

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Desenvolupament i Integració de Sensors de Llarga Vida en Sistemes
Lab-on-a-Chip per al Monitoratge de Cultius Cel·lulars

Alexandre Moreno Diaz

Tesi Doctoral
Doctorat en Química

Supervisat per:
Dr. Xavier Muñoz Berbel
Dra. Cecilia Jiménez Jorquera
Dr. Pablo Giménez Gómez

Tutoritzat per:
Dr. Gonzalo Guirado López

Departament de Química
Institut de Microelectrònica de Barcelona
Facultat de Ciències

2025

La present tesi, titulada “Desenvolupament i Integració de Sensors de Llarga Vida en Sistemes Lab-on-a-Chip per al Monitoratge de Cultius Cel·lulars”, es presentada per Alexandre Moreno Diaz per optar al títol de Doctorat en Química.

Aquesta tesi ha sigut realitzada a l'Institut de Microelectrònica de Barcelona (IMB-CNM), en el grup de transductors químics (GTQ), sota la supervisió dels Dr. Xavier Muñoz Berbel, Dra. Cecilia Jiménez Jorquera i Dr. Pablo Giménez Gómez.

Aquesta tesi ha sigut realitzada gràcies al programa: PROYECTOS DE GENERACIÓN DE CONOCIMIENTO donada per el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MICIU), (AEI) amb la referència PID2021-127653NB-C21 i la beca FPI, també donada per el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MICIU), (AEI) amb la referència PRE2019-088338.

Amb l'aprovació de:

Dr. Xavier Muñoz
Berbel
(Director)

Dra. Cecilia Jiménez
Jorquera
(Director)

Dr. Pablo Giménez
Gómez
(Director)

Dr. Gonzalo Guirado
López
(Tutor)

Alexandre Moreno Diaz
(Autor)



Agraïments

Aquesta tesi no hauria estat possible sense el suport tècnic i humà de molts companys i companyes del CNM-IMB i de la UAB. A tots ells, gràcies per acompanyar-me i ajudar-me a fer realitat aquest projecte.

Vull agrair especialment als meus directors, Xavi, Cecília i Pablo. Vull expressar el meu sincer agraïment per la seva guia i suport al llarg d'aquesta tesi. Al Xavi, per compartir la seva visió científica i la seva habilitat per trobar solucions als problemes. A la Cecília, pel seu acompanyament atent i discret, que m'ha permès treballar amb llibertat però sabent que sempre tenia un suport ferm al darrere. A en Pablo, per fer que aquest camí fos molt més fàcil amb la seva proximitat. A més, vull agrair al meu tutor, Gonzalo, per la seva gran disposició a resoldre qualsevol dubte o a disposar de qualsevol recurs.

Aquesta tesi és el que és gràcies a múltiples col·laboracions, ajudes i suport de diverses persones i institucions. Ja per avançat, sento no poder dir els noms de tots aquells que han contribuït en aquesta tesi i en el meu desenvolupament professional. Vull agrair als meus estudiants de grau i de màster, Biel, Aina i Arnau, per la seva contribució en l'aplicació dels sensors i en el procés de preparació de cultius cel·lulars. Dono les gràcies a Salvador Aznar per proporcionar la fibroïna utilitzada en aquest treball. També agraeixo enormement la col·laboració de la Cristina, Marta i Rosalía en la Universitat Internacional de Catalunya, per la seva implicació en els cultius cel·lulars per implementar els sensors. Además, a Francisco Perdignes, Carmen Aracil i Jose Manuel Quero de la Universidad de Sevilla por su colaboración en la fabricación y caracterización de los MEA. També vull expressar el meu agraïment als tècnics i enginyers, de sala blanca del IMB-CNM per la seva gran tasca en la fabricació dels xips i per la seva disponibilitat per respondre dubtes durant el procés. També agraeixo al Grup de Transductors Químics (aquí incloc a tothom,

però especialment a Alfredo, Juanma, Carlos, Jiri, Yohana i molts més) per les seves explicacions i ajudes. De totes aquestes persones m'emporto molt coneixement i bones relacions.

Vull destacar el suport dels meus companys de despatx (Alfredo, Maria, David, Mabel, Álvaro i Gonzalo). Agrair també a la comissió d'actes socials, que han donat un toc social i de diversió en aquesta etapa. Vull a més agrair als companys predoctorals, Javi, Marco, Meritxell, Amparo, Aida i a tot el col·lectiu per tot el companyerisme que s'hi respira. Com no esmentar l'etapa com a representant del col·lectiu predoctoral del centre junt amb la Laura! I en definitiva, agrair a tot l'IMB-CNM pels recursos i coneixements que m'ha pogut brindar.

No puc deixar de mencionar el suport de la meva família i amics i pel seu interès en el desenvolupament d'aquesta tesi. El recolzament de tots els amics; petit comitè, abelles, annnes, koshi kaiten i més ha sigut vital. Vull agrair també el suport dels meus germans, de l'Anabel i el David i la petita. A més, i especialment, vull agrair als meus pares per tot el seu suport incondicional, tant indispensable.

Vull aprofitar per recordar la Isabel, que sempre va estar disposada a ajudar als altres sense dubtar-ho. Sens dubte, ella hauria estat la primera en oferir el seu suport en aquesta etapa tant demandant. Sempre et recordarem.

Finalment, vull agrair de tot cor a la Noèlia. No només per debatre en l'àmbit científic, sinó sobretot per estar al meu costat durant tot el camí. Gràcies per ser-hi, per acompanyar-me, per escoltar, per entendre'm, per estar en els moments bons i també en els difícils. Les paraules no són suficients per expressar com d'essencial ets.

Índex

1. Motivació	25
2. Introducció	31
2.1. Sistemes <i>lab-on-a-chip</i> : Definició, origen i evolució	33
2.2. Principals característiques dels sistemes lab-on-a-chip	37
2.3. Limitacions i camps d'aplicació dels sistemes lab-on-a-chip	39
2.4. Monitorització de cèl·lules en sistemes lab-on-chip	41
2.5. Estat de l'art dels sistemes <i>lab-on-a-chip</i> per cultiu cel·lular integrant sensors i biosensors	77
3. Objectius.....	87
4. Materials i Mètodes.....	91
4.1. Reactius.	93
4.2. Fabricació dels transductors electroquímics	97
5. Resultats.....	143
5.1. Sensors ISFETs funcionalitzats amb fibroïna de seda	145
5.2. Sensors amperomètrics enzimàtics funcionalitzats amb fibroïna	173
5.3. Sensor òptic d'absorbància per adipòcits.....	215
6. Discussió general	237
7. Conclusions	243
8. Perspectives de futur	247
9. Referències	251

10.	Annexos	285
	Annex A: Dissenys dels prototips	287
	Annex B: Matriu de microelèctrodes amb sensor de temperatura.	291
	Annex C: Sensors de clorur ChemFETs	305
	Annex D: Currículum abreujat	317

Llista d'abreviacions, unitats i símbols

Abreviacions

ATR	Reflectància total atenuada
CE	Contraelèctrode
CMOS	Metall Òxid Semiconductor Complementari
CV	Voltametria cíclica
ChemFET	Transistor químic d'efecte de camp
DOPC	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DRX	Difracció de raigs X
ESI	Elèctrode selectiu d'ions
Fc	Ferricianur
FBQ	Tetrafluorbenzoquinona
FBS	Sèrum fetal boví
FTIR	Transformada de Fourier infraroja
GOx	Glucosa oxidasa
HPLC	Cromatografia de líquids d'alta resolució
HQ	Hidroquinona
HRP	Peroxidasa de rave
IHP	Capa interna de Helmholtz
IMB-CNM	Institut de microelectrònica de Barcelona – Centre nacional de microelectrònica
IR	Infraroig
IUPAC	Unió Internacional de Química Pura i Aplicada
ISFET	Transistor d'efecte de camp sensible a ions
LoC	<i>Lab-on-a-Chip</i>
LOQ	Límit de quantificació
LOD	Límit de detecció
MOSFET	Transistor d'efecte de camp metall-òxid- semiconductor

NMOS	Transistor d'òxid metàl·lic-semiconductor de tipus n
OHP	Capa externa de Helmholtz
PCB	Placa de circuit imprès
PDMS	Polidimetilsiloxà
PECVD	Deposició química de vapor assistida per plasma
PMMA	Polimetilmetacrilat
PTQ	Fenantrenoquinona
PZC	Punt de càrrega nul·la
RE	Elèctrode de referència
SEM	Microscopi electrònic de rastreig
SF	Fibroïna de la seda
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
TMB ox	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina diimina
UIC	Universitat Internacional de Catalunya
US	Universidad de Sevilla
UV	Ultraviolat
UV-Vis	Ultraviolat-Visible
WE	Elèctrode de treball

Unitats

A	Amper
Å	Àngstrom
C	Coulomb
°C	Grau Celsius
g	Gram
h	Hora
K	Kelvin
kDa	Kilodaltons

L	Litre
m	Metre
min	Minut
psi	Lliura per polzada quadrada
s	Segon
V	Volt
W	Watt

Símbols i constants

c	Concentració (M)
E	Potencial (V)
ϵ	Coefficient molar d'extinció ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
F	Constant de Faraday (96485 C mol^{-1})
GM_{max}	transconductància màxima (μA)
h	Constant de Planck ($6,62 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$)
i	Intensitat de corrent (A)
I_D	Corrent de drenatge (A)
l	Longitud (m)
λ	Longitud d'ona (nm)
m	Massa (g)
M	Molar (mol L^{-1})
n	Nombre d'electrons, nombre de mostres
Q	Càrrega elèctrica (C)
R	Constant dels gasos ($8,31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)
t	Temps (s)
T	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
V_{GS}	Potencial de porta (V)

Llista de taules i figures

Figura 2.1.1: Primer sistema lab-on-a-chip. Utilitzat per cromatografia de gasos (1979).....	35
Figura 2.4.1: Components tecnològics d'un sensor.....	43
Figura 2.4.2: Esquema sobre la refracció i la reflexió total interna (TIR).	49
Figura 2.4.3: Esquema de guia òptica cel·lular	50
Figura 2.4.4: Interfícies d'un ISFET submergit en un electròlit.	57
Figura 2.4.5: Esquema d'absorcions en la superfície de porta d'un ISFET de nitrur.	58
Figura 2.4.6: Estructura de doble capa en la interfície entre el dielèctric i la solució.	59
Figura 2.4.7: Cel·la electroquímica de tres elèctrodes.	65
Figura 2.4.8: Reacció d'oxidació de la glucosa per l'oxigen catalitzada per l'enzim GOx.	69
Figura 2.4.9: Evolució dels sensors enzimàtics de glucosa: de la primera a la tercera generació.	71
Figura 2.4.10: Estructura molecular de la fibroïna de la seda (A) i esquema dels dominis en l'estructura de la fibroïna (B).	76
Figura 4.1.1: Protocol per l'obtenció de solució de fibroïna 1	95
Figura 4.1.2: Protocol per l'obtenció de solució de fibroïna 2	96
Figura 4.1.3: Protocol per l'obtenció de solució de fibroïna 3	97
Figura 4.2.1: Arquitectura dels ISFETs funcionalitzats amb fibroïna ..	98
Figura 4.2.2: Esquema del procés de fabricació d'un ISFET	100
Figura 4.2.3: Sensor ISFET	101
Figura 4.2.4: Disseny de la cambra d'ISFETs.	102
Figura 4.2.5: Il·lustració capa per capa de la fabricació de la cambra d'ISFETs i el seu muntatge.	104

Figura 4.2.6: Determinació dels paràmetres electroquímics dels ISFETs	107
Figura 4.2.7: Esquema d'un ISFET i sistema de mesura	108
Figura 4.2.8: Il·lustració capa per capa de la fabricació de la cambra de cultiu i el seu muntatge.	112
Figura 4.2.9: Il·lustració capa per capa de la fabricació de la cambra espectroscòpica i el seu muntatge.	113
Figura 4.2.10: Esquema experimental del circuit circular format per la cambra de cultiu, la cambra d'espectrofotometria i la cambra dels ISFET.	114
Figura 4.2.11: Disseny del xip amperomètric.	115
Figura 4.2.12: Representació esquemàtica del procés de fabricació	117
Figura 4.2.13: Registre de l'activació electroquímica dels elèctrodes de Pt.	119
Figura 4.2.14: Validació i mesura de l'àrea activa de l'elèctrode	119
Figura 4.2.15: Il·lustració capa per capa de la fabricació de la cambra estàtica per xips amperomètrics i el seu muntatge.	122
Figura 4.2.16: Il·lustració capa per capa de la fabricació de la cambra de flux per xips amperomètrics i el seu muntatge.	123
Figura 4.2.17: Representació esquemàtica de la simulació del sensor de glucosa	127
Figura 4.2.18: Disseny de la plataforma òptica de PMMA.	135
Figura 4.2.19: Dispositiu òptic amb PMMA.	136
Figura 4.2.20: Disseny del dispositiu integrat òptic en placa de Petri.	137
Figura 4.2.21: Dispositiu òptic en placa de Petri	138
Figura 4.2.22: Connector per a SMA905.	139
Figura 5.1.1: Esquema de la funcionalització de la seda de la porta de l'ISFET.	150

Figura 5.1.2: Caracterització òptica d'ISFETs amb membranes de fibroïna	151
Figura 5.1.3: Els espectres IR de la solució aquosa de fibroïna de seda, fibroïna de seda no cristal·litzada i cristal·litzada	152
Figura 5.1.4: Estudi elèctrics ISFETs	153
Figura 5.1.5: Estudi del temps de resposta.	154
Figura 5.1.6: Estudi de la deriva dels ISFETs	155
Figura 5.1.7: Estudis d'histèresi	156
Figura 5.1.8: Estudis de <i>biofouling</i> 1	158
Figura 5.1.9: Estudis de <i>biofouling</i> 2	159
Figura 5.1.10: Mesures discontinües amb cultius cel·lulars 1	161
Figura 5.1.11: Gràfic de calibratge per a la mesura òptica del pH....	162
Figura 5.1.12: Mesures discontinües amb cultius cel·lulars 2	163
Figura 5.1.13: Tractament del senyal de la monitorització del cultiu de ronyó (HEK293T) amb ISFETs	165
Figura 5.1.14: Monitoratge de pH durant 70 hores	167
Figura 5.1.15: Monitoratge a llarg termini del pH en cultius cel·lulars amb ISFETs	171
Figura 5.2.1: Estabilitat del ferricianur en films basats en fibroïna....	180
Figura 5.2.2: Estabilitat de quinones en films basats en fibroïna	181
Figura 5.2.3: Estabilitat de la TMB en films basats en fibroïna	182
Figura 5.2.4: Voltametria cíclica del TMB a diferents valors de pH i comportament redox dependent de la protonació	184
Figura 5.2.5: Pic catalític de TMB i GOx. Resposta electroquímica del TMB sota addicions seqüencials de glucosa i GOx.....	185
Figura 5.2.6: Optimització de la composició de la membrana	188
Figura 5.2.7: Estudi del gruix de membrana.....	189
Figura 5.2.8: Espectres FTIR de pel·lícules de fibroïna en formes amorfa i cristal·lina, així com fibroïna dopada amb GOx i amb GOx + TMB.	191

Figura 5.2.9: Difracció de Raigs X: Patrons de difracció de membranes de fibroïna de seda amb i sense glucosa oxidasa i TMB.....	193
Figura 5.2.10: Optimització del potencial: Corbes de calibratge amb diferents potencials aplicats	195
Figura 5.2.11: Voltametria cíclica del medi DMEM.....	196
Figura 5.2.12: Evolució temporal simulada de les concentracions de glucosa i TMB	198
Figura 5.2.13: Anàlisi amperomètrica del sensor dependent del cabal: Corrent final estable mesurat amb 0 mM i 3 mM de glucosa a diferents fluxos.	199
Figura 5.2.14: Resposta electroquímica del sensor de glucosa.	200
Figura 5.2.15: Muntatge experimental per a l'avaluació de l'estabilitat del sensor de glucosa.	202
Figura 5.2.16: Monitoratge a curt termini del sensor en condicions alternants de PBS i PBS amb 3 mM de glucosa.	203
Figura 5.2.17: Monitoratge de 60 hores	204
Figura 5.2.18: Monitoratge a llarg termini alternant DMEM i DMEM amb 3 mM de glucosa.....	206
Figura 5.2.19: Estudi d'interferències.....	208
Figura 5.2.20: Cultius cel·lulars Neuro-2a	210
Figura 5.2.21: Comparació de mètodes de monitoratge de glucosa.....	211
Figura 5.2.22: Efecte de l'AICAR sobre el metabolisme de la glucosa.. ..	212
Figura 5.2.23: Validació del sensor de glucosa.....	214
Figura 5.3.1: Diferenciació de preadipòcits a adipòcits blancs	218
Figura 5.3.2: Evolució temporal de la diferenciació adipocitària en la cambra de PMMA.	220
Figura 5.3.3: Evolució temporal de la diferenciació adipocitària en substrat de poliestirè.....	221

Figura 5.3.4: Comparació de la confluència al Dia 4 entre la placa de Petri de poliestirè (esquerra) i el dispositiu de PMMA (dreta).....	222
Figura 5.3.5: Intensitat espectral del sensor òptic amb i sense el connector PMMA-SMA	224
Figura 5.3.6: Calibratge de l'absorció de colorants en una cubeta de quars de 1 cm	226
Figura 5.3.7: Calibratge utilitzant el sensor òptic amb fibra òptica integrada a la placa de Petri modificada	228
Figura 5.3.8: Esquema del protocol de monitoratge òptic en temps real	229
Figura 5.3.9: Espectres d'absorció i imatges de microscòpia durant la diferenciació adipocitària	231
Figura 5.3.10: Evolució temporal de l'absorbància mitjana entre 600 i 700 nm durant la diferenciació d'adipòcits.....	232
Figura 5.3.11: Tenyit <i>post-hoc</i> amb Oil Red O	235
Figura A.1: Disseny de la cambra per espectrofotometria.....	287
Figura A.2: Disseny de la cambra fluídica per cultiu.....	287
Figura A.3: Disseny de la cambra estàtica per amperomètrics.....	288
Figura A.4: Disseny de la cambra fluídica per amperomètrics.....	289
Figura B.1: Disseny general de la MEA.....	293
Figura B.2: Estructures per a la detecció de temperatura, escalfament localitzat i proves de polsos.	294
Figura B.3: Estructures de test i alineament.....	296
Figura B.4: Procés de fabricació dels dispositius MEA.....	299
Figura B.5 Inspecció estructural dels MEAs.....	301
Figura B.6: Valors experimentals de resistència i tensió durant les variacions de temperatura.....	302

Figura B.7: Evolució temporal de la tensió de sortida durant el funcionament del microescalfador sota 30 V constants en aigua ultrapura.	303
Figura C.1: Esquema i mesures dels xips ISFET d'òxid.	307
Figura C.2: Fabricació de ChemFET a partir d'un ISFET d'òxid.	308
Figura C.3: Calibratges de diferents concentracions de la membrana fibroïna-ionòfor.	309
Figura C.4: Estudi de la histèresi en ChemFETs.	311
Figura C.5: Estudi FTIR de l'ionòfor TDDMACI i la fibroïna.	313
Figura C.6: Estudi d'interferències del ChemFET sensible al clorur.	315

Resum

El desenvolupament de sistemes de monitorització contínua i de llarg termini per a cultius cel·lulars representa un desafiament clau en el camp de la biologia. Malgrat els avenços en biosensors, la seva aplicació directa en entorns complexos com els medis de cultiu cel·lular sovint es veu limitada per problemes com la deriva del senyal o l'envelliment associat, per exemple, a l'adsorció inespecífica de molècules a la superfície del sensor (en anglès *biofouling*), i que resulten en una curta i important reducció del temps de vida útil dels sensors. Aquesta tesi doctoral té com a objectiu principal desenvolupar sensors electroquímics i fotònics robustos i integrables, capaços de monitorar paràmetres químics i metabòlics rellevants en cultius cel·lulars durant llargs períodes de temps, superant les limitacions actuals dels dispositius comercials. Per assolir-ho, es proposa l'ús de fibroïna de seda com a material funcional per millorar la biocompatibilitat, estabilitat i resistència al biofouling dels sensors electroquímics.

