la liberación de la oblea, dando en ambos casos excelentes resultados de fabricación.

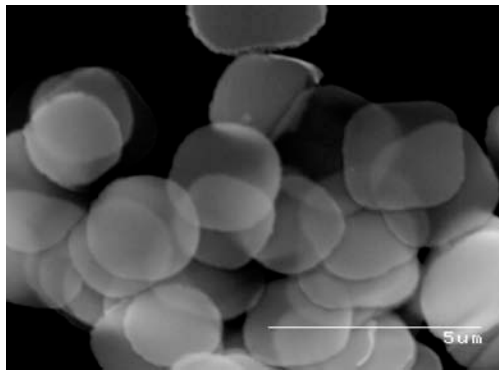
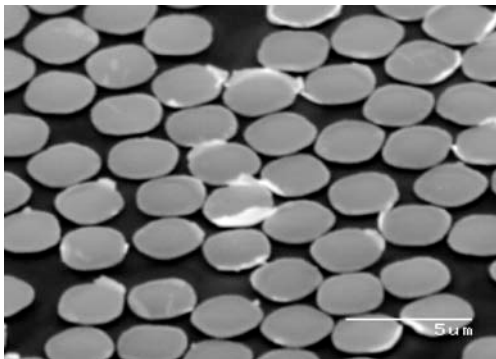


Figura 28. Imagen SEM de chips de platino después del ataque de HF.

a)



b)

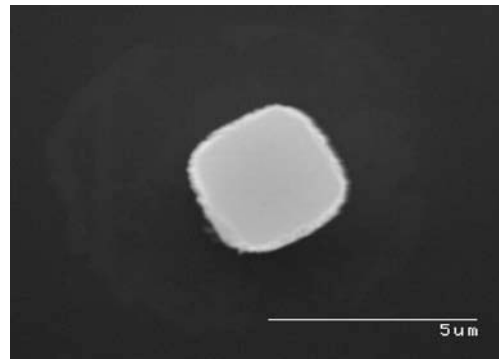


Figura 29. Imágenes SEM de chips de platino - polisilicio después del ataque de HF.

5.5 - Microchips magnéticos

La fabricación de los microchips magnéticos en el momento de la entrega de esta memoria se encuentran en el periodo final de su de fabricación en la “Sala Blanca Integrada de Micro y Nano fabricación” del IMB-CNM.

Se realizaron los pasos de deposición de 100 nm de titanio, 100 nm de níquel y 100 nm de oro, observando hasta ese momento buenos resultados de fabricación.

En la figura 30 puede verse una imagen al microscopio óptico de la oblea con estos chips antes del crecimiento de la capa de Co/Ni, que es la que dotará a los dispositivos de sus características magnéticas.

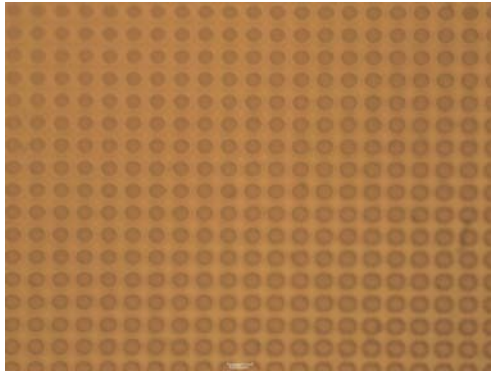


Figura 30. Imagen de microscopio óptico a 1000x de microchips magnéticos de $3\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m}$, antes del crecimiento Co/Ni.

6 - Conclusiones y próximos estudios

En esta memoria de investigación se ha intentado dar un ejemplo de cómo la Microelectrónica y la Biología Celular pueden complementarse.

Dando solución a la necesidad de obtener dispositivos etiquetadores a la escala celular, hemos demostrado que la fabricación de microcódigos de polisilicio como identificadores extracelulares es posible y además biocompatible. Y gracias al efecto velcro de los nanohilos de silicio, se ha creado un nuevo tipo de adhesión física de forma viable y a la nanoescala. Además, ya que en algunos casos la lectura de los códigos presentaba cierta dificultad, hemos solventado este inconveniente diseñando y fabricando un tipo nuevo de microcódigos con características magnéticas, donde éstos pueden dirigirse a la dirección deseada mediante campos magnéticos externos.

Con respecto al diseño y fabricación de microchips, hemos demostrado que la fabricación de dispositivos bifuncionales y su utilización como sensores y actuadores mediante la doble funcionalización química es posible. También, en un futuro podremos reducir el estrés oxidativo de las células mediante microchips de platino y platino-polisilicio. Por último, surgiendo la necesidad de realizar un tipo de clasificación celular, diseñamos y fabricamos dispositivos capaces de ser manipulados mediante campos magnéticos, y de esta manera tener funciones como clasificadores celulares.

En el futuro se realizará un estudio de viabilidad celular, para conocer exactamente el impacto de los códigos de polisilicio y los nanohilos de silicio en el medio celular. Se realizarán también mediciones para comprobar la fuerza de adhesión que poseen estos nanohilos sobre diferentes superficies. Además se trabajará en las futuras aplicaciones de los microchips bifuncionales, como sensores y actuadores en el medio celular. Y en las aplicaciones de los microcódigos y microchips magnéticos, en manipulación y clasificación celular respectivamente.

Por último, se seguirán diseñando nuevas tecnologías para la fabricación de nuevos tipos dispositivos, y así dotarlos de nuevas y variadas aplicaciones.

Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por el proyecto MINAHE 3 MEC-TEC2008-06883-CO3. Además personalmente me gustaría agradecer al Ministerio de Ciencia e Innovación la ayuda con número BES-2009-020415 de Formación de Personal Investigador que actualmente disfruto. También quisiera agradecer la ayuda prestada al personal de Sala Blanca del IMB-CNM, y a Marta Duch, responsable del Laboratorio de Microsistemas, donde se ha llevado a cabo la mayor parte de trabajo experimental de este estudio. Por último agradecer su trabajo a Sergi Novo y a Tània Patiño en la Unitat de Biologia Cel·lular de la Facultat de Biociències de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Publicaciones

El trabajo desarrollado en esta memoria de investigación basado en los microcódigos de polisilicio con nanohilos de silicio, ha sido aceptado para ser presentado en forma de poster bajo el nombre de *Silicon Nanowire to attach inorganic microdevices to biological material*, en la *Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, μ TAS*, que se celebrará el próximo mes de octubre de 2010 en Holanda.

Bibliografía

1. Weibel, D. B., DiLucio, W. R. and Whitesides, G. M. “*Microfabrication meets microbiology*”. *Nature Rev. Microbiol.* **2007**, 5, 209 - 218.
2. Wagner, V., Dullaart, A., Bock, A. K. and Zweck, A. “*The emerging nanomedicine landscape*”. *Nature Biotech.* **2006**, 24, 1211 - 1217.
3. Salata, O. V. “*Applications of nanoparticles in biology and medicine*” *Journal of Nanobiotechnology.* **2004**, 2, 1-6.
4. Gwinn, R. M. and Vallyathan, V. “*Nanoparticles: Health Effects-Pros and Cons.*” *Environmental Health Perspectives.* 2006,12, 1818-1825.
5. Ferrari, M. “*Cancer nanotechnology: opportunities and challenges*”. *Nat. Rev. Cancer.* **2005**, 5, 161 - 171.
6. Silva, G. A. “*Neuroscience nanotechnology: progress, opportunities and challenges*”. *Nat. Rev. Neurosci.* **2006**, 7, 65 - 74.
7. H. Andersson and A. Van den Berg. “*Microtechnologies and nanotechnologies for single-cell analysis*”. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, 15, 44 - 49.
8. Bousse, L. “*Whole cell biosensors*”. *Sens. Actuators, B.* **1996**, 34, 270 - 275.
9. Whitesides, G. M. “*The ‘right’ size in nanobiotechnology*”. *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 1161 - 1165.
10. McKnight, T. E., Melechko, A. V., Hensley, D. K., Mann, D. G. J., Griffin, G. D. and Simpson, M. L. “*Tracking Gene Expression after DNA Delivery Using Spatially Indexed Nanofiber Arrays*”. *Nano Lett.* **2004**, 4, 1213-1219.
11. Cai, D., Mataraza, J. M., Qin, Z. H.; Huang, Z., Huang, J., Chiles, T. C., Carnahan, D., Kempa, K. and Ren, Z. “*Highly efficient molecular delivery into mammalian cells using carbon nanotube spearing*”. *Nat. Methods.* **2005**, 2, 449-454.
12. Fernandez-Rosas, E., Gómez-Martínez, R., Ibáñez, E., Barrios, L., Duch, M., Esteve, J., Nogues, C., and Plaza, J.A. “*Intracellular polysilicon barcodes for cell tracking*”. *Small.* **2009**, 5, 2433 - 2439.
13. Finkel, N.H., Lou, X., Wang, C. and He, L., “*Barcoding the microworld*”. *Analytical Chemistry.* **2004**, 76, 19.
14. Gómez-Martínez, R., Vázquez, P., Duch, M., Muriano, A., Pinacho, D., Sanvicens, N., Sánchez-Baeza, F., Boya, P., de la Rosa, E. J., Esteve, J., Suárez, T. and Plaza, J. A. “*Intracelular Silicon Chips in Living Cells*”. *Small.* **2009**, 6, 499-502.
15. Arzt, E., Gorb, S. and Spolenak, R. “*From micro to nano contacts in biological attachment devices*”. *PNAS.* 2003, 19, 10603–10606.
16. Fernández-Regúlez, M., Plaza, J.A., Lora-Tamayo, E. and San Paulo, A. “*Lithography guided horizontal growth of silicon nanowires for the fabrication of ultrasensitive piezoresistive strain gauges*”. *Microelectronic Engineering.* **2010**, 87, 1270–1273.
17. Kim, J., Takahashi, M., Shimizu, T., Shirasawa, T., Kajita, M., Kanayama, A. and Miyamoto, Y. “*Effects of a potent antioxidant, platinum nanoparticle, on the lifespan of Caenorhabditis elegans*”. *Mechanisms of Ageing and Development.* **2008**, 129, 322–331.

Anexo

Listado de dispositivos liberados

Descripción	n° <i>Run</i>	n° <i>Oblea</i>	n° Tubo
Códigos de polisilicio	5075	1	U, V, W, X, Y, Z, AA, AB, AC, AD, AE, AF
Códigos de polisilicio con nanohilos de silicio	5075	1	A, B, C, D
Microchips de oro	5247	3	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, Ñ, O, P, Q
Microchips de oro y polisilicio	5247	2	A, B, C, D, E, F
Microchips de platino	4736	2	I, J, K, L, M, N, O, P
Microchips de platino y polisilicio	4736	1	I, J, K, L, M, N, O, P