En primer lloc, es van modificar sensors potenciomètrics tipus ISFET (de l'anglès *ion-sensitive field-effect transistor*) per a la detecció de pH, als quals s'hi va aplicar una capa de fibroïna cristal·litzada que actuava com a membrana *antifouling*. Aquests sensors es van caracteritzar electroquímicament i es van validar en cultius cel·lulars de Neuro-2a, HEK-293T i cèl·lules renals. Els resultats mostren una millora substancial en estabilitat i reproductibilitat de les mesures proporcionades pels sensors. Els ISFETs amb membranes de seda proporcionaven resultats comparables als proporcionats per un elèctrode de vidre (índex de Willmott de fins a 0,97) o a un ISFET de pH convencional, però amb una durabilitat molt superior a aquest darrer,

incrementant el seu temps de vida de 8 a 70 hores sense necessitat de neteja ni recalibratge. Aquest avenç permet mesurar l'acidificació del medi i estudiar processos com la resposta a fàrmacs de forma fiable i reproducible, fins i tot amb cèl·lules amb metabolismes lents com ara les neurones.

En segon lloc, es va desenvolupar un sensor amperomètric enzimàtic per a la detecció de glucosa, utilitzant glucosa oxidasa (GOx) i el mediador tetra-metil benzidina (TMB), tots dos immobilitzats en la superfície sensora mitjançant atrapament en una matriu de fibroïna. Aquest sensor es va integrar en un sistema microfluídic per a la seva aplicació directa en el monitoratge de cultius cel·lulars. Es va demostrar una alta sensibilitat, un límit de detecció baix i una operativitat prolongada durant més de 90 hores sense necessitat de neteja ni recalibratge. El sensor va ser capaç de detectar dinàmicament canvis en el consum de glucosa i la resposta a inhibidors metabòlics en cultius de Neuro-2a, mostrant una elevada correlació amb mètodes comercials.

En tercer lloc, es va explorar un sensor òptic per al seguiment de la diferenciació cel·lular en temps real. Es van utilitzar guies òptiques cel·lulars per detectar tant la dispersió de la llum com l'absorció. Aquest sistema es va aplicar amb èxit al monitoratge de la diferenciació de pre-adipòcits a adipòcits blancs, mostrant capacitat per detectar canvis en la morfologia cel·lular i en l'acumulació lipídica. Aquest sensor ofereix una via no invasiva i contínua per al seguiment de cultius cel·lulars.

A més dels tres sensors principals, es va dur a terme el disseny i la caracterització de matrius de microelèctrodes (MEA) per a la detecció d'activitat elèctrica cel·lular, així com el desenvolupament exploratori de

sensors ChemFET amb fibroïna per a la mesura de clorurs. Aquestes proves de concepte aporten una base per a futures línies d'investigació.

En conjunt, aquesta tesi demostra que la integració de sensors potenciomètrics i amperomètrics funcionalitzats amb fibroïna i de sensors òptics és una estratègia efectiva per superar les limitacions tradicionals dels sensors en entorns de cultiu cel·lular. Els resultats obtinguts mostren que aquests sensors són capaços d'oferir una resposta fiable i estable durant períodes prolongats, contribuint així a la creació de sistemes lab-on-a-chip més robustos, autònoms i precisos. Aquests avenços obren la porta a noves aplicacions en recerca biomèdica, farmacologia i producció biotecnològica de cèl·lules i teixits.

Resumen

El desarrollo de sistemas de monitorización continua y de largo plazo para cultivos celulares supone un desafío clave en el campo de la biología. A pesar de los avances en biosensores, su aplicación directa en entornos complejos como los medios de cultivo celular a menudo se ve limitada por problemas como la deriva de la señal o el envejecimiento asociado, por ejemplo, a la adsorción inespecífica de moléculas en la superficie del sensor (en inglés *biofouling*), y que resultan en una corta duración. Esta tesis doctoral tiene como objetivo principal desarrollar sensores electroquímicos y fotónicos robustos e integrables, capaces de monitorizar parámetros químicos y metabólicos relevantes en cultivos celulares durante largos períodos de tiempo, superando las limitaciones actuales de los dispositivos comerciales. Para ello, se propone el uso de fibroína de seda como material funcional para mejorar la biocompatibilidad, estabilidad y resistencia al *biofouling* de los sensores electroquímicos.

En primer lugar, se modificaron sensores potenciométricos tipo ISFET (del inglés *ion-sensitive field-effect transistor*) para la detección de pH, a los que se aplicó una capa de fibroína cristalizada que actuaba como membrana *antifouling*. Estos sensores se caracterizaron electroquímicamente y se validaron en cultivos celulares de Neuro-2a, HEK-293T y células renales. Los resultados muestran una mejora sustancial en estabilidad y reproducibilidad de las medidas proporcionadas por el sensor. Los ISFETs con membranas de seda proporcionaban resultados comparables a los proporcionados por un electrodo de vidrio (índice de Willmott de hasta 0,97) o un ISFET de pH convencional, pero con una durabilidad muy superior a este último,

incrementando su tiempo de vida de 8 a 70 horas sin necesidad de limpieza ni recalibrado. Este avance permite medir la acidificación del medio y estudiar procesos como la respuesta a fármacos de forma fiable y reproducible, incluso con células con metabolismos lentos como las neuronas.

En segundo lugar, se desarrolló un sensor amperométrico enzimático para la detección de glucosa, utilizando glucosa oxidasa (GOx) y el mediador tetra-metil benzidina (TMB), ambos inmovilizados en la superficie sensora mediante atrapamiento en una matriz de fibroína. Este sensor se integró en un sistema microfluídico para su aplicación directa en la monitorización de cultivos celulares. Se demostró una alta sensibilidad, un límite de detección bajo y una prolongada operatividad durante más de 90 horas sin necesidad de limpieza ni recalibrado. El sensor fue capaz de detectar dinámicamente cambios en el consumo de glucosa y la respuesta a inhibidores metabólicos en cultivos de Neuro-2a, mostrando una elevada correlación con métodos comerciales.

En tercer lugar, se exploró un sensor óptico para el seguimiento de la diferenciación celular en tiempo real. Se utilizaron guías ópticas celulares para detectar tanto la dispersión de la luz como la absorción. Este sistema se aplicó con éxito en la monitorización de la diferenciación de pre-adipocitos a adipocitos blancos, mostrando capacidad para detectar cambios en la morfología celular y en la acumulación lipídica. Este sensor ofrece una vía no invasiva y continua para el seguimiento de cultivos celulares.

Además de los tres sensores principales, se llevó a cabo el diseño y caracterización de matrices de microelectrodos (MEA) para la detección

de actividad eléctrica celular, así como el desarrollo exploratorio de sensores ChemFET con fibroína para la medida de cloruros. Estas pruebas de concepto aportan una base para futuras líneas de investigación.

En conjunto, esta tesis demuestra que la integración de sensores potenciométricos, amperométricos y ópticos funcionalizados con fibroína es una estrategia efectiva para superar las limitaciones tradicionales de los sensores en entornos de cultivo celular. Los resultados obtenidos muestran que estos sensores son capaces de ofrecer una respuesta fiable y estable durante períodos prolongados, contribuyendo así a la creación de sistemas lab-on-a-chip más robustos, autónomos y precisos. Estos avances abren la puerta a nuevas aplicaciones en investigación biomédica, farmacología y producción biotecnológica de células y tejidos.

Abstract

The development of continuous and long-term monitoring systems for cell cultures represents a key challenge in the field of biology. Despite advances in biosensors, their direct application in complex environments such as cell culture media is often limited by problems such as signal drift or aging associated, for example, with nonspecific adsorption of molecules on the sensor surface (biofouling), which result in a short and significant reduction in the useful life of the sensors. The main objective of this doctoral thesis is to develop robust and integrable electrochemical and photonic sensors, capable of monitoring relevant chemical and metabolic parameters in cell cultures for long periods of time, overcoming the current limitations of commercial devices. To achieve this, the use of silk fibroin is proposed as a functional material to improve the biocompatibility, stability and biofouling resistance of electrochemical sensors.

First, potentiometric ISFET (ion-sensitive field-effect transistor) sensors were modified for pH detection, to which a layer of crystallized fibroin was applied that acted as an antifouling membrane. These sensors were characterized electrochemically and validated in Neuro-2a, HEK-293T and kidney cell cultures. The results show a substantial improvement in stability and reproducibility of the measurements provided by the sensors. ISFETs with silk membranes provided results comparable to those provided by a glass electrode (Willmott index up to 0.97) or a conventional pH ISFET, but with a durability much higher than the latter, increasing their lifetime from 8 to 70 hours without the need for cleaning or recalibration. This advance allows measuring the acidification of the medium and studying processes such as the response to drugs in a

reliable and reproducible way, even with cells with slow metabolisms such as neurons.

Secondly, an enzymatic amperometric sensor was developed for the detection of glucose, using glucose oxidase (GOx) and the mediator tetra-methyl benzidine (TMB), both immobilized on the sensor surface by trapping in a fibroin matrix. This sensor was integrated into a microfluidic system for its direct application in the monitoring of cell cultures. High sensitivity, a low detection limit and prolonged operability for more than 90 hours without the need for cleaning or recalibration were demonstrated. The sensor was able to dynamically detect changes in glucose consumption and the response to metabolic inhibitors in Neuro-2a cultures, showing a high correlation with commercial methods.

Thirdly, an optical sensor was explored for the monitoring of cell differentiation in real time. Cellular optical guides were used to detect both light scattering and absorption. This system was successfully applied to monitor the differentiation of pre-adipocytes to white adipocytes, showing the ability to detect changes in cell morphology and lipid accumulation. This sensor offers a non-invasive and continuous way to monitor cell cultures.

In addition to the three main sensors, the design and characterization of microelectrode arrays (MEA) for the detection of cellular electrical activity was carried out, as well as the exploratory development of ChemFET sensors with fibroin for chloride measurement. These proofs of concept provide a basis for future lines of research.

Overall, this thesis demonstrates that the integration of potentiometric, amperometric and optical sensors functionalized with fibroin is an

effective strategy to overcome the traditional limitations of sensors in cell culture environments. The results obtained show that these sensors are capable of providing a reliable and stable response over extended periods, thus contributing to the creation of more robust, autonomous and precise lab-on-a-chip systems. These advances open the door to new applications in biomedical research, pharmacology and biotechnological production of cells and tissues.

1. Motivació

L'experimentació animal ha estat la base de l'enorme progrés realitzat en medicina en els últims anys. El desenvolupament de fàrmacs, teràpies i cosmètics, entre d'altres, ha requerit nombrosos estudis *in vivo*, amb animals d'experimentació, que han permet identificar els mecanismes associats a les patologies d'interès. No obstant, la Unió Europea, en el marc de la Directiva 2010/63/UE, va proposar una reducció sistemàtica de l'ús d'animals d'experimentació aplicant el principi de les 3R (Reemplaçament, Reducció i Refinament), incentivant l'ús de mètodes alternatius. Fins i tot més restrictius, el Reglament (CE) 1223/2009 prohibeix l'ús d'animals en proves cosmètiques, i el Reglament REACH prioritza mètodes alternatius en l'avaluació de substàncies químiques, com per exemple l'avaluació per extrapolació de substàncies anàlogues.

En aquest context, els estudis *in vitro* amb cultius cel·lulars bi- i tridimensionals s'han posicionat com una de les principals alternatives a l'experimentació animal. Amb l'avantatge de realitzar els assajos amb cèl·lules humanes, aquest models han permès estudiar i entendre els canvis produïts en els mecanismes biològics durant la transició de l'estat de salut a patologia, així com avaluar i desenvolupar nous fàrmacs i tractaments [1], [2], [3]. Malgrat aquests avenços, els sistemes *in vitro* encara tenen limitacions significatives. En primer lloc, fins i tot els models més avançats basats en co-cultius cel·lulars organitzats en estructures 3D no reproduïen completament la complexitat del teixit o òrgan que pretenen replicar. Per tant, aquest models proporcionen resultats no completament comparables als que s'obtidrien en assajos *in vivo*, on cada òrgan i teixit està connectat de forma adequada amb la resta. Per altra banda, la capacitat analítica d'aquests sistemes és força limitada. Des d'un punt de vista estructural, la majoria dels dispositius

d'anàlisis *in vitro* són sistemes microfluídics que integren una regió per al cultiu de cèl·lules (càmera de cultiu) amb canals microfluídics que permeten emular els sistemes de subministra de nutrients en el cos humà. No obstant, el monitoratge dels processos biològics es sol realitzar de forma puntual, la major part de les vegades mitjançant tinció i sistemes de microscòpia avançats, el que implica la manipulació del dispositiu (amb l'associat risc de contaminació). A més, en molts casos, la tinció produeix canvis significatius en el cultiu, el que deriva en mesures de punt final, el que impedeix un monitoratge continu del cultiu. Això redueix enormement la rellevància dels resultats proporcionats per aquest models *in vitro*, limitant la seva capacitat com a substituïts de l'experimentació animal.

Per pal·liar aquestes limitacions, ens els darrers anys s'han realitzat importants avenços a nivell de desenvolupament i integració de sensors i biosensors en entorns per a la monitorització de cultius cel·lulars [4], [5]. No obstant, els medis de cultius són ambients poc favorables per als sensors ja que presenten matrius complexes, amb elevades concentracions de biomolècules, el que accelera el seu envelliment i redueix significativament la seva fiabilitat i temps de vida. Malgrat molts sensors integrats en aquest tipus d'estructures incorporen membranes, sistemes de neteja i/o recalibració, és difícil trobar avui en dia dispositius capaços de mesurar de forma fiable durant els 4 - 7 dies que sol durar un assaig farmacològic convencional.

Per abordar aquest problema, la present tesi es centra en el desenvolupament i integració de sensors de llarga vida útil, capaços de monitoritzar de manera fiable i contínua les condicions del cultiu sense necessitat de manipulacions addicionals. Aquests sensors es basen en l'ús de materials naturals i biocompatibles, com la fibroïna de seda, que aporten estabilitat, resistència al *biofouling* i capacitat per incorporar en

la seva matriu biomacromolècules i estabilitzar-les durant llargs períodes de temps. El desenvolupament de sensors de llarga vida robustos i fiables permetrà millorar significativament el seguiment dels processos biològics associats al desenvolupament de patologies, així com a l'acció de fàrmacs, contribuint finalment a la reducció de l'ús d'animals en recerca.

2. Introducció

Aquest capítol presenta una visió general de l'estat de l'art i del coneixement general per contextualitzar els resultats d'aquesta tesi. Inicialment, es presenta el concepte *lab-on-a-chip*, les seves característiques, evolució i aplicació, amb especial èmfasi en el control de cultius cel·lulars. Finalment, s'analitza la integració de sensors en sistemes *lab-on-a-chip*, principalment aquests destinats al creixement de cèl·lules que representen l'estat de l'art de la present tesi.

2.1. Sistemes *lab-on-a-chip*: Definició, origen i evolució

El concepte de laboratori en un xip, més conegut pel seu nom en anglès *lab-on-a-chip* (LoC), fa referència a dispositius miniaturitzats que integren i automatitzen múltiples etapes del procés analític (com ara la preconcentració, purificació, reacció, cristal·lització o anàlisi) dins d'un únic sistema de pocs centímetres quadrats [6].

Aquests sistemes van emergir entre mitjan i finals del segle XX, impulsats per la convergència de quatre àmbits científics que van actuar com a motors de desenvolupament [7]. En primer lloc, durant la dècada dels anys seixanta, el sector de la química analítica va identificar la necessitat de reduir la mida i el cost dels instruments utilitzats habitualment, com els sistemes de cromatografia de líquids d'alta resolució (HPLC) i la cromatografia de gasos. Aquests sistemes, tot i la seva potència analítica, eren massa grans, costosos i poc pràctics per a aplicacions portàtils o *in situ*. La miniaturització oferia una oportunitat per convertir-los en dispositius més lleugers i portàtils, més adequats per a l'anàlisi sobre el terreny.

Aquest avantatge va captar l'interès del sector de la biodefensa, el segon motor motivacional. La possibilitat de disposar de dispositius capaços de detectar agents químics o biològics en l'ambient, integrats en equips personals, es considerava estratègica per millorar la seguretat dels soldats en el camp de batalla.

A partir dels anys vuitanta, un nou interès va sorgir en el camp de la biologia molecular, motivat pel desenvolupament del Projecte Genoma Humà [8]. Aquest projecte va posar de manifest la necessitat de tècniques que permetessin una seqüenciació massiva, paral·lela i eficient. Davant la presència de regions repetitives en el genoma, es va optar per una estratègia de paral·lelització de les lectures de seqüència.

Aquesta estratègia, basada en la distribució i lectura simultània de múltiples fragments, va permetre reconstruir la seqüència completa del genoma de manera molt més ràpida i és encara avui la base de la majoria de plataformes de seqüenciació d'alt rendiment. Els sistemes LoC van demostrar una capacitat excel·lent per a integrar i automatitzar aquests processos a la microescala [9].

Finalment, el desenvolupament dels LoC no hauria estat possible sense l'aportació clau del camp de la microelectrònica, que va proporcionar les eines i tecnologies de micro i nanofabricació necessàries per dissenyar aquests sistemes. Les tècniques de fotolitografia, gravat, dipòsit de capes primes i integració de circuits van permetre construir dispositius amb arquitectures microfluídiques i sensors integrats amb una precisió abans inassolible [10].

Tot i que la idea de canalitzar fluids en sistemes miniaturitzats es remunta a dècades enrere, es considera que el primer sistema funcional amb estructura de LoC va ser desenvolupat a la Universitat de Stanford l'any 1979 (Figura 2.1.1), en el marc de l'Institut de Recerca de Xerox PARC, com a part d'un projecte orientat a l'anàlisi química integrada [11].

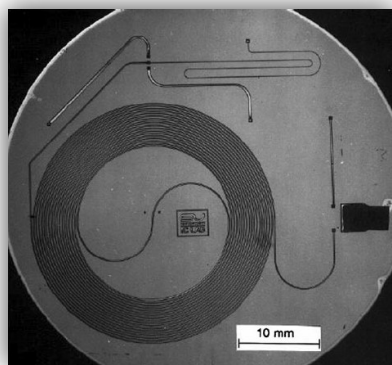


Figura 2.1.1: Primer sistema lab-on-a-chip. Utilitzat per cromatografia de gasos (1979). Imatge adaptada de [11].

El dispositiu era concretament un cromatògraf de gasos fabricat mitjançant tecnologies microelectròniques en silici, i millorava considerablement els sistemes convencionals de cromatografia en termes d'integració, compactació i temps de resposta. Després d'aquest avenç, van aparèixer altres sistemes analítics miniaturitzats construïts majoritàriament amb tecnologia de microfabricació en silici o vidre [12], [13].

Tanmateix, aquests materials presentaven diverses limitacions: eren costosos, fràgils i difícils de manipular. A més, l'escassa adhesió entre capes de silici i/o vidre dificultava el segellat permanent dels canals microfluídics, requerint processos especialitzats com l'enllaçat anòdic (de l'anglès *anòdic bonding*) [14]. A més, en el cas del silici, la seva opacitat a la llum visible limitava enormement l'ús en aplicacions de biologia molecular i cel·lular, que sovint requereixen detecció per microscòpia òptica.

Com a conseqüència d'aquestes restriccions, i malgrat l'interès inicial que generava la tecnologia, els sistemes lab-on-a-chip van romandre relativament infrautilitzats durant dècades. No fou fins a l'arribada de la

microfluídica moderna, i especialment amb el desenvolupament de la litografia tova per part de George Whitesides a finals dels anys noranta, que el camp va experimentar un impuls significatiu [15]. La litografia tova consisteix en replicar motlles mitjançant un elastòmer flexible que reproduïx fidelment les microestructures originals, essent el polidimetilsiloxà (PDMS) el material preferent per aquesta tècnica [16]. El PDMS és transparent en l'espectre visible, característica que el fa idoni per a la inspecció microscòpica i la integració de components òptics [17]. També és permeable als gasos com l'oxigen i el diòxid de carboni, fet que resulta fonamental per a cultius cel·lulars en entorns confinats [18]. El seu baix cost i la simplicitat del procés de fabricació mitjançant litografia tova van fer del PDMS un material molt atractiu per al desenvolupament de prototips ràpids [19]. A més, s'adhereix fàcilment a si mateix i a altres substrats com el vidre o el silici després d'un tractament amb plasma, facilitant la formació de canals tancats i funcionals, essencials en dispositius microfluídics [20].

Malgrat tots aquests avantatges, el PDMS també presenta grans limitacions que han impedit que la seva expansió acadèmica es traslladés a nivell industrial. Per exemple, és un material que allibera oligòmers no entrecreuats, fet que limita el seu ús en l'àmbit biomèdic o en l'anàlisi de cultius, ja que la presència d'aquestes molècules podria alterar les condicions del cultiu i proporcionar resultats no fisiològics o poc fiables analíticament [21]. D'altra banda, absorbeix molècules petites [22], cosa que en limita l'aplicació com a material de suport en sistemes d'extracció o separació molecular, que eren precisament una de les primeres aplicacions dels sistemes LoC.

A més, en ser permeable als gasos, els líquids en microsistemes basats en PDMS presenten una evaporació considerable [23], cosa que

n'impossibilita l'ús en assajos que requereixen llargs temps d'anàlisi o volums de mostra extremadament petits.

Per aquest motiu, des de l'any 2000 s'estan explorant alternatives al PDMS que permetin una expansió del concepte LoC a la indústria. En aquest sentit, s'han emprat materials termoplàstics com el metacrilat [24] o el policarbonat [25], o materials d'origen natural com el paper, en el desenvolupament de dispositius microanalítics [26]. Més recentment s'han fet servir materials més innovadors com les parafines, ceres, o la seda, tant d'aranya com de cuc [27]. No obstant això, hi ha clarament un dèficit pel que fa a l'explotació i comercialització de dispositius LoC.

2.2. Principals característiques dels sistemes lab-on-a-chip

Les propietats més característiques dels sistemes LoC deriven de la seva miniaturització, que permet operar amb volums molt petits (des de nanolitres fins a microlitres), i per estar construïts amb arquitectures que canalitzen aquests fluids en dispositius miniaturitzats (microfluídica). Aquesta escala de treball dona lloc a un comportament fluídic radicalment diferent del que es troba en sistemes convencionals a escala macro. El flux dins dels canals microfluídics es regeix majoritàriament per un règim laminar, on les línies de flux es mantenen paral·leles i no es barregen per turbulència [28]. Aquesta condició s'explica pel número de Reynolds, una magnitud adimensional que relaciona les forces inercials amb la viscositat:

$$Re = \frac{\rho \cdot v \cdot D_h}{\mu} \quad \text{Equació 1}$$

on ρ és la densitat del fluid, v la velocitat mitjana del flux, D_h el diàmetre hidràulic del canal i μ la viscositat dinàmica del fluid.

Quan els valors de Re són menors a 1, les condicions de flux són completament laminars, sense convecció, i el transport de matèria depèn exclusivament del transport per diferència de concentració també conegut com a difusió [29]. Per tant, el transport dins els canals depèn d'una cinètica governada per la difusió:

$$d = \sqrt{2Dt} \quad \text{Equació 2}$$

On d és la distància mitjana de difusió, D el coeficient de difusió i t el temps.

Una altra característica dels sistemes microfluídics és l'elevada relació superfície-volum, la qual cosa pot accelerar processos de transferència de calor o interaccions superficials, resultant en una resposta més ràpida del sistema respecte als sistemes convencionals [30].

El control del flux dins dels sistemes LoC pot ser passiu o actiu. Els mètodes passius inclouen l'ús de força capil·lar en superfícies hidrofíliques [31], diferències d'alçada (flux per gravetat) [32], tensió superficial entre gotes de diferent mida [33], o pressió directa mitjançant actuació manual (*finger-actuated*) [32]. En canvi, els sistemes de control actiu requereixen fonts externes d'energia, com bombes mecàniques (xeringues o peristàltiques) [34], forces elèctriques (electroosmosi, *electrowetting*) [35] o forces centrífugues (plataformes *lab-on-a-disc*) [36].

Més enllà de la microfluídica, els sistemes LoC també presenten avantatges associats a la miniaturització, com ara la reducció substancial del consum de mostra i reactius, aspecte clau en aplicacions on aquests són limitats o costosos. A més, el baix cost de fabricació, gràcies a l'ús de polímers i processos compatibles amb producció massiva, en fan una opció ideal per a aplicacions portàtils i *in situ* [30].

La simplicitat d'ús també és fonamental: molts sistemes estan dissenyats en formats completament automatitzats, de manera que l'usuari només ha d'introduir la mostra i obtenir un resultat en pocs minuts. Aquest alt nivell d'automatització minimitza els errors humans i incrementa la seguretat de l'anàlisi, especialment en casos on es requereix manipulació de substàncies perilloses, siguin aquestes tòxiques, radioactives o cancerígenes. Finalment, la capacitat de paral·lelització permet integrar múltiples funcions o assaigs en un sol dispositiu, estalviant temps i mostra, i facilitant l'obtenció de dades multiplexades en espais molt reduïts [7].

2.3. Limitacions i camps d'aplicació dels sistemes lab-on-a-chip

Tot i les altes expectatives que van acompanyar l'aparició dels sistemes LoC fa més de tres dècades, el seu impacte real en entorns biomèdics i clínics ha estat, en molts casos, limitat. Ja al 2010, autors com Beebe et al. [37] assenyalaven que, malgrat la promesa d'una revolució en diferents àmbits d'aplicació, més del 80% de les publicacions sobre LoC es feien en revistes d'enginyeria. Això evidenciava una desconexió entre el desenvolupament tecnològic i l'ús pràctic en els seus camps d'aplicació. La crítica principal era que molts d'aquests dispositius eren simplement miniaturitzacions de tècniques existents, sense una proposta de valor clarament diferenciada.

Aquesta visió ha estat recentment actualitzada i aprofundida per un treball publicat el 2024 per part de Lam et al. [38]. En aquest article, els autors analitzen per què, malgrat avenços notables en àmbits com l'hematologia o la biologia vascular, la majoria de tecnologies LoC encara no han assolit una adopció generalitzada en la pràctica clínica o investigadora.

Un dels obstacles més importants identificats segueix sent la manca d'alineació entre els diferents agents implicats. Sovint, els dispositius es dissenyen des de la perspectiva de l'enginyeria, sense una comprensió profunda de les necessitats específiques dels usuaris finals. Això dona lloc a plataformes molt sofisticades des del punt de vista tecnològic, però poc útils o viables en contextos reals.

A més, es destaca que el desenvolupament de LoC presenta barreres tècniques notables: falta d'estandardització en disseny i fabricació, materials poc adequats per a producció a gran escala, i una dependència excessiva d'infraestructures especialitzades. Aquestes limitacions dificulten la seva escalabilitat i la seva integració en entorns de rutina.

Els autors del treball proposen tres àmbits d'actuació estratègica per aconseguir una adopció més àmplia d'aquestes tecnologies:

- Millora de la representació fisiològica *in vitro*: incloure materials biocompatibles i dissenys 3D que imitin millor l'entorn *in vivo*. Aquí s'insereixen iniciatives com els dispositius *Organ-on-a-Chip*, amb gran potencial per substituir models animals.
- Estandardització i usabilitat: cal establir protocols comuns de disseny i fabricació, repositoris oberts de dissenys, i mecanismes de control de qualitat. També es proposa simplificar els dispositius per facilitar-ne l'ús sense formació especialitzada ni equips perifèrics costosos.
- Reducció de barreres per a la translació clínica: incloure des de les primeres fases els requisits reguladors, els estudis de cost-eficiència i les necessitats dels sistemes de salut.

Un altre aspecte clau és l'adaptabilitat dels LoC a entorns amb pocs recursos. S'està explorant el desenvolupament de dispositius portàtils,

estables a temperatura ambient, de baix cost i que no requereixin instrumental complex, especialment útils per a diagnòstics point-of-care.

En conjunt, l'article ofereix una ruta clara per a una nova generació de sistemes LoC: més accessibles, més útils, més centrats en l'usuari i amb una capacitat real de transformar la investigació i la medicina del futur.

Davant d'aquesta realitat, una línia de treball que ha guanyat força en els darrers anys és la integració directa de sensors dins dels propis sistemes LoC [39], permetent la monitorització contínua, de manera automatitzada i en temps real, sense necessitat de manipulació externa de la mostra.

2.4. Monitorització de cèl·lules en sistemes lab-on-chip

La capacitat de monitorar els entorns cel·lulars *in vitro* en temps real és fonamental per estudiar processos com el metabolisme [40], la transducció de senyals [41] o la diferenciació cel·lular [42]. El seguiment continu de paràmetres clau com les concentracions iòniques [43], el pH [44], els nivells de glucosa [45], l'activitat elèctrica [46] i la temperatura [47] permet obtenir una comprensió més profunda de les respostes cel·lulars i com aquestes interaccionen amb el seu entorn.

Per exemple, el monitoratge del consum de glucosa pot oferir informació valuosa sobre l'activitat metabòlica i la viabilitat de les cèl·lules del cultiu [48]. De manera similar, les variacions en el pH poden reflectir alteracions en la fisiologia cel·lular i estar associades al desenvolupament de malalties com la *diabetis mellitus* o el càncer [49], on la regulació àcida-aniónica és sovint disfuncional. A més, la detecció contínua d'ions com el sodi i el potassi permet avaluar la integritat de la membrana cel·lular i el funcionament de les bombes i canals iònics [50],

mentre que els senyals de calci són especialment rellevants per estudiar processos de senyalització neuronal o la contracció muscular [51].

Aquest seguiments es poden dur a terme mitjançant l'ús d'equipament de laboratori convencional, el que implica l'extracció periòdica de petites quantitats de medi de cultiu, el seu processament i posterior anàlisi o bé l'ús d'instrumentació externa, per exemple microscopis, que a part de ser instruments grans i cars, requereixen la manipulació del cultiu i risc de contaminació.

La incorporació de sensors capaços de monitoritzar aquests paràmetres permet un seguiment continu del cultiu [52], eliminant la necessitat de manipulació externa i incrementant tant la precisió com la fiabilitat dels assajos, i alhora reduint els riscos associats a la intervenció humana.

2.4.1. Sensors: Definició, classificació i propietats.

Segons la Unió Internacional de Química Pura i Aplicada (IUPAC), un sensor es un dispositiu que proporciona una resposta mesurable a un determinat anàlit o estímul físic [53].

En termes generals, un sensor consta de dos components principals. El primer és el receptor, encarregat de reconèixer selectivament el paràmetre d'interès i transformar aquesta informació en una forma d'energia. El segon és el transductor, que converteix aquesta energia, sovint de naturalesa química, mecànica o òptica, en una senyal mesurable, habitualment de l'àmbit elèctric. Aquesta senyal elèctrica és convertida en formats llegibles (Figura 2.4.1).

Components tecnològics d'un sensor

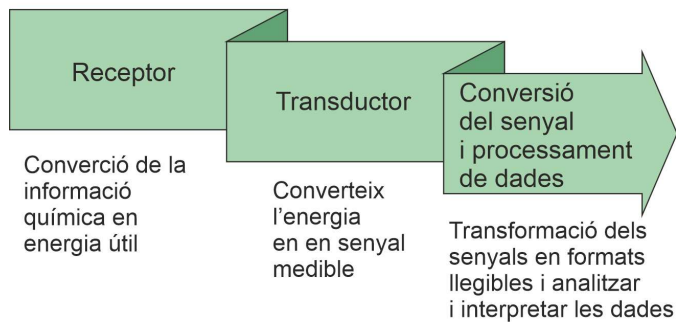


Figura 2.4.1: Components tecnològics d'un sensor. Esquema funcional que mostra les tres etapes principals d'un sensor: el receptor, el transductor i el mòdul de conversió i processament.

Segons la naturalesa del transductor, hi ha:

Sensors elèctrics, basats en mesures de canvis d'impedància electrònica del transductor (conductància, resistius, capacitius, etc).

Sensors electroquímics, basats en processos de transferència d'electrons.

Sensors mecànics, basats en canvis de massa, de força o de resistència mecànica.

Sensors òptics, basats en canvis d'absorció, dispersió, polarització, interferometria, reflexió o refracció, entre d'altres [54].

Un sensor ideal hauria de ser altament sensible, de manera que petits canvis en la concentració de l'anàlit provoquin grans variacions de senyal. També ha de ser selectiu, responnent únicament a l'anàlit d'interès sense interferències del medi, reversible, és a dir, capaç de tornar al seu valor inicial quan l'anàlit desapareix i, així, admetre mesures repetides, i estable, mantenint el rendiment al llarg de períodes extensos.

Igualment, cal que mostri proporcionalitat entre senyal i concentració en un rang ampli, i que ofereixi una resposta ràpida i estable. A aquests requisits s'hi afegeixen l'exactitud (mínim error respecte al valor real), la precisió (repetibilitat de les mesures) i la robustesa davant canvis ambientals. Finalment, és desitjable que sigui barat, miniaturitzable i integrable, amb baix consum energètic i connectivitat sense fils per facilitar la transmissió de dades a l'usuari final.

En el cas de la monitorització de cultius cel·lulars, els sensors òptics i electroquímics són els més emprats per la seva simplicitat, baix cost, capacitat de miniaturització i integració. Aquests també han estat el tipus de dispositius utilitzats en aquesta tesi, i per aquest motiu, s'expliquen en més detall en els següents apartats.

2.4.1.1. Sensors òptics

Els sensors òptics són dispositius que utilitzen la llum per detectar canvis en l'entorn o per mesurar determinades magnituds físiques, químiques o biològiques [55]. Aquests sensors funcionen a partir de la interacció de la radiació electromagnètica, generalment en l'espectre visible, ultraviolat o infraroig, amb el medi objecte d'estudi [54]. La seva principal avantatge és la seva elevada sensibilitat [56], així com la immunitat a interferències electromagnètiques [57], la possibilitat de realitzar mesures remotes [58] i el fet que molts d'ells poden ser miniaturitzats [59] i/o integrats en sistemes fotònics complets [60]. A més, no requereixen contacte directe entre l'element sensor i la mostra analitzada, fet que els fa especialment adequats per a aplicacions amb mostres biològiques ja que evita el risc de contaminació de la mateixa [61]. Tanmateix, presenten també alguns inconvenients, com ara la possible afectació per condicions ambientals com la brutícia, la humitat

o la temperatura [57], així com la necessitat de fonts i detectors òptics específics, que poden incrementar-ne el cost o la complexitat.

La classificació dels sensors òptics es realitza habitualment segons el mecanisme de transducció òptica, és a dir, la manera com es modifiquen les propietats de la llum en presència de la magnitud a mesurar.

Entre els principals tipus destaquen:

Sensors d'absorbància: basats en la mesura de la reducció de la intensitat de la llum transmesa a través d'un medi com a conseqüència de l'absorció per part d'una substància [62]. Són amplament utilitzats en espectroscòpia ultraviolat-visible (UV-Vis) i infraroja (IR) per a la detecció i quantificació de compostos químics.

Sensors de reflectància: utilitzen la llum reflectida per una superfície per determinar propietats com el color, la textura o la composició [63]. Són comuns en aplicacions de detecció superficial, biomèdiques i d'agricultura de precisió, entre d'altres.

Sensors de fluorescència o de luminescència: basats en la detecció de la llum emesa per una substància després d'haver estat excitada per una font de llum [64]. Ofereixen una gran sensibilitat i especificitat, i són especialment útils en biosensors i aplicacions biomèdiques.

Sensors interferomètrics: fonamentats en la interferència de dos o més feixos de llum monocromàtica i coherent. La magnitud a mesurar produeix un canvi en la fase o la longitud d'ona del feix, que es tradueix en una variació del patró d'interferència [65]. Aquests sensors proporcionen una alta resolució i s'utilitzen en metrologia, monitoratge estructural i aplicacions quàntiques.

Sensors basats en dispersió: aprofiten el fenomen de dispersió de la llum, com ara l'efecte Raman o la dispersió de Rayleigh, per identificar

compostos o caracteritzar materials [66]. Encara que menys sensibles que altres mètodes, ofereixen informació molecular específica.

Sensors basats en canvis de l'índex de refracció: detecten variacions en l'índex de refracció del medi, generalment mitjançant guies d'ona o ressonadors òptics [67]. Aquest principi s'utilitza sovint en sensors basats en plasmons de superfície (SPR) amb aplicacions destacades en bioanàlisi, especialment en l'estudi d'interaccions moleculars.

Cada una d'aquestes tècniques ofereix avantatges específics segons l'aplicació, i la seva elecció depèn de factors com la naturalesa del senyal a detectar, la sensibilitat requerida i les condicions ambientals del sistema. En aquesta tesi, els sensors òptics que s'apliquen a l'estudi de cultius cel·lulars exploren el concepte de la fotònica viva, un concepte concebut i desenvolupat en el Grup de Transductors Químics (GTQ) de l'Institut de Microelectrònica de Barcelona (IMB-CNM) que es descriurà amb detall a continuació.

2.4.1.2. Sensors òptics per a cultius cel·lulars: Explorant el concepte de la fotònica viva

Des d'un punt de vista analític, s'han desenvolupat sensor òptics capaços de detectar paràmetres importants tant en medi de cultiu [68] com en les pròpies cèl·lules [69]. Alguns exemples inclouen sensors d'absorbància capaços de monitoritzar el pH en temps real [70], sensors de fluorescència capaços de detectar biomarcadors específics prèviament marcats amb fluoròfors [71], o sensors basats en dispersió, que detecten canvis en la dispersió de la llum causats per les estructures cel·lulars o orgànuls, proporcionant informació sobre la morfologia i el moviment cel·lular [72].

En el cas dels sensors d'absorbància, la interacció de la radiació electromagnètica amb l'anàlit, en aquest cas les cèl·lules, resulta en l'absorció selectiva de llum a longituds d'ona específiques. La llei de Beer-Lambert (Equació 3) descriu matemàticament aquest fenomen [73], establint que l'absorció (A) d'una substància a una determinada longitud d'ona és proporcional a la seva concentració (c), la longitud del camí òptic (l) i al coeficient d'absorció molar (ε) característic de cada espècie a una longitud d'ona i temperatura:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad \text{Equació 3}$$

Aquesta equació estableix una relació directa entre l'absorbància i la concentració de l'espècie, permetent realitzar mesures quantitatives de la composició cel·lular, viabilitat o activitat metabòlica [74].

No obstant, aquesta tesi no es basa en sensors d'absorbància convencionals, sinó en un concepte més innovador: la fotònica viva. Aquest concepte, concebut en el projecte europeu LIPHOS, va ser introduït per primera vegada en la tesi doctoral de Tobias Ackermann [75]. Planteja el desenvolupament de components òptics basats en cèl·lules vives, concretament guies òptiques per on la llum es propaga a través d'una monocapa cel·lular. En aquesta configuració, la monocapa cel·lular actua simultàniament com a objecte d'estudi i com a transductor òptic, incrementant enormement la interacció llum-matèria, i proporcionant sistemes molt sensibles per l'estudi dels processos biològics produïts dins de la cèl·lula.

Per entendre aquest fenomen s'han de tenir en compte els principis de refracció i reflexió interna total que deriven de la llei de Snell. La refracció és el fenomen pel qual la llum canvia de direcció quan travessa la interfície entre dos medis amb índexs de refracció diferents. L'índex de refracció (n) és una propietat que relaciona la velocitat a la que es

trasllada la llum a través d'un medi determinat (v) respecta a la que té quan viatge en el buit (c):

$$n=c/v \quad \text{Equació 4}$$

Com que la velocitat de propagació de la llum en el buit és sempre la més elevada, els valors d'índex de refracció són iguals o superiors a 1. Considerant aquest fenomen, la llei de Snell estableix la relació entre els índexs de refracció dels dos medis que componen la interfase i l'angle d'incidència de la llum, i permet determinar la direcció de la llum refractada segons la següent expressió:

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \quad \text{Equació 5}$$

Essent n_1 i θ_1 l'índex de refracció i l'angle d'incidència de la llum que propaga pel primer material respecte la normal de la interfície, i n_2 i θ_2 la del segon material.

Quan la llum intenta passar d'un medi amb índex de refracció alt a un de més baix ($n_1 > n_2$), existeix un angle crític (θ_{crit}) a partir del qual no es produeix refracció, sinó reflexió total interna (TIR). En TIR, la llum no creua la interfase sinó que rebota en ella i retorna propagant pel medi en el qual ja propagava inicialment (Figura 2.4.2).

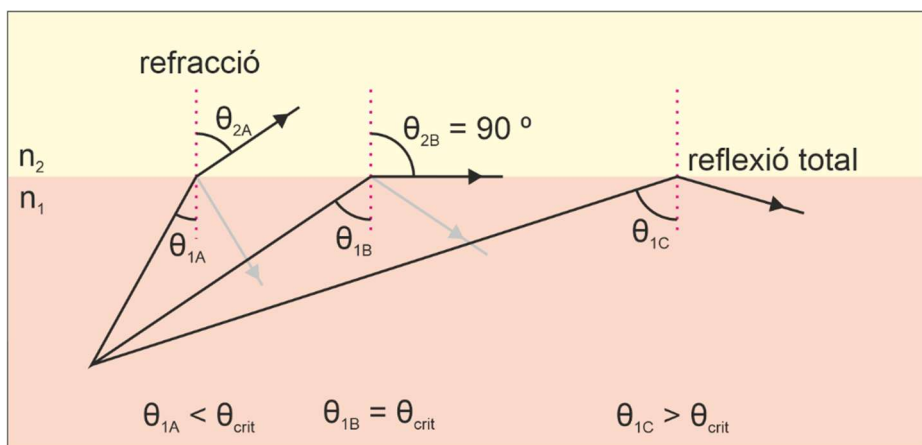


Figura 2.4.2: Esquema sobre la refracció i la reflexió total interna (TIR).

L'angle crític es defineix com:

$$\sin \theta_{crit} = \frac{n_2}{n_1} \quad \text{Equació 6}$$

Quan $n_1 < n_2$, no hi ha angle crític i no es produeix reflexió total.

Aquest fenomen s'aprofita en el desenvolupament de guies òptiques, en les que el material interior de la guia pel qual es trasllada la llum i que rep el nom de nucli, presenta un índex de refracció superior al del material extern que l'envolta i que rep el nom de recobriment. Emulant l'estructura de les fibres òptiques, les guies òptiques cel·lulars s'aprofiten del fet que les cèl·lules tenen un índex de refracció superior al del medi que les envolta (1,35-1,38 [76] vs. 1,33 de l'aigua [77]), fet que permet el confinament de la llum dins la monocapa cel·lular (Figura 2.4.3).

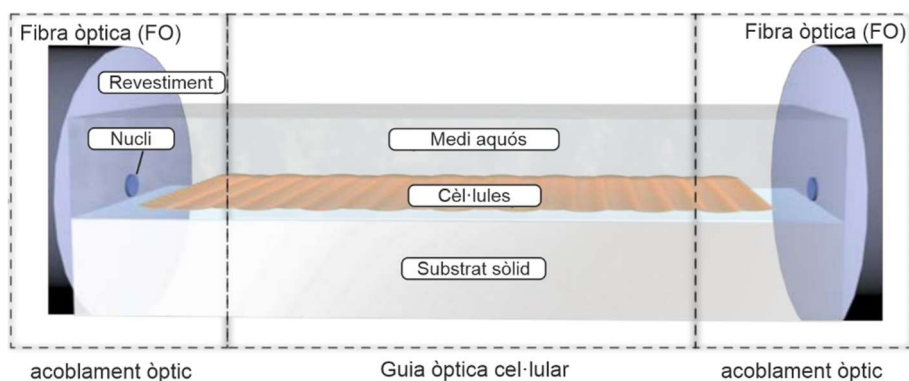


Figura 2.4.3: Esquema de guia òptica cel·lular. Imatge adaptada de la tesi doctoral de Tobias Ackermann [75].

Aquesta configuració, on les cèl·lules actuen com a guies òptiques, és avantatjosa respecte altres configuracions, ja que l'elevat nombre de reflexions dins les cèl·lules incrementa la interacció llum-cèl·lula proporcionant una elevada sensibilitat a les mesures i la possibilitat de monitoritzar processos de transformació i maduració cel·lular. Aquest principi, demostrat en cèl·lules cardíques [78], és transferible a qualsevol tipus cel·lular, però és particularment interessant en aquells que presenten propietats òptiques diferenciades, com és el cas dels adipòcits.

Els adipòcits són un tipus cel·lular àmpliament distribuït en el cos humà on desenvolupen funcions endocrines y energètiques [79]. Actualment es coneixen tres tipus principals d'adipòcits: els adipòcits blancs, amb un elevat contingut lipídic, que actuen com a reserva de energia [80]; els adipòcits marrons, amb un gran nombre de mitocondris, solen estar involucrats amb la regulació termogènica [81]; i els adipòcits beix, un tipus cel·lular intermedi entre els dos anteriors, que actua de forma similar als marrons, però només després d'un procés d'activació [82]. Les diferències composicionals i estructurals d'aquests tipus cel·lular també influeixen les seves propietats òptiques. Així doncs, les vesícules

lipídiques presents en els adipòcits blancs els proporcionen un gran volum i una coloració groguenca que fa que absorbeixin de forma selectiva en la regió propera a 420 nm [83], Per altra banda, els adipòcits marrons i beix, presenten un elevat nombre de grups hemo en les mitocondries, el que resulta en uns clars pics d'absorció entre 530 i 570 nm [84]. Per tant, la transformació de preadipòcits a adipòcits blancs, marrons o beix dona lloc a cèl·lules amb unes característiques espectrals úniques i diferenciabls, detectables mitjançant instrumentació òptica adequada. Aquestes transformacions cel·lulars tenen gran importància en la regulació de processos metabòlics [85], així com en el desenvolupament de patologies com la obesitat o la diabetis [86], un dels objectius de la present tesi.

2.4.1.3. Sensors electroquímics

Els sensors electroquímics són dispositius que permeten detectar i quantificar espècies químiques mitjançant la mesura d'un senyal elèctric, com ara una intensitat de corrent, una diferència de potencial o una variació de conductància [87], provocats per processos electroquímics, que poden incloure reaccions d'oxidació o reducció, o altres interaccions iòniques a la interfície elèctrode-electròlit. Aquests dispositius destaquen per la seva elevada sensibilitat, baix cost, temps de resposta ràpida i possibilitat de miniaturització i integració, fet que els fa ideals per a aplicacions que requereixen mesures *in situ* mitjançant dispositius portàtils [88]. Tanmateix, poden veure's afectats per interferències en matrius complexes com els fluids biològics, presentant limitacions d'estabilitat en mesures llargues i solen requerir calibratges freqüents [89].

Els sensors electroquímics es classifiquen principalment segons el mecanisme de transducció en tres grans categories: potenciomètrics, amperomètrics i conductimètrics [90].

Sensors potenciomètrics: mesuren la diferència de potencial entre un elèctrode de treball i un elèctrode de referència en absència de flux de corrent. Aquest potencial està relacionat amb l'activitat d'una determinada espècie iònica a través de l'equació de Nernst. Són utilitzats en la detecció d'ions específics mitjançant elèctrodes selectius, com els sensors de pH o d'ions [91].

Sensors amperomètrics: detecten la intensitat del corrent generat per una reacció redox que té lloc a la superfície de l'elèctrode quan s'aplica un potencial. En el cas de la cronoamperometria, el potencial aplicat és constant, produint com a resposta un valor d'intensitat del corrent proporcional a la concentració de l'anàlit. Una altra variant dels sensors amperomètrics són els sensors voltamètrics, en els que la resposta de corrent es registra en funció d'un potencial aplicat que varia de forma controlada. Aquesta tècnica permet obtenir informació addicional sobre el comportament electroquímic de l'anàlit ja que cada espècie respon produint un flux de corrent a un potencial específic [92]. Ambdues variants són molt comunes en la detecció d'oxigen, peròxid d'hidrogen i altres espècies electroactives, encara que també són comunament emprats en la detecció d'espècies no electroactives, com la glucosa, acoblant la seva reacció de reconeixement a una altra que impliqui un procés de transferència d'electrons. Una de les estratègies més comunes en la detecció d'espècies no electroactives són els de biosensors enzimàtics [93], detallat en apartats posteriors.

Sensors conductimètrics: mesuren la variació en la conductivitat elèctrica d'una solució causada per la presència o canvi de concentració

d'espècies iòniques. Aquest mètode és senzill i robust, però menys selectiu que els anteriors. S'utilitza principalment per a la detecció de sals i compostos iònics totals [94].

A continuació, s'aprofundirà en el funcionament, propietats i característiques dels sensors potenciomètrics i amperomètrics, que són els que s'han desenvolupat en el marc d'aquesta tesi.

Sensors potenciomètrics

Tal com s'ha comentat en l'apartat anterior, els sensors potenciomètrics es caracteritzen per realitzar mesures de potencial entre dos elèctrodes, un elèctrode de treball i un elèctrode de referència, en equilibri, és a dir, en absència de flux de corrent. Mentre que l'elèctrode de referència manté un potencial conegut i estable al llarg del temps, l'elèctrode de treball respon a la presència de l'anàlit d'interès, habitualment un ió, modificant el seu potencial d'acord amb l'activitat d'aquest en el medi. Concretament, l'elèctrode de treball és sensible a la concentració efectiva (o activitat) d'un ió específic en solució, i aquesta resposta es produeix sense intercanvi net de càrrega, la qual cosa preserva l'estat d'equilibri del sistema. El principi de funcionament es descriu per l'equació de Nernst, que estableix la relació entre el potencial generat (E) i l'activitat de l'ió objectiu (α), segons l'expressió:

$$E = E^0 + \left(\frac{RT}{zF} \right) \ln \alpha \quad \text{Equació 7}$$

on E^0 és el potencial estàndard de l'elèctrode (V), R és la constant universal dels gasos (8,314 J/mol·K), T és la temperatura absoluta (en K), z és la valència de l'ió i F és la constant de Faraday (96485 C/mol).

Aquesta equació mostra que el potencial mesurat és logarítmicament proporcional a l'activitat de l'ió objectiu. En la pràctica, l'activitat sovint

s'aproxima a la concentració de l'anàlit d'interès, el que és particularment vàlid en el cas de solucions diluïdes.

Per tal de millorar la selectivitat de la mesura, els elèctrodes selectius d'ions (ESI) incorporen membranes específiques que permeten el reconeixement selectiu d'un ió concret dins d'una mescla complexa d'espècies iòniques. Aquest reconeixement per part de la membrana selectiva a ions dona lloc a un potencial elèctric en la interfase elèctrode-solució que és proporcional a la concentració de l'ió objectiu segons l'equació de Nernst. Per tant, la membrana és el component central del sensor, essent l'element que li proporciona la capacitat analítica al sensor i selectivitat. La membrana està composta habitualment per una matriu polimèrica, generalment de policlorur de vinil (PVC), que actua com a suport estructural [95]. S'hi afegeix un plastificant, com el dioctilftalat o l'o-nitrofenil octilèter, que proporciona flexibilitat i facilita la mobilitat interna dels components [96]. L'element actiu de la membrana, que li confereix especificitat, és el ionòfor. El ionòfor és una espècie que interacciona específicament amb l'ió objectiu, per exemple, K^+ en el cas de la valinomicina o Na^+ per la monensina, donant lloc a una resposta selectiva [97].

Per millorar la resposta i estabilitzar el potencial, s'hi poden incorporar additius lipofílics, com el tetrafenilborat de potassi, que mantenen la neutralitat de càrrega de la membrana durant el procés de reconeixement [98]. En alguns casos, s'afegeixen solvents o fases líquides per afavorir el transport dels ions [99].

Cada ESI es dissenya per a un ió específic, i la composició de la membrana s'ha d'ajustar per garantir una resposta fiable, especialment quan es treballa en medis complexos com fluids biològics.

Un cas particular dels ESI són els elèctrodes de pH, entre els quals el més comú és l'elèctrode de vidre. Aquest tipus d'ESI incorpora una

membrana de vidre especial, habitualment composta de silicat de liti o de sodi modificat, que és selectiva als protons. La membrana actua com a interfície sensible al pH, ja que es produeix un intercanvi de protons entre la solució externa i la superfície del vidre, establint un equilibri que genera un potencial elèctric dependent de la diferència d'activitat de protons entre l'interior del sistema i la mostra. El potencial mesurat és proporcional al logaritme negatiu de l'activitat de protons, d'acord amb l'equació de Nernst (a 25 °C):

$$E=E^0 - 59,16 \text{ mV } pH$$

Equació 8

Aquesta relació permet construir una corba de calibratge que vincula el potencial amb el pH, a partir de la qual es pot determinar el valor desconegut de pH en una mostra.

Entre les propietats més destacades dels elèctrodes de vidre hi ha la seva alta sensibilitat i selectivitat, la resposta ràpida als canvis de pH i la capacitat de mesurar directament en mostres amb matrius complexes, com fluids fisiològics o líquids industrials. No obstant això, aquests elèctrodes presenten algunes limitacions importants: són fràgils mecànicament, presenten una elevada dependència amb la temperatura i tendeixen a patir derives temporals, fet que fa necessari un recalibratge regular. A més, són difícilment miniaturitzables i integrables en sistemes microfluídics.

Malgrat que recentment s'han desenvolupat alternatives basades en hidrogels sensibles al pH [100] o sensors d'impedància d'estat sòlid [101], els transistors d'efecte de camp sensibles a ions (ISFETs) [102] són actualment la millor alternativa als elèctrodes de vidre tradicionals per ser integrats en LoCs, gràcies a la seva simplicitat de fabricació, mida reduïda i possibilitat d'integració en circuits microelectrònics [103], [104], [105]. A continuació es descriuen el funcionament i

característiques dels dispositius ISFETs, així com les limitacions d'aquests sensors en la mesura en mostres biològiques complexes que han donat lloc als objectius d'aquesta tesi.

ISFETs com a sensors potenciomètrics: Característiques i limitacions

Descrits per primera vegada a principis dels anys 70 per part de Piet Bergveld [106], els ISFETs són dispositius semiconductors desenvolupats a partir de la tecnologia dels transistors d'efecte camp de tipus MOSFET (de l'anglès *Metal–Oxide–Semiconductor Field-Effect Transistor*), però modificats per actuar com a sensors químics, especialment per detectar canvis de concentració d'ions.

ISFETs i MOSFETs comparteixen l'estructura general: un canal de tipus n o p, dues regions fortament dopades (font i drenador) i una capa dielèctrica d'òxid que separa la porta del canal (Figura 2.4.4). A més, ambdós dispositius es poden fabricar amb tecnologies compatibles amb la tecnologia CMOS, la qual cosa facilita la integració dels ISFETs en circuits microelectrònics.

Pel que fa al seu funcionament, tots dos dispositius modulen la conductivitat del canal entre la font i el drenador mitjançant l'aplicació d'un camp elèctric a la porta. No obstant això, la naturalesa i la configuració de la porta en els ISFETs difereixen significativament respecte a la dels MOSFETs per tal de conferir-los-hi sensibilitat iònica.

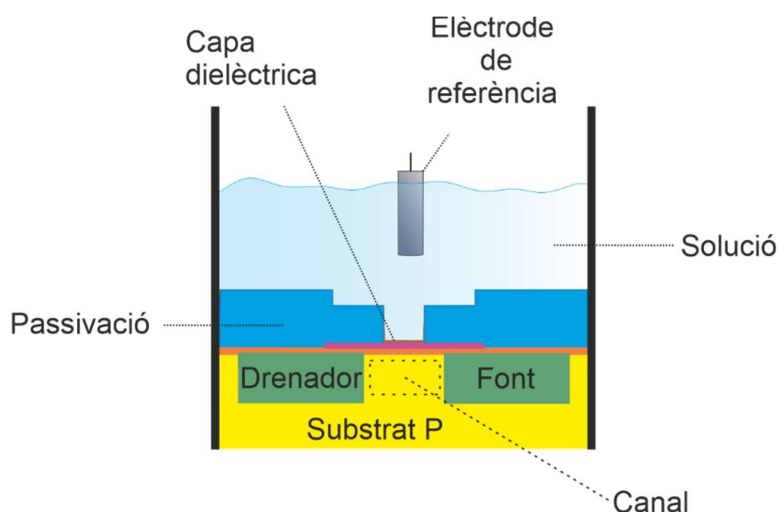


Figura 2.4.4: Interfícies d'un ISFET submergit en un electròlit.

Concretament, la porta metàl·lica dels MOSFETs és substituïda en els ISFETs per una interfície dielèctrica, generalment d'òxid de silici, nitrur de silici o òxid d'alumini, exposada directament a la solució. Aquesta modificació transforma el comportament de la porta: mentre que en el MOSFET la modulació del canal és induïda per un potencial elèctric extern, en els ISFETs el potencial superficial es modifica per la interacció amb la solució, concretament amb la concentració d'ions presents a la interfície.

Aquesta interfície dielèctric-solució actua com una porta química flotant. Quan el dispositiu es submergeix en un electròlit, es produeix una interacció entre els ions de la solució, especialment hidrons (H_3O^+), i els grups funcionals a la superfície del dielèctric, en aquest cas compost de nitrur de silici. Aquestes interaccions condueixen a la protonació o desprotonació de grups silanol ($\text{Si}-\text{OH}$) i, en alguns casos, grups nitrogenats com les amines ($\text{Si}-\text{NH}_2$) superficials, segons la composició química del nitrur de silici i les condicions del medi [107]. Aquest procés modifica la densitat de càrrega superficial, alterant el potencial local i

modulant el canal de conducció. El corrent entre font i drenador és, per tant, regulat per una propietat química (el pH de la solució) en lloc d'un potencial elèctric aplicat externament.

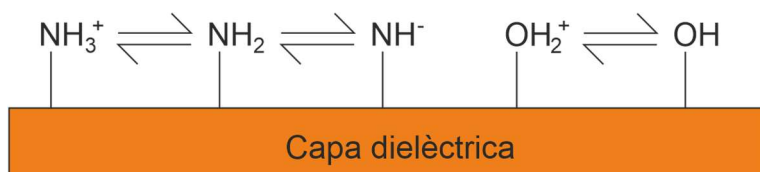


Figura 2.4.5: Esquema d'absorpcions en la superfície de porta d'un ISFET de nitrur.

Els fenòmens que tenen lloc a la interfície dielèctric-solució s'expliquen per la definició de doble capa elèctrica. Aquesta estructura es compon de dues subcapes: la capa interna de Helmholtz (IHP de *inner Helmholtz plane*), on els ions específicament adsorbts (com H^+ o OH^-) interaccionen amb la superfície dielèctrica, i la capa externa de Helmholtz (OHP de *outer Helmholtz plane*), on s'acumulen cations i anions per atraccions electrostàtiques (Figura 2.4.6). Per sobre, es troba la capa de difusió, on la mobilitat de les espècies està governada per la difusió i, per tant, només depèn del gradient de concentració d'aquestes. Aquest perfil de càrrega contribueix a establir el potencial de porta química del dispositiu.

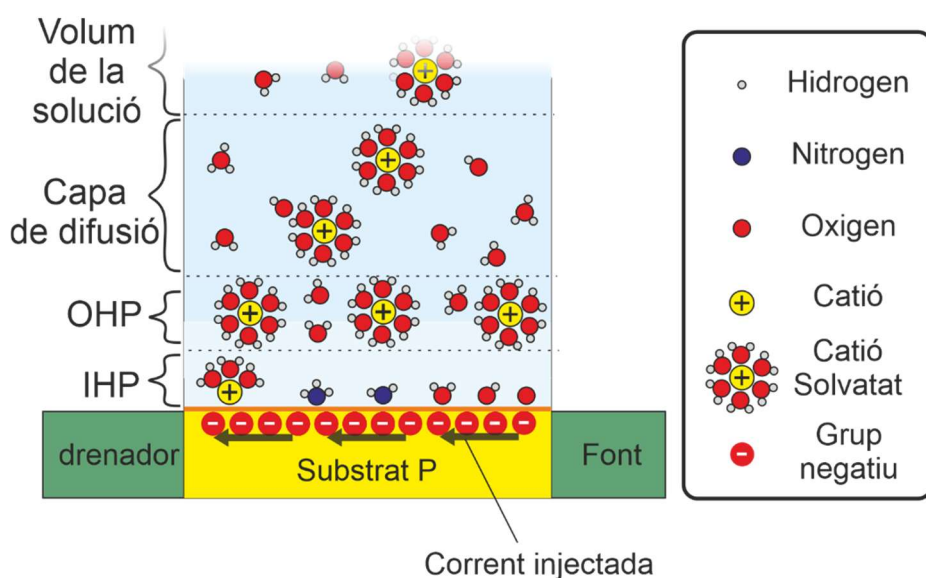


Figura 2.4.6: Estructura de doble capa en la interfície entre el dielèctric i la solució.

Tenint en compte el potencial generat a la interfície dielèctric-solució, el funcionament dels ISFETs es pot expressar amb una equació anàloga a la de Nernst però aplicada a aquest tipus de dispositiu electrònic:

$$E = E^0 + \frac{2,303RT}{F} \frac{\beta}{\beta + 1} (pH - pH_0) \quad \text{Equació 9}$$

on β és una constant que depèn de la densitat i naturalesa dels grups actius de la superfície de l'ISFET, pH és el pH de la solució i pH_0 el valor de pH en el punt de càrrega nul·la (PZC, *point of zero charge*), que correspon al valor de pH per al qual la superfície presenta càrrega neta nul·la.

Un aspecte important dels ISFETs és que, com la resta de sensors potenciomètrics, requereixen un elèctrode de referència extern (normalment de Ag/AgCl) immers en la solució per establir un punt de potencial conegut i estable, que serveixi per interpretar els canvis de

potencial induïts pel pH. Aquest aspecte sol ser força limitant a nivell d'integració i miniaturització, ha sigut motiu d'estudi durant dècades, i s'ha resolt de forma més o menys satisfactòria mitjançant el desenvolupament i integració de referències miniaturitzats com els RE-FETS [108]. No obstant, les limitacions més importants dels ISFETs són: que presenten una deriva intrínseca del senyal mesurat i que la seva resposta es veu molt afectada pel *fouling* produït per l'adsorció inespecífica de molècules a la superfície sensible.

La deriva (en anglès *drift*) és un canvi lent i progressiu del senyal de sortida (potencial o corrent) amb el temps, que no està relacionat amb un canvi real de la concentració de l'anàlit. Aquest fenomen compromet la precisió i l'estabilitat a llarg termini de la mesura i dificulta les aplicacions que requereixen monitoratge continu o mesures absolutes fiables. Entre les causes principals de la deriva en ISFETs destaquen les reaccions fisicoquímiques a la interfície òxid-solució (com la hidratació de la superfície del dielèctric, la protonació o adsorció d'ions), la migració iònica dins el dielèctric o l'atrapament de càrregues, que poden derivar en canvis irreversibles en la composició química de la capa dielèctrica [109].

Tot i que la deriva no es pot eliminar completament, sí que es pot minimitzar, corregir o compensar mitjançant diverses estratègies, com: (i) realitzar un preconditionament del sensor, procés que consisteix en introduir l'ISFET en una solució tampó i mantenir-lo en ella durant períodes no inferiors a 10 hores per tal d'estabilitzar les reaccions superficials anteriors (sobretot les associades amb la hidratació, protonació superficial i adsorció iònica); (ii) recalibrar, ajustant els valors proporcionats a una nova corba de calibratge per tal de compensar l'efecte de la deriva; o (iii) minimitzar l'adsorció d'ions modificant la

superfície del sensor amb un tractament o membrana que estabilitzi els fenòmens interfacials.

Per altra banda, el *fouling* [110], [111] fa referència al procés d'adsorció superficial de molècules (quan són d'origen biològic es sol parlar de *biofouling*) presents en la mostra a analitzar, el qual resulta en un canvi en els valors subministrats pels ISFETs que no estan associats a canvis en les concentracions d'ions. Igual que en el cas de la deriva, una de les estratègies més comuns consisteix en fer servir membranes que redueixin l'accessibilitat de la porta de l'ISFET per part d'ions i/o biomolècules, minimitzant així la seva adsorció.

Per tant, allargar el temps de vida del dispositiu i minimitzar l'efecte negatiu de fenòmens com la deriva o el *fouling/biofouling* és essencial per garantir l'estabilitat del sensor, la precisió i exactitud de les mesures proporcionades, i assegurar la fiabilitat i robustesa del sistema. A continuació, es detallaran les estratègies més exitoses que s'han fet servir per allargar la vida dels sensors potenciomètric en general, i els ISFETs en particular, en la mesura de mostres biològiques.

ISFETs de llarga vida per mostres biològiques

Els ISFETs, al igual que altres sensors potenciomètrics [112], poden monitoritzar el pH de mostres biològiques de forma contínua i sense recalibratge durant unes 6-8 hores [113]. A partir d'aquest temps, la seva senyal es veu molt influïda per efectes associats a la deriva del sensor i sobretot a l'adhesió de biomolècules, que fan necessari un procés de recalibratge. Aquest curt temps de vida útil dels sensors potenciomètrics pot ampliar-se mitjançant diferents estratègies, essent la incorporació de membranes antiadherents la més simple i àmpliament emprada (Taula 1).

En aquest sentit, membranes de polianilina van permetre realitzar mesures continues de pH en medis de cultiu bacterians i de llevats durant 24 hores seguides [114], un valor que millora enormement l'obtingut amb sensors sense modificar però que, en el cas de cultius cel·lulars és insuficient ja que els cultius solen requerir entre 2-3 dies per assolir un estat de confluència i 2-3 dies més per realitzar un estudi farmacològic complet [115]. Per altra banda, la presència de la membrana de DOPC (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina) va permetre fer un seguiment del pH en mostres de llet durant 60 hores, però la mostra es va diluir prèviament per reduir la complexitat i la interferència de la matriu biològica [116]. Altres recobriments antiadherents com el Nafion [117] o la carbazol-quinona [118] també s'han emprat en el desenvolupament de sensors potenciomètrics per mesurar en mostres d'orina, saliva o àcids grassos, però el seus temps d'operació encara no ha estat reportats.

Taula 1: Sensors potenciomètrics de pH descrits a la bibliografia en mostres complexes.

Tipus	Recobriment	Medi	Rendiment a llarg termini	Referència
ISE	Cap	Aigua estuarina	7 h	[114]
ISFET	Cap	Cultius cel·lulars	7 h	[6]
ISFET	Cap	DMEM	7 dies (mesura discreta)	[115]
ISFET	Cap	Aigua estuarina	7 dies amb manteniment regular	[116]

ISE	TiO ₂	Cultiu bacterià	60 dies, 2 h al dia	[117]
ISE	Carbazol-quinona	Orina, saliva	No provat	[113]
ISE	Nafion	Solució de triglicèrids	No provat	[112]
ISE	Polianilina	Cultiu bacterià i llevat	24 h	[109]
ISFET	DOPC	Llet diluïda	60 h	[111]

El temps d'operació més llarg mai reportat per a un sensor de pH és el descrit per Liu et al. [119], corresponent a un ISE que incorpora un recobriment de TiO₂. El sensor va ser capaç de monitoritzar el pH de cultius bacterians durant 60 dies. Tanmateix, el sensor es netejava regularment i operava només 2 hores al dia. A més, el TiO₂ presenta grans limitacions que impedeixen la seva integració en sistema de cultius cel·lular, el més important dels quals és que genera substàncies tòxiques, concretament espècies reactives d'oxigen, que podrien comprometre la viabilitat de les cèl·lules.

També s'han desenvolupat alternatives a les membranes antiadherents, però amb uns resultats limitats. Per exemple, s'ha augmentat el temps de mesura d'ISFETs de pH en mostres d'estuaris integrant el sensor en dispositius que incorporaven un sistema de manteniment automatitzat. En el cas descrit a [40], l'ISFET es va implementar dins d'una estructura microfluídica que netejava el sensor de manera regular i corregia qualsevol desviació en el potencial llindar de l'ISFET associada a aquest fenomen. Amb aquesta estructura fluídica, el sensor va romandre plenament funcional durant 7 dies sense

necessitat d'intervenció externa, però requeria una estructura complexa, gran i costosa econòmicament.

Una altra alternativa va consistir en realitzar mesures discretes i corregir contínuament les variacions de potencial associades a la deriva i/o al *biofouling*, per exemple, mitjançant el recalibratge del sistema. Aquesta és la estratègia presentada per Gonski et al. [120], on la correcció i recalibratge del sensor permet monitoritzar el pH en medis de cultiu durant 7 dies.

Per tant, i considerant els treballs realitzats en aquest camp per millorar la durabilitat, estabilitat i temps de vida dels sensors potenciomètrics per a cultius cel·lulars, la possibilitat de realitzar mesures de forma contínua i freqüent durant més d'una setmana segueix sent un repte no resolt que requereix de noves alternatives que permetin estendre el temps de vida del sensor sense requerir manipulacions, neteges o recalibrats.

Sensors amperomètrics

Els sensors amperomètrics són un cas particular dels sensors voltamperomètrics que mesuren la intensitat de corrent generada per una reacció redox a la superfície de l'elèctrode de treball quan s'hi aplica un potencial constant. Per dur a terme la mesura amperomètrica es necessita un sistema electroquímic que sol estar format per tres elèctrodes (Figura 2.4.7) [121]: (i) un elèctrode de treball, que sol estar compost per un material conductor, generalment un metall noble o carboni, a la superfície del qual té lloc la reacció redox d'interès; (ii) un elèctrode de referència, generalment de Ag/AgCl, que proporciona un valor de potencial constant i s'utilitza per fixar el potencial aplicat a l'elèctrode de treball; i (iii) un contraelèctrode, també compost per un material molt

conductor però amb unes dimensions superiors a l'elèctrode de treball [122], per tal de tancar el circuit elèctric sense limitar el flux de corrent.

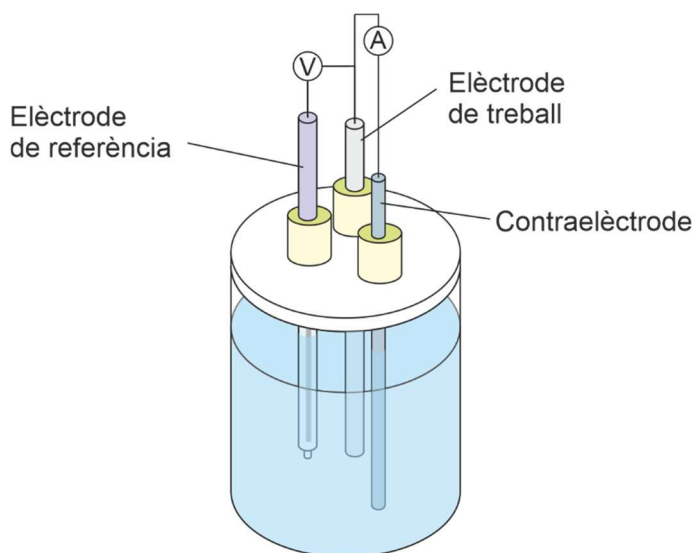


Figura 2.4.7: Cel·la electroquímica de tres elèctrodes.

El sistema electroquímic ve controlat per un circuit electrònic conegut com a potenciostat, que permet fixar el potencial aplicat entre l'elèctrode de treball i el de referència, i simultàniament registrar la intensitat de corrent que circula entre l'elèctrode de treball i el contraelèctrode. La intensitat de corrent generada en un sensor amperomètric és proporcional a la concentració de l'anàlit electroactiu, segons una versió de la Llei de Fick aplicada al transport de massa per difusió. Aquesta expressió, coneguda com a equació de Cottrell, descriu la intensitat de corrent en un sistema transitori (no estacionari) on la reacció electroquímica és controlada per difusió i la concentració canvia amb el temps:

$$I = \frac{nFAc\sqrt{D}}{\sqrt{\pi t}} \quad \text{Equació 10}$$

On I correspon a la intensitat de corrent en funció del temps, n al nombre d'electrons transferits per molècula, F a la constant de Faraday (96,485 C/mol), A a l'àrea de l'elèctrode (cm^2), D al coeficient de difusió de l'anàlit (cm^2/s), c a la concentració de l'anàlit (mol/cm^3) i t al temps (s). Aquesta equació mostra que la corrent decau amb l'arrel quadrada del temps perquè l'anàlit s'esgota prop de la superfície de l'elèctrode al llarg del temps.

En condicions estacionàries (estat estable) la intensitat de corrent I generada en un sensor amperimètric pot descriure's mitjançant una simplificació de l'equació anterior:

$$I = nFAkc \quad \text{Equació 11}$$

On k correspon al coeficient de transferència de massa, que en sistemes estacionaris depèn del tipus de transport de matèria. Per exemple, si el sistema està controlat per una difusió pura i estacionària, k es pot descriure com:

$$k = \frac{D}{\delta} \quad \text{Equació 12}$$

on δ correspon al gruix de la capa de difusió (en cm).

Aquesta relació lineal entre I i c permet quantificar l'anàlit de manera directa, senzilla i ràpida, el que els fa especialment adequats per a mesures in situ i en temps real [123]. També acostumen a mostrar una bona relació lineal entre la concentració de l'anàlit i la intensitat de senyal generada, la qual cosa proporciona un ampli rang de quantificació [124]. A més, són miniaturitzables i fàcilment integrables en estructures microfluídiques [125], el que els fa ideals per al desenvolupament de sistemes LoC.

Tanmateix, presenten limitacions importants en termes de selectivitat, susceptibilitat a interferències, envelliment i enverinament del sensor. En primer lloc, aquests sistemes requereixen un control molt precís del potencial aplicat, així com de l'estat de la superfície de l'elèctrode de treball. Canvis a la superfície de l'elèctrode, com els associats a processos d'adsorció inespecífica de molècules, poden provocar l'enverinament i la desactivació parcial o total del sensor, cosa que altera la seva resposta i compromet la fiabilitat de les dades proporcionades [126]. A més, moltes espècies redox presenten potencials d'oxidació o reducció similars, el que redueix la selectivitat de la mesura [127].

Un aspecte important en el cas dels sensors amperomètrics és que només aquelles espècies amb capacitat de transferir electrons, conegudes com a espècies redox, poden detectar-se mitjançant amperometria. Per tal d'incrementar l'aplicabilitat d'aquest tipus de sensors s'han desenvolupat estratègies en les que l'espècie d'interès, malgrat no tenir propietats redox, es pot detectar mitjançant reaccions redox acoblades al seu reconeixament. Un cas particular d'aquesta estratègia consisteix en fer servir biomolècules, donant lloc al que es coneixen com a biosensors amperomètrics. Aquest tipus de dispositius es descriuran amb detall en el següent apartat.

Biosensors amperomètrics: Definició, classificació, característiques i limitacions

Segons la IUPAC [53], un biosensor es defineix com “un dispositiu que utilitza reaccions bioquímiques específiques mediades per enzims aïllats, immunosistemes, teixits, orgànuls o cèl·lules senceres per detectar compostos químics normalment mitjançant senyals elèctrics, tèrmics o òptics”. Aquest dispositiu es compon principalment de tres

elements: un element de reconeixement biològic, un transductor fisicoquímic (en el cas dels biosensors amperomètrics un transductor electroquímic amperomètric), i un sistema d'amplificació i processament de dades.

Els biosensors es poden classificar segon el tipus d'element de reconeixement en (i) biosensors enzimàtics, quan utilitzen l'activitat biocatalítica dels enzims per detectar molècules o biomolècules mitjançant reaccions específiques [128]; (ii) immunosensors, quan utilitzen la capacitat dels anticossos per reconèixer de forma selectiva molècules d'interès, sigui anticossos sencers o fragments com en el cas dels "nanobodies" [129]; (iii) Genosensors, basats en àcids nucleics i en la hibridació selectiva de cadenes d'ADN (àcid desoxiribonucleic) [130]; (iv) aptasensors, quan l'element de reconeixement selectiu és un aptàmer [131]; (v) biosensors cel·lulars, quan fan servir cèl·lules vives o teixits com a element de reconeixement [132]; i (vi) biosensors basats en receptors moleculars artificials o biomimètics com per exemple els basats en MIPS (de l'anglès, *molecular imprinted polymers*) [133].

A nivell de característiques, els biosensors amperomètrics combinen l'elevada sensibilitat, rang lineal ampli, temps de resposta curt i simplicitat de la mesura dels sensors amperomètrics, amb la gran selectivitat que els confereix l'element de reconeixement biològic, el que els fa ideals en diferents camps d'aplicació com el diagnòstic clínic [134], la monitorització mediambiental [135] o el control de qualitat de la indústria alimentària [136].

Malgrat el seu gran potencial, els biosensors són uns dispositius relativament recents. El primer biosensor amperomètric va ser desenvolupat l'any 1962 per part de Clark i Lyons [137]. Es tractava d'un biosensor enzimàtic que incorporava una membrana amb l'enzim glucosa oxidasa (GOx) i permetia realitzar una mesura selectiva de la

concentració de glucosa (una espècie no electroactiva en un rang normal de potencial), que no es podia detectar directament mitjançant amperometria. Tanmateix, gràcies a l'activitat enzimàtica de la GOx, és possible determinar-ne la concentració de manera indirecta mitjançant el seguiment de molècules redox generades o consumides en la reacció. Concretament, la glucosa oxidasa catalitza l'oxidació de la glucosa en presència d'oxigen, produint àcid glucònic i peròxid d'hidrogen (H_2O_2). Tant l'oxigen com el peròxid d'hidrogen són compostos amb propietats redox que es poden detectar electroquímicament i, per tant, fer servir com a senyal analítica (Figura 2.4.8).

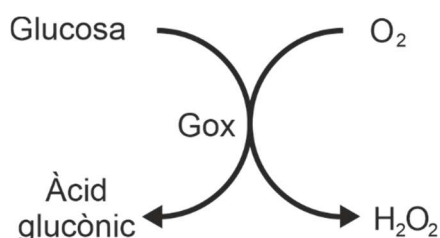


Figura 2.4.8: Reacció d'oxidació de la glucosa per l'oxigen catalitzada per l'enzim GOx.

De fet, el primer biosensor enzimàtic mesurava precisament el consum d'oxigen. Els biosensors enzimàtics com aquest, que mesuren productes de la reacció enzimàtica com el H_2O_2 o O_2 [138], [139], [140], es coneixen com a sensors de primera generació (Figura 2.4.9). La seva gran limitació rau en el fet que aquestes espècies redox requereixen l'aplicació de potencials elevats durant la mesura, fet que incrementa el risc de la reducció o oxidació d'altres espècies redox presents en la mostra, com per exemple l'àcid ascòrbic en el cas de mostres biològiques, sent, per tant, molt susceptibles a interferències.

Per tal de superar aquesta limitació, a mitjans dels anys 60 es van desenvolupar els biosensors amperomètrics de segona generació [141], els quals utilitzaven mediadors com el ferroccè [142], el ferrocianur [143] o la 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) [144]. En aquest tipus de sensors, els mediadors actuen com a transportadors d'electrons: accepten electrons des de l'enzim (com la GOx) o d'alguna de les espècies redox que intervenen en la reacció de reconeixement durant l'oxidació del substrat, i posteriorment transfereixen aquests electrons a l'elèctrode, generant un corrent mesurable.

Aquests mediadors permeten reduir el potencial necessari per efectuar la mesura, millorant-ne així l'especificitat. La seva principal limitació és la dificultat per immobilitzar els mediadors de manera estable dins l'arquitectura del sensor. La pèrdua progressiva del mediador durant l'ús o amb el temps pot provocar una disminució de la senyal, independentment de la concentració real de substrat, fet que compromet la seva fiabilitat analítica.

Per tal de resoldre aquest inconvenient, s'han desenvolupat biosensors de tercera generació, on es promou la transferència directa d'electrons entre l'enzim i l'elèctrode sense necessitat de mediadors. Aquest tipus de biosensors es basen en l'ús de nanoestructures conductores com els nanotubs de carboni [145], el grafè [146] o altres [147], [148]. Malgrat no requerir mediadors, aquests sensors presenten problemes d'estabilitat, sensibilitat i durabilitat, pel que els sensors de segona generació continuen sent avui en dia els més utilitzats i comercialitzats.

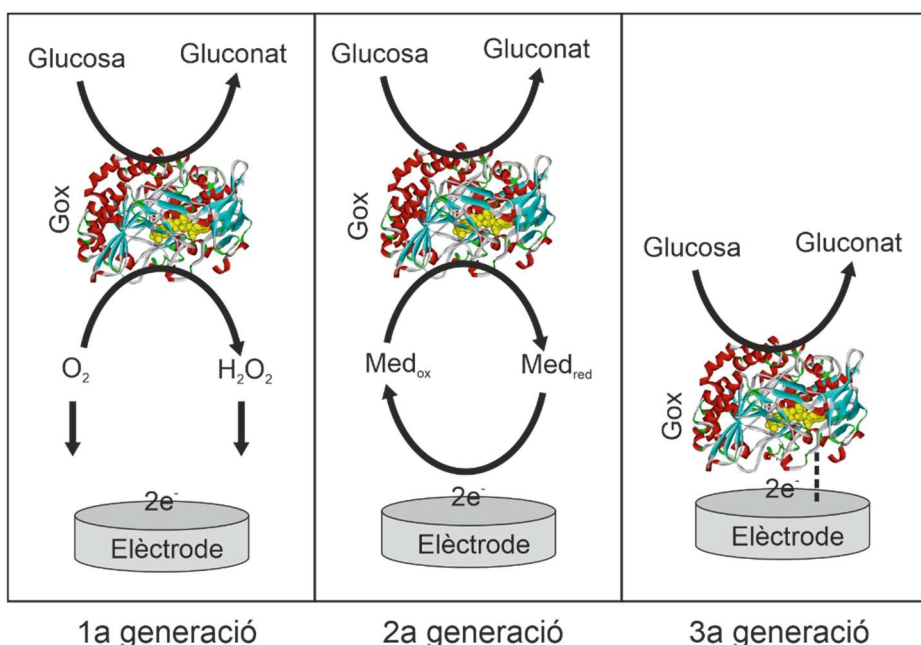


Figura 2.4.9: Evolució dels sensors enzimàtics de glucosa: de la primera a la tercera generació.

Considerant els aspectes anteriorment comentats, un dels grans reptes dels biosensors amperomètrics actuals continua sent la immobilització estable i funcional tant de l'element de reconeixement biològic com del mediador en l'estructura sensora. En aquest sentit, és important remarcar que l'element de reconeixement biològic és molt sensible a canvis estructurals que deriven amb una pèrdua de funcionalitat. Per exemple, l'activitat dels enzims ve donada per la seva estructura terciària, és a dir, pel seu plegament i orientació tridimensional. Si aquesta canvia, l'enzim pot perdre la seva capacitat de reconèixer i catalitzar la reacció específica, fet que en compromet l'eficiència i, conseqüentment, afecta la resposta del biosensor [149]. Per tant, la selecció del mètode d'immobilització del component biològic (enzim, anticòs, àcid nucleic, etc.) sobre la superfície del transductor serà clau en el desenvolupament de biosensors, ja que influeix directament en la

seva estabilitat, sensibilitat i temps de vida útil. Les estratègies més comunes es poden classificar en quatre grans grups [150], [151]:

1. Adsorció física, en què l'element de reconeixement s'immobilitza sobre la superfície del transductor mitjançant interaccions no covalents febles, com ara forces de van der Waals, interaccions hidrofòbiques o electroestàtiques. Aquesta tècnica és molt senzilla i ràpida, i habitualment preserva l'activitat biològica del receptor. No obstant això, el fet de basar-se en interaccions febles comporta un risc elevat de desorció o lixiviació del bioreceptor, a més de presentar una baixa reproductibilitat [152].

2. Enllaç covalent, en què es formen enllaços químics estables entre grups funcionals del bioreceptor ($-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{SH}$) i grups activats de la superfície del transductor. Entre els agents activadors més habituals hi ha el sistema EDC/NHS (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida/N-hidroxisuccinimida), utilitzat per activar grups carboxílics [153], així com el glutaraldehid, emprat per a la reticulació de grups amino [154], i els compostos de la família dels silans, especialment útils en superfícies amb grups hidroxil. Aquesta estratègia proporciona una immobilització robusta i duradora, amb la possibilitat d'orientar correctament el receptor. Tot i així, és un mètode químicament més complex, no reversible, i pot comprometre l'activitat biològica si l'enllaç covalent es produeix en un lloc actiu funcional del bioreceptor.

3. Afinitat específica o autoassemblatge, una estratègia que aprofita la interacció específica entre biomolècules (com el sistema biotina-estreptavidina [155]) o fenòmens d'autoorganització molecular (com les capes autoassemblades, conegudes com *self-assembled monolayers* [156]) per immobilitzar el bioreceptor de forma estable. Aquest mètode ofereix una alta especificitat i permet controlar l'orientació del receptor,

cosa que contribueix a preservar la seva activitat biològica. No obstant això, acostuma a requerir procediments llargs i complexos, sovint amb la necessitat de modificar químicament el propi bioreceptor, fet que en pot afectar la seva activitat, augmentar el cost i la dificultat d'implementació.

4. Atrapament (o encapsulació), mètode que consisteix en immobilitzar el bioreceptor dins d'una matriu, generalment polimèrica o basada en gels, dipositada sobre la superfície del transductor [157]. El procediment implica barrejar el bioreceptor amb el precursor de la matriu, i posteriorment induir la seva polimerització o gelificació. Aquesta tècnica és especialment adequada per a materials biocompatibles com l'alginat [158] o el Nafion [159], i es realitza sota condicions suaus (pH neutre, baixa temperatura o irradiació suau) per evitar la desnaturalització de la biomolècula. Com a principal limitació, el fet que el receptor quedi encapsulat pot dificultar el transport de l'anàlit fins al lloc actiu, donant lloc a una cinètica de resposta més lenta. A més, l'estabilitat del receptor dins la matriu depèn tant de les propietats fisicoquímiques del material (porositat, estabilitat mecànica i química, permeabilitat) com de les condicions ambientals i d'emmagatzematge. En matrius altament poroses, el receptor podria difondre i alliberar-se amb el temps, comprometent la funcionalitat del sensor.

En aquest context, una de les matrius que presenta unes millors condicions d'atrapament per al desenvolupament de biosensors és la matriu de la fibroïna de seda. Les principals característiques d'aquesta matriu en el desenvolupament de biosensors es descriuran a continuació.

Fibroïna de la seda en el desenvolupament de biosensors de llarga vida

La fibroïna de la seda (SF, de l'anglès *silk fibroin*) és una proteïna d'origen natural que, juntament amb la sericina, constitueixen els principals components de la seda produïda pel cucs de seda *Bombyx mori* [160]. La seva extracció dels capolls de *Bombyx mori* requereix varies etapes, incloent (i) l'eliminació de la sericina per ebullició amb carbonat de sodi, (ii) la solubilització de la fibroïna utilitzant bromur de liti i (iii) la purificació de la fibroïna mitjançant diàlisi. Aquest procés, que pot durar més d'una setmana, permet obtenir una solució aquosa de fibroïna amb una concentració compresa entre el 5% i el 22%, límit establert per la seva solubilitat. Aquestes solucions són estables durant 2 a 3 mesos si es conserven a 4 °C; a partir d'aquest moment, la SF tendeix a gelificar espontàniament.

La fibroïna es compon principalment de dues cadenes polipeptídiques: una de pes molecular elevat, anomenada cadena pesada (H), d'aproximadament 391 kDa, i una altra de lleugera (L), d'uns 25 kDa. Ambdues estan enllaçades mitjançant un pont disulfur en l'extrem C-terminal de la cadena H. A més, una tercera proteïna, la glicoproteïna P25, s'uneix de manera no covalent al complex H-L, conferint-li estabilitat estructural (Figura 2.4.10A) [161].

La cadena pesada de la fibroïna presenta una seqüència altament repetitiva rica en glicina (43-46%), alanina (25-30%) i serina (12%), que la fan majoritàriament hidrofòbica i poc reactiva. No obstant, la presència de petites quantitats d'aminoàcids amb grups funcionals reactius, com la tirosina (~5%), que conté grups fenòlics, o l'àcid aspàrtic, amb grups carboxílics ionitzables, li atorguen una certa reactivitat química i hidrofilitat [162]. Aquests grups funcionals també determinen el seu plegament i estructura tridimensional. Per una banda,

els aminoàcids hidrofòbics de la cadena s'empaqueten en forma de barrils β cristal·lins, que proporcionen a la seda la seva elevada resistència mecànica, hidrofobicitat i insolubilitat en medis aquosos. Per altra banda, els aminoàcids amb grups funcionals polars o ionitzables s'agrupen en dominis amorfs i hidrofílics, predominantment en forma d'hèlix α [163]. Aquesta combinació de regions cristal·lines hidrofòbiques i amorfes hidrofíliques (Figura 2.4.10B) proporciona als films de SF unes propietats prometedores en el desenvolupament de sensors com per exemple; una elevada estabilitat mecànica [164], flexibilitat [165], estabilitat química [166], biocompatibilitat i biodegradabilitat [167], o transparència en el rang del visible [168], entre d'altres. A més, estudis recents han demostrat que els films de SF presenten altres atributs que els fan molt interessant en el desenvolupament del biosensors. Els Professors Kaplan i Omenetto, grans experts mundials en seda i inventors de les tecnologies de seda emprades actualment mitjançant tècniques de micro i nanofabricació, van demostrar que la SF podia retenir biomacromolècules, incloent enzims, anticossos o antibiòtics, durant llargs períodes de temps, sense afectar la seva estructura i funcionalitat [169]. Aquests estudis inicials van ser completats en el GTQ pel Dr. Augusto Márquez, qui va demostrar que els enzims GOx i HRP immobilitzats dins matrius de seda mantenien la seva activitat inicial (la que presentaven el primer dia de preparació) durant més de 8 mesos sense requeriments d'emmagatzematge (films secs mantinguts a temperatura ambient) [170]. Addicionalment, els treballs del Dr. Márquez van identificar dues característiques d'aquests films de SF molt rellevants en el desenvolupament de biosensors i sistemes microfluídics. En primer lloc, van demostrar que els films de seda presenten mullabilitat i capacitat capil·lar, amb valors similars als que proporcionen els papers de

nitrocel·lulosa. Aquesta propietat és molt interessant en sistemes microfluídics ja que posiciona la seda com un competidor més estable i biocompatible que el paper en el desenvolupament de sistemes de flux lateral. Per altra banda, va demostrar que la porositat dels films era molt petita, d'entre 10 i 50 nm, i permetia realitzar un filtratge molecular i cel·lular de mostres biològiques complexes. Per exemple, en el cas de mostres de sang, la membrana de SF era capaç d'impulsar el plasma mentre retenia la fracció cel·lular. A més, aquesta porositat es podia modular mitjançant diferents tècniques com el liofilitzat o secatge de mostres congelades (*freeze drying*) o fent patrons mitjançant tècniques de micro i nanofabricació com la litografia de flux d'electrons o la litografia tova.

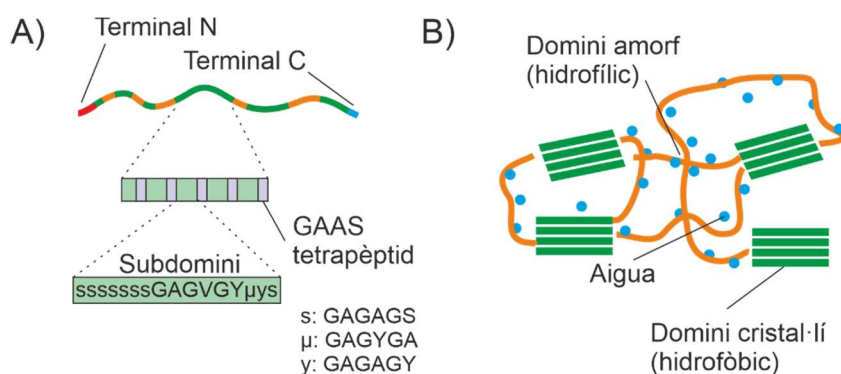


Figura 2.4.10: Estructura molecular de la fibroïna de la seda (A) i esquema dels dominis en l'estructura de la fibroïna (B).

Aquestes propietats fan de la seda un material únic i molt avantatjós en el desenvolupament de biosensors, sobretot en aquells casos on l'estabilitat del receptor sigui clau per garantir la qualitat i fiabilitat dels resultats. Aquest és precisament el cas dels cultius cel·lulars, on un control estricte del cultiu implica realitzar mesures continues i freqüents

durant tot l'estudi *in vitro*, el que pot requerir mesurar durant períodes superiors a 7 dies.

2.5. Estat de l'art dels sistemes lab-on-a-chip per cultiu cel·lular integrant sensors i biosensors

Encara avui en dia, la integració de sensors en entorns de cultiu cel·lular continua presentant limitacions significatives, especialment pel que fa a la durabilitat dels sensors en medis complexos [171].

A nivell comercial, només uns pocs dispositius han assolit una integració robusta de sensors, entre ells el DOX-96 (Dalkin Industries Ltd), el Cytosensor® Microphysiometer, el BIONAS 2500 (Bionas GmbH) i el sistema xCELLigence (ACEA Biosciences). Aquests sistemes han demostrat la viabilitat de la transducció integrada per monitorar paràmetres com la respiració cel·lular, el pH extracel·lular o l'adhesió cel·lular. Cal destacar que xCELLigence és l'únic d'aquests sistemes encara disponible al mercat, probablement per l'ús de sensors d'impedància, menys sensibles al *biofouling* que els sensors potenciomètrics o amperomètrics.

A nivell acadèmic, estudis recents han explorat la integració de sensors per a la monitorització prolongada de cultius cel·lular, tant en sistemes LoC com en bioreactors (Taula 2). Aquests sensors es poden classificar segons dos criteris: el mode de mesura (contínua vs. discreta) i la seva ubicació (integrats a la cambra de cultiu o associats a circuits microflúidics externs). Els paràmetres més habitualment monitoritzats inclouen oxigen, glucosa, lactat i pH, o paràmetres biofísics com la resistència cel·lular, la força de tracció o la diferenciació osteogènica. Pel que fa als tipus de cultius cel·lulars estudiats, s'han monitoritzat cultius de fibroblasts, cèl·lules derivades de teixits humans, com cardiomiòcits o cèl·lules canceroses, línies CHO (*Chinese Hamster*

Ovary), aquestes últimes molt utilitzades en biotecnologia per a la producció de proteïnes [172]. També, s'han monitoritzat cultius 3D, co-cultius, sistemes organ-on-a-chip i biofilms bacterians o fúngics.

Una estratègia comuna per prolongar la vida útil del sensor consisteix a fer circular el medi de cultiu de forma periòdica a través de sensors externs, realitzant mesures discretes que permeten reduir el temps de contacte entre el sensor i el medi de cultiu, limitant el *biofouling* i permetent recalibratges continus del sensor. Aquests mesuren paràmetres químics utilitzant transducció òptica [173], [174] i electroquímica [175], [176], [177]. Un estudi destacable és el de Zhang [178], que permet fer mesures discretes (una vegada al dia), de glucosa, lactat, oxigen, pH, temperatura i albúmina. Aquests paràmetres s'han monitoritzat durant cinc dies consecutius en un sistema organ-on-a-chip de co-cultiu amb hepatòcits primaris humans i cardiomiòcits derivats de cèl·lules mare pluripotents induïdes humanes. Altres estudis [179], [180], [181], [182], [183], han aconseguit fer mesures en cultius d'entre 10 i 22 dies fent un monitoratge amb mesures discretes (una mesura per cada tres dies en el cas de 22 dies). Aquests sistemes, o bé no mesuren en matrius molt complexes (medi sense cèl·lules), o bé fan mesures de les cèl·lules amb tincions, o bé utilitzen equipament com l'anàlisi d'injecció de flux (FIA) per processos de neteja i/o recalibració per cada mesura que no eviten el *biofouling* però permet fer la mesura. Paral·lelament, altres estudis han desenvolupat sensors per a la monitorització més freqüent del medi de cultiu, que permeten una detecció dinàmica i en alta resolució de les variacions ambientals. Malgrat els avantatges, aquest tipus de sensors és particularment vulnerable a problemes com el drift, el *fouling* i la desactivació enzimàtica, factors que limiten la seva operativitat habitual a menys de tres dies [175], [184], [185], [186], [187], [188], [189], [190].

Una excepció són els sensors d'impedància, que han demostrat un millor comportament a llarg termini, tal com evidencien sistemes amb funcionalitat fins a 14 o 20 dies [191], [192]. Aquests xips mesuren entre altres, la resistència elèctrica transepitelial/transendotelial (TEER) [193] i la migració/invasió cel·lular [194]. Tanmateix, l'anàlisi és limitat: no poden mesurar molècules concretes ni detectar processos subcel·lulars com l'activitat mitocondrial o els canvis en metabòlits específics. Per això, tot i la seva robustesa temporal, els sensors d'impedància resulten complementaris (i no alternatius) als dispositius electroquímics o òptics que ofereixen selectivitat molecular i lectures directes del metabolisme. Cal remarcar, que en els sensors d'impedància, l'acumulació cel·lular sobre els elèctrodes no és un problema sinó el mecanisme de transducció: el senyal elèctric deriva directament de l'adhesió i dels canvis morfològics de la capa cel·lular, de manera que el *biofouling* és aquí un efecte desitjat i inherent a la mesura.

Per combatre el *biofouling* amb altres sensors, diversos sensors han incorporat recobriments *antifouling*, com capes de poliuretà [195] o membranes de fluorur de polivinilidè [196], i s'han aconseguit durabilitats de fins a 8–12 dies. Tanmateix, la majoria d'aquests estudis no contrasten els resultats amb sensors comercials, i per tant, no és possible valorar objectivament la fiabilitat de les mesures realitzades [190], [197], [198], [199], [200], [201]. Només quatre articles han aconseguit integrar sensors capaços de funcionar més de quatre dies amb fiabilitat provada, posant de manifest la dificultat tècnica d'aquesta fita [196], [202], [203], [204]. En concret: (i) Lederle et al. descriuen un biosensor on-line per a cultius de cèl·lules CHO basat en una capa de glucosa oxidasa immobilitzada sobre un sensor òptic d'oxigen comercial. El consum d'O₂ durant l'oxidació de la glucosa es llegeix fotomètricament i permet un control estable del nivell de glucosa al llarg

de dues setmanes. (ii) El mateix grup amplia la metodologia en un capítol de *Methods in Molecular Biology*, demostrant estabilitat amb deriva mínima en *shake-flasks* i bioreactors de bossa d'un sol ús durant tot el cicle CHO (≈ 12 dies). (iii) Dahlmann et al. presenten un sensor compacte que calcula el consum específic d'oxigen (qOUR): una microcambra es tanca temporalment, es mesura la caiguda de pO_2 amb un optode i, juntament amb la llum dispersada, s'estima la biomassa. El sistema va monitoritzar amb èxit un cultiu CHO durant 8 dies seguits. (iv) per últim, Tric et al. descriuen un biosensor òptic basat en un sensor de O_2 modificat amb GOx amb una membrana ceràmica difusora que manté resposta lineal (0–20 mM) i que ha sigut capaç de monitoritzar glucosa durant 11 dies en un bioreactor amb cèl·lules CHO.

En resum, tot i els avenços substancials dels darrers anys, la majoria dels sensors per a la monitorització cel·lular a llarg termini continuen presentant limitacions importants pel que fa a estabilitat, *fouling* i degradació. Aquests desafiaments subratllen la necessitat de continuar desenvolupant nous materials, estratègies *antifouling* innovadores i sistemes de calibratge automàtic que permetin una monitorització realment robusta, precisa i sostinguda, compatible amb les necessitats reals de la recerca biomèdica i l'enginyeria de teixits.

Taula 2: Comparativa de sensors integrats de llarga durada per a la monitorització de cultius cel·lulars en dispositius lab-on-a-chip.

Tipus de mesura	Tipus de sensor	Temps d'operació	Paràmetre mesurat	Correlació	Tipus de cultius	Ref.
Discreta	electroòptic	Cada 12 h durant 7 dies	pH	Sense control	Monocapa de cèl·lules de melanoma de pell de ratolí B16-F10	[173]
Discreta	Amperomètrics	Cada 2 hores	Glucosa i lactat	Deriva 0,03mV/dia	Monocapa de HepG2 (fetge)	[175]
Discreta	Òptic	Cada 3 dies durant 23 dies	Oxigen i pH	Sense control	Organoid de cèl·lules endotelials vasculars umbilicals humanes primàries (HUVeC) i cèl·lules epitelials intestinals Caco-2 humanes	[182]
Discreta	Amperomètrics	Cada dia durant 22 dies	Glucosa, lactat i glutamina	Bona correlació	Monocapa de Híbridoma de rata (ATCC HB58)	[181]
Discreta	ISE	Cada dia durant 10 dies	pH	Bona correlació	Medi de cultiu cel·lular d'ovari de hàms xinès (CHO)	[180]
Discreta	Amperomètrics	Cada dia durant 7 dies	Glucosa i lactat	Sense control	Monocapa de Cèl·lules H1299 (línia cel·lular de càncer de pulmó humà)	[176]

Continuació de taula 2

Tipus de mesura	Tipus de sensor	Temps d'operació	Paràmetre mesurat	Correlació	Tipus de cultius	Ref.
Discreta	Amperomètric	Cada dia per 4 dies	Glucosa	Sense control	Monocapa de Fibroblasts NIH 3T3	[177]
Discreta	Òptic	Cada dia durant 7 dies	Ressonància de plasmó superficial localitzat	Sense control	Monocapa de Fibroblasts NIH 3T3	[174]
Discreta	pH: Òptic, altres: Amperomètric	Cada dia durant 5 dies	pH, oxigen, albúmina, temperatura	Sense control	Organoid de Hepatòcits hepàtics HepG2 i cardiomiòcits derivats de cèl·lules (iPSC-CM)	[178]
Discreta	Sensor de fluorescència	Cada dia durant 14 dies	Tinció amb MTT	Sense control	Monocapes de Fibroblasts humans tenyits amb ER-Tracker Green (Invitrogen); HaCaT- tenyit amb ER-Tracker Green i HEK293 que expressa EGFP	[179]
Discreta	Fluorescència	Cada dia durant 20 dies	Oxigen	Bona correlació	Monocapa de cèl·lules renals de hámster nadó (BHK-21)	[183]
Contínua	pH- ISE, altres Amperomètrics	12 hores	pH Oxigen, glucosa i lactat	Sense control	Monocapa glioblastoma T98G	[205]

Continuació de taula 2.

Tipus de mesura	Tipus de sensor	Temps d'operació	Paràmetre mesurat	Correlació	Tipus de cultius	Ref.
Contínua	ISFET	20 hores	pH	Sense control	Monocapes de cèl·lules de càncer de fetge humà Hepg2; cèl·lules de càncer de coll uterí HeLa; Cèl·lula endotelial de vena umbilical humana HUVEc	[184]
Contínua	Òptic	24 hores	Oxigen	Sense control	Monocapa de cardiomiòcits derivats d'IPSC humanes	[185]
Contínua	Potenciomètric	30 hores	pH	Bona correlació	Biofilm de fong unicel·lular <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[187]
Contínua	Amperomètric	50 hores	Oxigen	Sense control	Cèl·lules de càncer de mama T-47D i MCF-7 i cèl·lules T98G de glioblastoma multiforme humà	[188]
Contínua	Amperomètric	6 dies	Glucosa	Sense control	Monocapes de cèl·lules T de ronyó embrionari humà-293, línia cel·lular de fetge normal humà LO2 i cèl·lules H1299 línia cel·lular de càncer de pulmó de cèl·lules humanes	[195]
Contínua	Òptic	2 dies	Oxigen	Bona correlació	Biofilm de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[189]

Continuació de taula 2.

Tipus de mesura	Tipus de sensor	Temps d'operació	Paràmetre mesurat	Correlació	Tipus de cultius	Ref.
Contínua	Impedància	20 dies	Resistència cel·lular/adhesió	Sense control	Monocapa de cèl·lules mare mesenquimals de rata Sprague-Dawley (SD)	[191]
Contínua	Impedància	14 dies	Impedància	Sense control	Monocapa de cèl·lules renals CV-1 i cèl·lules de carcinoma de còlon LS174T	[192]
Contínua	Amperomètric	3 dies	Glucosa	Sense control	Monocapa de cèl·lules PC9 de càncer de pulmó humà	[190]
Contínua	Capacitància	4 dies	Adhesió cel·lular	Sense control	Monocapa de cèl·lules musculars il·lises aòrtiques bovines (BAOSMC)	[197]
Contínua	Amperomètric	5 dies	H ₂ O ₂	Sense control	Cultiu 3D d'hidrogels de PAni amb cèl·lules K562 de leucèmia mieloide crònica	[198]
Contínua	Amperomètrics	5 hores	Glucosa i lactat	Sense control	Organoid de condrocits primaris humans	[199]

Continuació de taula 2.

Tipus de mesura	Tipus de sensor	Temps d'operació	Paràmetre mesurat	Correlació	Tipus de cultius	Ref.
Contínua	Amperomètric	7 dies	Oxigen	Bona correlació	Cèl·lules en suspensió de Komagataella phaffii	[202]
Contínua	Òptic	7 dies	Glucosa	Bona correlació	Cèl·lules en suspensió d'ovari de hàrmster xinès	[203]
Contínua	Òptic	8 dies	Glucosa	Bona correlació	Cèl·lules en suspensió d'ovari de hàrmster xinès	[204]
Contínua	Amperomètric	8 dies	Oxigen	Sense control	Monocapa de cèl·lules de càncer de mama -47D	[200]
Contínua	Fluorescència	12,5 dies	Glucosa	Sense control	Microesferes d'alginat/GelMA amb adenocarcinoma colorrectal humà (Caco2)	[201]
Contínua	Òptic	11 dies	Glucosa	20% canvi de sensibilitat	Cèl·lules en suspensió d'ovari de hàrmster xinès	[196]

3. Objectius

En aquest capítol s'exposen els objectius generals i específics de la tesi.

L'objectiu general d'aquesta tesi és el desenvolupament, integració i validació de sensors òptics i electroquímics per a la monitorització en temps real i a llarg termini de paràmetres químics i metabòlics dels cultius cel·lulars en sistemes LoC. Els sensors desenvolupats es basen en tecnologies microelectròniques i han estat dissenyats per superar limitacions actuals com la curta vida operativa, la susceptibilitat al *biofouling* i les dificultats de monitorització contínua i integració dels dispositius actuals.

Per assolir aquest objectiu general, la tesi considera els següents objectius específics:

- Desenvolupament, validació i integració en estructures LoC per cultius cel·lulars de sensors de pH basats en ISFETs recoberts amb membranes de SF per a la monitorització del metabolisme cel·lular durant llargs períodes de temps.
- Desenvolupament, validació i integració en estructures LoC per cultius cel·lulars de biosensors amperimètrics enzimàtics funcionalitzats amb membranes de SF per al monitoratge del metabolisme cel·lular i l'acció de fàrmacs anti- i pro-proliferatius.
- Desenvolupament, validació i integració en estructures LoC per cultius cel·lulars de sensors òptics per a la monitorització no invasiva del procés de diferenciació cel·lular de pre-adipòcits a adipòcits blancs.

Amb aquests objectius, la tesi pretén contribuir al desenvolupament de sistemes de monitoratge més robustos, integrables i estables per a aplicacions biomèdiques, d'enginyeria de teixits i de cultiu cel·lular avançat.

4. Materials i Mètodes

Aquest capítol recull els reactius, solucions i medis utilitzats en aquesta tesi, així com els materials, instruments, tècniques i protocols realitzats per obtenir els resultats presentats en aquesta tesi.

4.1. Reactius.

Els reactius, solucions, patrons i tampons emprats en aquesta tesi es detallen a continuació, indicant les seves característiques més importants per qüestions de traçabilitat i reproductibilitat dels resultats obtinguts. Totes les solucions i reactius es van fer servir tal i com van ser subministrades pels proveïdors, sense realitzar cap procés de purificació addicional. Les solucions i els tampons es van preparar utilitzant aigua desionitzada de 18 MΩ/cm.

4.1.1. Reactius i Patrons

Reactius per a la funcionalització d'ISFETs i sensors amperomètrics:

Glucosa oxidasa (GOx), *Aspergillus niger*, 100,000-250,000 units/g sòlid – Merck, Alemanya; 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB), C₁₆H₂₀N₂, ≥97 % – Merck, Alemanya.

Reactius per a la mesura, neteja i caracterització dels sensors:

Bromur de liti (LiBr), ≥99 % – Merck, Alemanya; Carbonat de sodi (Na₂CO₃) 99,5% – Merck, Alemanya; Àcid sulfúric concentrat, 95–98 % – Pan-Reac, Espanya; Ferricianur de potassi (K₃[Fe(CN)₆]), ≥98,5 % – Merck, EUA; Glucosa D-(+) anhidra, C₆H₁₂O₆, ≥99,5 % – Merck, Alemanya.

Reactius per a la fabricació de dispositius microfluídics:

Àcid acrílic, CH₂=CH–COOH, ≥99 % (ACS) – Merck, Alemanya; SYLGARD 184 (PDMS), relació base/crosslinker 10:1 – Dow, EUA; Poli-L-lisina, PM 30 000–70 000, 0,1 % w/v – Merck, Alemanya.

4.1.2. Tampons i solucions

Per a la caracterització dels sensors ISFETs, es van utilitzar diferents tampons:

Tampó Britton–Robinson: 0,04 M àcid acètic $\geq 99,8 \%$ (Merck, Alemanya), 0,04 M àcid ortofosfòric $\geq 85 \%$ (PanReac, Espanya), 0,04 M àcid bòric $\geq 99,5 \%$ (PanReac, Espanya); 0,1 M nitrat de potassi $\geq 99 \%$ (Merck, Alemanya).

Solucions patró de pH (PanReac AppliChem, ITW Reagents): solucions comercials amb incertesa $\pm 0,02$ pH a 20°C ; llistat de referència i codi de producte: pH 2,00 (codi 272581); pH 3,00 (272537); pH 4,00 (272168); pH 5,00 (272582); pH 6,00 (272549); pH 7,00 (272170); pH 8,00 (272583); pH 9,00 (272172); pH 10,00 (272584); pH 11,00 (272585); pH 12,00 (272586); pH 13,00 (272587). La composició exacta de cada solució patró es pot consultar a la fitxa tècnica corresponent del fabricant.

La fibroïna s'ha utilitzat en diferents sensors; tant en la fabricació d'ISFETs funcionalitats com en la fabricació dels biosensors amperomètrics:

Preparació de la solució de fibroïna:

Les solucions aquoses de fibroïna de seda van ser subministrades per part del Dr. Salvador Aznar del *Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental* (IMIDA). Aquesta solució aquosa de fibroïna es preparava a partir de capolls del cuc de seda *Bombyx mori*, cultivats en les mateixes instal·lacions de l'IMIDA.

Per iniciar el procés, detallat en [206], es van tallar 5 grams de capolls (Figura 4.1.1A), en fragments petits. Aquests es van introduir en 500 ml de carbonat de sodi (Na_2CO_3 , Merck, 99,5%) 0,02 M, on es feien bullir a 95°C durant 30 minuts (Figura 4.1.1B).

Aquest procés permet solubilitzar la sericina de la seda i aïllar la fibroïna en forma de fibres insolubles.

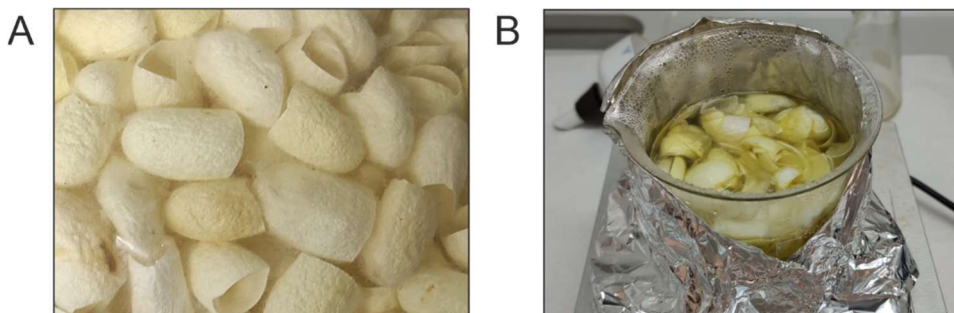


Figura 4.1.1: Protocol per l'obtenció de solució de fibroïna 1. (A) Capolls de cucs de seda. (B) Desnaturalització dels capolls en 0,02 M de carbonat de sodi.

Les fibres de fibroïna (Figura 4.1.2A) es van aïllar mitjançant filtració al buit amb un embut Büchner, netejant tres vegades amb aigua desionitzada per eliminar les restes de sericina. Les fibres es deixaven assecar durant tota la nit i es dissolien en una solució de LiBr 9,3 M. Per assegurar la dissolució de la fibroïna, es feia servir una proporció de 4 ml de LiBr per cada gram de fibroïna seca. La barreja es mantenia a 60°C amb agitació mitjançant una placa calefactora (Gestigkeit Harry; Fisher Scientific, Alemanya) durant quatre hores fins a la total dissolució de la fibroïna (Figura 4.1.2B).

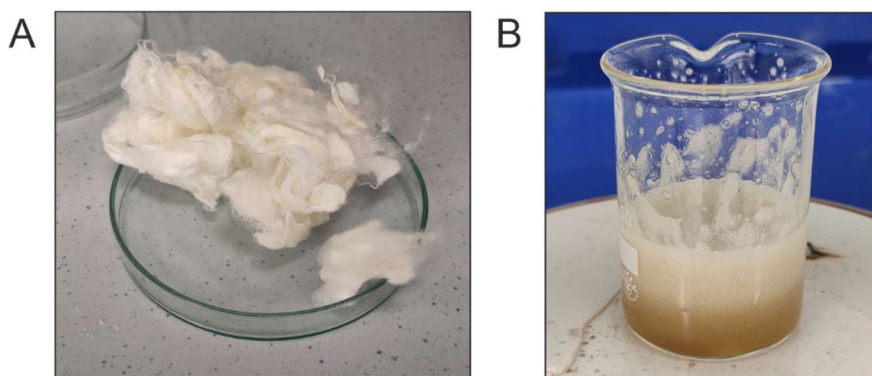


Figura 4.1.2: Protocol per l'obtenció de solució de fibroïna 2. (A) Massa de fibres de fibroïna. (B) Dissolució de la fibroïna en una solució de LiBr 9,3 M.

Per eliminar l'excés de sals i impureses de la solució de fibroïna, la solució de fibroïna es dialitzava (SnakeSkin dialysis tubing, 3,5MWCO, thermo Fisher Scientific, EUA) en aigua destil·lada durant tres dies, canviant l'aigua als intervals següents: 1, 3, 6 i 12 hores durant el primer dia i dues vegades al dia durant els dies següents (Figura 4.1.3A). Aquest procés assegurava l'eliminació efectiva de les sals i impureses. Després de la diàlisi, la solució de fibroïna es centrifugava a 8.000 rpm durant 15 minuts (Micro 220R, Hettich), repetint aquest procés dues vegades per eliminar qualsevol residu insoluble restant. El sobrenedant es recollia (Figura 4.1.3B) i s'emmagatzemava a 4°C. La concentració de fibroïna en la solució es determinava assecant un volum conegut de la solució durant tota la nit i pesant el sòlid residual. La concentració final de la solució de fibroïna s'ajustava al 6% p/v diluint amb aigua destil·lada. La solució resultant era estable durant un mes, moment en el que començaven a aparèixer precipitats resultat de la gelificació de la SF.

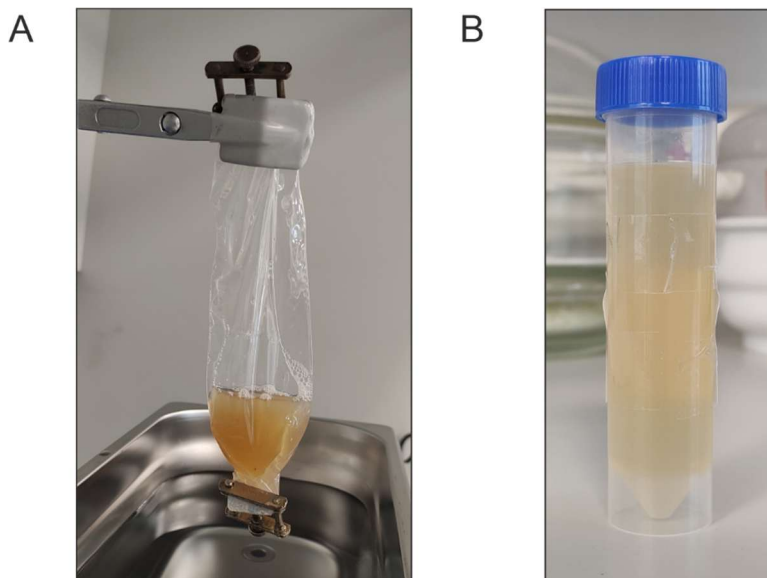


Figura 4.1.3: Protocol per l'obtenció de solució de fibroïna 3. (A) Solució de fibroïna prèvia a la diàlisi. (B) Solució de fibroïna final després de la diàlisi.

4.2. Fabricació dels transductors electroquímics

En aquest apartat es detallarà la fabricació, funcionalització i caracterització dels ISFETs de pH i dels xips amperomètrics.

4.2.1. ISFETs de pH

L'arquitectura dels ISFETs emprats en aquesta tesi consisteix en dues regions de silici dopades amb fòsfor, el drenador (Dren.) i la font (Font), definides sobre un substrat de silici tipus p, que fa de canal (Figura 4.2.1). Aquest canal està separat de la part superior per una capa dielèctrica (Si_3N_4), que actua com regió sensible al pH.

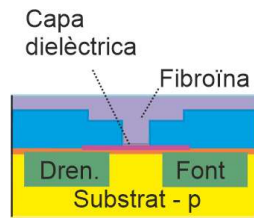


Figura 4.2.1: Arquitectura dels ISFETs funcionalitzats amb fibroïna.

Els ISFETs es van fabricar mitjançant tecnologia NMOS de porta de Si_3N_4 [207], [208] a través del procés detallat a la Figura 4.2.2. Com a substrat, s'utilitza una obla de silici de tipus p, dopada amb una concentració de bor d'aproximadament $1,5 \cdot 10^{16}$ àtoms per centímetre cúbic (Figura 4.2.2, a). En la primera etapa, es forma una capa d'òxid tèrmic amb un gruix de 8000 Å, coneguda com a òxid de camp (b). Aquesta capa actua com a barrera aïllant (dielèctric) en les etapes posteriors.

Sobre l'òxid es realitza la primera fotolitografia, utilitzant la màscara corresponent al nivell de difusió, amb l'objectiu de definir les regions corresponents a la font i el drenador. El procés fotolitogràfic inclou; i) el dipòsit d'una resina fotosensible, en aquest cas la fotoresina negativa SU-8 (Microchem & Gersteltec), ii) la seva exposició a irradiació UV a través de la màscara que indueix la seva polimerització en les regions exposades a la llum, i iii) el procés de revelat amb un solvent, en aquest cas, acetat de metil èter de propilenglicol (Dev-600, Microchem) per eliminar la resina no polimeritzada. Un cop definides les regions corresponents a la font i el drenador, l'òxid d'aquestes zones s'elimina mitjançant gravat químic humit amb solucions tamponades d' $\text{HF}:\text{NH}_4\text{F}$ (1:6) (c). Un cop eliminat l'òxid, es procedeix a la implantació iònica de fòsfor en les àrees de silici exposades (d).

El procés continua amb una segona fotolitografia, utilitzant la màscara de nivell d'òxid, que defineix les regions de porta i contactes. De la

mateixa manera que en el cas anterior, el procés implica la definició de la zona mitjançant fotolitografia i el posterior gravat humit per eliminar l'òxid de camp de les zones exposades (e). A continuació, es creix una capa d'òxid de porta de 780 Å mitjançant oxidació tèrmica (f). Immediatament després, es diposita una capa de nitrur de silici de 1000 Å mitjançant deposició química de vapor a baixa pressió (LPCVD) (g). Una tercera fotolitografia, amb la màscara de nivell de nitrur, defineix la membrana de nitrur que cobrirà la porta de l'ISFET. La capa de nitrur es grava selectivament mitjançant gravat sec per plasma (RIE, *Reactive Ion Etching*) per obtenir l'estructura desitjada (h).

La quarta fotolitografia, coneguda com a nivell de contacte, defineix les zones on es formaran els contactes elèctrics. Aquestes zones es graven a través de la fina capa d'òxid (i) per preparar-les per a la deposició dels contactes metàl·lics.

Per establir les connexions elèctriques, es diposita una capa d'alumini d'1 µm de gruix sobre tota la superfície per polvorització catòdica (*Sputtering*) (j). En la següent fotolitografia de nivell metàl·lic, es defineixen les interconnexions d'alumini mitjançant gravat humit amb una solució H₃PO₄ (80%), HNO₃ (5%), CH₃COOH (5%) i H₂O (10%), definint les zones de connexió desitjades (k).

Finalment, es diposita una capa de passivació mitjançant deposició química de vapor assistida per plasma (PECVD) per protegir el dispositiu de factors ambientals i danys físics. Aquesta capa està formada per 3000 Å d'òxid i 4000 Å de nitrur de silici (l). Durant l'última etapa de fotolitografia, la capa de passivació es retira selectivament en determinades zones mitjançant RIE i gravat humit, garantint l'accés als contactes d'alumini subjacents i a la porta de l'ISFET, tot preservant la protecció de la resta del xip.

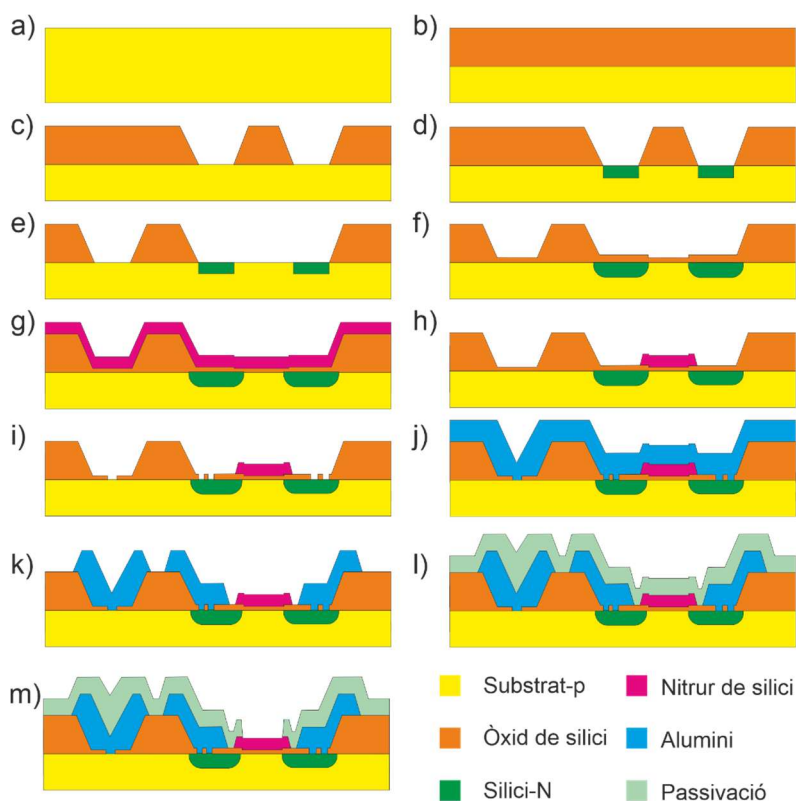


Figura 4.2.2: Esquema del procés de fabricació d'un ISFET: a) silici tipus p; b) creixement d'òxid de camp; c) gravat d'òxid de camp (àrea de difusió); d) implantació d'impureses de tipus n; e) gravat d'òxid de camp (àrea de la porta); f) creixement de l'òxid de la porta; g) deposició de nitrur de silici; h) gravat de nitrur de silici (dielèctric de la porta); i) gravat del òxid per definir contactes; j) deposició d'alumini; k) gravat d'alumini (connexions); l) deposició de la capa de passivació; m) gravat de la passivació (finestra de la porta i zones de contacte).

Un cop fabricades, els ISFETs s'individualitzen, obtenint-se xips de 3×3 mm (Figura 4.2.3A). Els dispositius es van fixar i cablejar als contactes d'una plaqueta de circuit imprès (PCB) mitjançant filaments d'or (Figura 4.2.3B). Els ISFETs es van encapsular amb un polímer fotocurable (Miramer PE210, MIWON) mitjançant un pas de fotolitografia amb SU-

8, deixant una finestra d'1 mm de diàmetre sobre la zona de la porta (àrea de la porta = $600 \times 100 \mu\text{m}$) [209].

Els ISFETs fabricats es testeaven elèctricament, descartant aquells que presentaven corrents de fuga superiors a 10 nA o una resposta anòmla a pH 7 ($>+1300 \text{ mV}$ o $<-1300 \text{ mV}$).

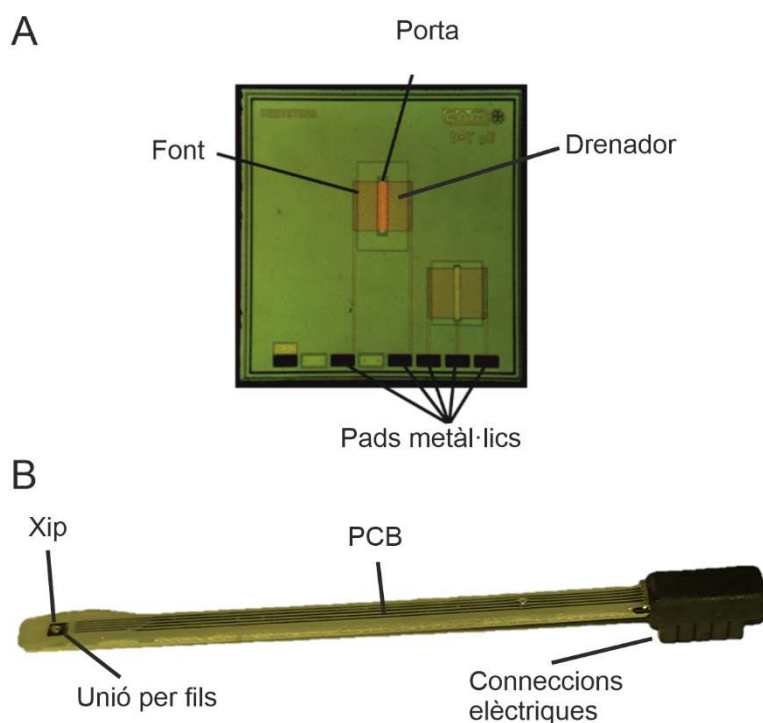


Figura 4.2.3: Sensor ISFET. (A) Xip ISFET de nitrur. (B) Encapsulació en el PCB.

Per a la funcionalització dels ISFETs, es dipositaven 2 μl d'una solució de fibroïna al 6% a la finestra situada sobre la porta de l'ISFET i es cristal·litzava. El procés de cristal·lització emprat consistia en dues etapes: una primera d'assecat a temperatura ambient durant 18–24 h i

una segona en la qual es realitzava un recuit a -900 mbar en un dessecador (Fisher Scientific) en atmosfera d'aigua.

4.2.1.1. Integració dels ISFETs en una cambra microfluídica

Per tal de realitzar la caracterització, validació i mesures en flux dels ISFETs, aquests es van integrar en cambres microfluídiques específicament dissenyades amb aquest objectiu. Aquestes cambres es dissenyaven mitjançant CorelDraw 2020 en una estructura multicapa (Figura 4.2.4).

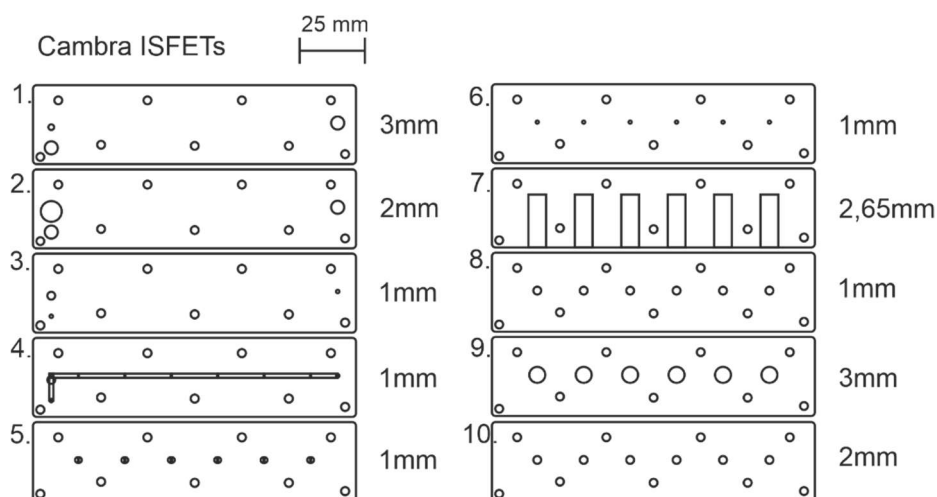


Figura 4.2.4: Disseny de la cambra d'ISFETs.

La cambra es va construir mitjançant un mètode d'assemblatge capa a capa, utilitzant polimetilmetacrilat (PMMA) com a material base (Goodfellow, UK). Les capes de PMMA es van tallar amb un làser de CO₂ (Epilog FusionEdge, Espanya) i es van unir mitjançant un protocol d'unió assistit per dissolvent. Aquest procés consisteix en aplicar unes gotes d'àcid acrílic, aplicant una pressió de 5 a 50 mbar (segons el gruix

de les capes) en una premsa hidràulica (P.O. Weber) i mantenint una temperatura constant de 80°C. Per evitar fuites de líquid, també s'han fabricat juntes de polidimetilsiloxà (PDMS), també tallats amb ablació làser de CO₂. El PDMS es va formar mitjançant l'addició d'elastòmer de silicona SYLGARD 184 i el seu agent de curat en proporcions 10:1. La mescla era remenada i posada al buit (-900 mbar) per eliminar les bombolles. A continuació, s'hi afegia la mescla en un motlle i es deixava 40 minuts a 80°C.

La cambra per a mesurar amb ISFETs va ser dissenyada per permetre la detecció electroquímica simultània de 6 ISFETs i un elèctrode de referència. Aquesta cambra constava de deu capes diferents, cadascuna complint una funció específica (Figura 4.2.5). Les capes 1 a 3 contenen les connexions fluídiques, així com una junta circular de PDMS per evitar fuites al voltant de la cavitat de l'elèctrode de referència. La capa 4 allotjava el canal fluídic responsable del transport de líquids, mentre que les capes 5 i 6 contenien obertures per garantir l'alineació i la connexió adequada entre els canals fluídics i els ISFET. La capa 6, fabricada amb PDMS, servia com a capa de segellat addicional per millorar la prevenció de fuites. La capa 7 incorporava cavitats dissenyades específicament per acomodar els ISFETs, assegurant un posicionament estable del sensor. Finalment, les capes 8, 9 i 10 contenien forats de pas per a la col·locació de cargols, que permetien el muntatge de tota l'estructura. Aquests forats es trobaven en totes les capes comentades anteriorment ja que s'utilitzaven per l'ensamblatge final del dispositiu.

Cambra per ISFETs

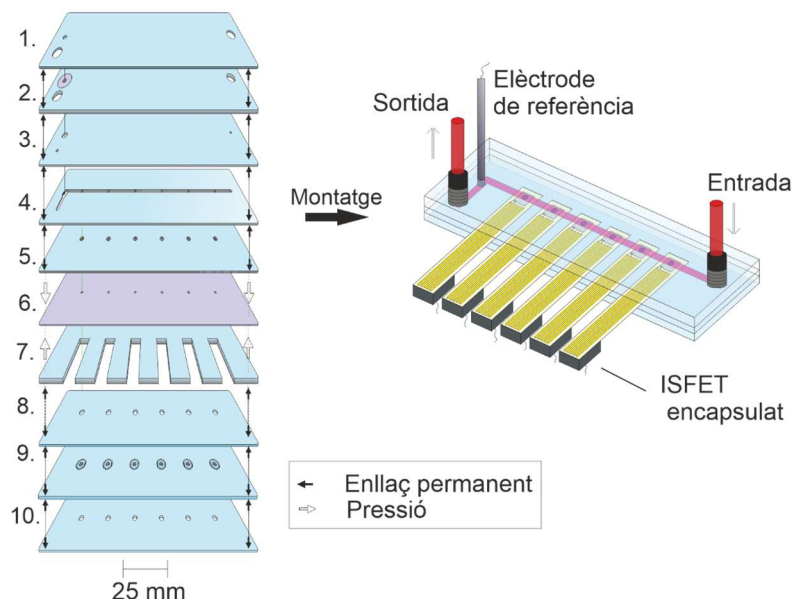


Figura 4.2.5: Il·lustració capa per capa de la fabricació de la cambra d'ISFETs i el seu muntatge.

4.2.1.2. Caracterització els ISFETs de pH

En primer lloc es va caracteritzar la membrana de SF dipositada en la porta de l'ISFET mitjançant microscòpia òptica, microscòpia electrònica d'escombratge (SEM), perfilometria òptica i espectroscòpia infraroja amb transformada de Fourier amb reflexió total atenuada (ATR-FTIR). La presència i estat de cristal·lització de la membrana de SF dipositada en la porta de l'ISFET es va determinar mitjançant ATR-FTIR mitjançant un espectròmetre (Tensor 27 IR, Bruker) amb accés ATR Specac Golden Gate. Per identificar la presència i estat de cristal·lització de les membranes es van comparar els espectres de membranes de seda amorfa i cristal·lina produïdes en plaques de Petri amb aquelles dipositades en la porta dels ISFETs. La microscòpia òptica es va emprar per analitzar com la presència de la membrana modificava la morfologia

de la porta de l'ISFET. Es van obtenir imatges de la porta d'ISFETs funcionalitzats i no funcionalitzats amb un microscopi òptic (Nikon Eclipse ME600) amb càmera MOTICAM 10+ (Motic).

El gruix de les pel·lícules de seda es va mesurar mitjançant perfilometria òptica confocal mitjançant PLμ NEOX (Sensofar) amb el software SensoScan Neox amb una resolució de l'ordre de nanòmetres amb la tècnica de topografia extesa. L'objectiu utilitzat va ser el 10X-N i es va utilitzar un escaneig simètric variable entre 50 i 250 nm.

La SEM es va utilitzar per analitzar la morfologia superficial i l'estructura transversal de les membranes de seda i el biofouling generat per mesures en solucions de *E. coli* i Albúmina. Els estudis de morfologia es van realitzar amb ISFETs no adherits a la PCB per simplificar les mesures i en el cas del biofouling, el PCB es va tallar. L'estudi de l'estructura transversal requeria de la realització d'un tall transversal a la porta de l'ISFET previ a l'obtenció de les imatges. Les seccions transversals es van realitzar mitjançant un feix d'ions focalitzat (FIB; Zeiss Crossbeam 550L) acoblat a un SEM (Zeiss AURIGA 400). Concretament, es va realitzar un tall de més de 50 μm irradiant 2 hores amb un feix d'ions de gal·li de 30 kV. Degut a la poca conductivitat de les mostres, en alguns casos va ser necessari dipositar una capa de carboni de 10 nm per *sputtering* (Leica AC600) sobre la porta dels ISFETs abans d'adquirir les imatges.

Es van realitzar tests electroquímics per valorar com la membrana de SF modificava els paràmetres característics dels ISFETs. Abans dels tests, els ISFETs no modificats amb membranes de seda s'acondicionaven en una solució tampó de pH 7 durant 60 minuts per tal d'estabilitzar la seva senyal i minimitzar l'efecte del drift. Aquest

procés no es realitzava amb els ISFETs modificats en seda que es mesuraven de forma directa. En alguns casos, els ISFETs sense membrana no es van acondicionar prèviament per comparar-los amb els ISFETs modificats. En aquests experiments el no acondicionament dels ISFETs s'indica explícitament.

Un cop acondicionats, es va obtenir la corba que relaciona el corrent del drenador i la diferència de potencial registrat entre la porta i la font (corba I_D - V_{GS}) a diferents pHs, el que permetia determinar paràmetres característics de l'ISFET com el voltatge llindar (V_{th}) i la transconductància màxima (G_{Mmax}) (Figura 4.2.6A). La G_{Mmax} correspon al valor màxim de la derivada I_D - V_{GS} , és a dir, al pendent de la tangent a la corba. Aquest paràmetre indica la sensibilitat màxima del dispositiu al potencial de porta, i per tant, la seva resposta a petits canvis en la concentració de protons a la interfície dielèctric-solució. Els panells B i C mostren la resposta d'un ISFET model als canvis de pH i la seva relació amb els paràmetres anteriors.

Es pot observar com, tal i com ha estat prèviament reportat [210], [211], en variar el pH la corba I_D - V_{GS} es desplaça al llarg de l'eix V_{GS} (Figura 4.2.6B), el que indica una variació en el valor del voltatge llindar de l'ISFET. En representar aquesta variació del V_{GS} respecte el pH (Figura 4.2.6C), s'obté una recta del calibratge per a un determinat corrent de drenador (I_D) que ens permet proporcionar valors de pH a partir de valors de potencial per interpolació.

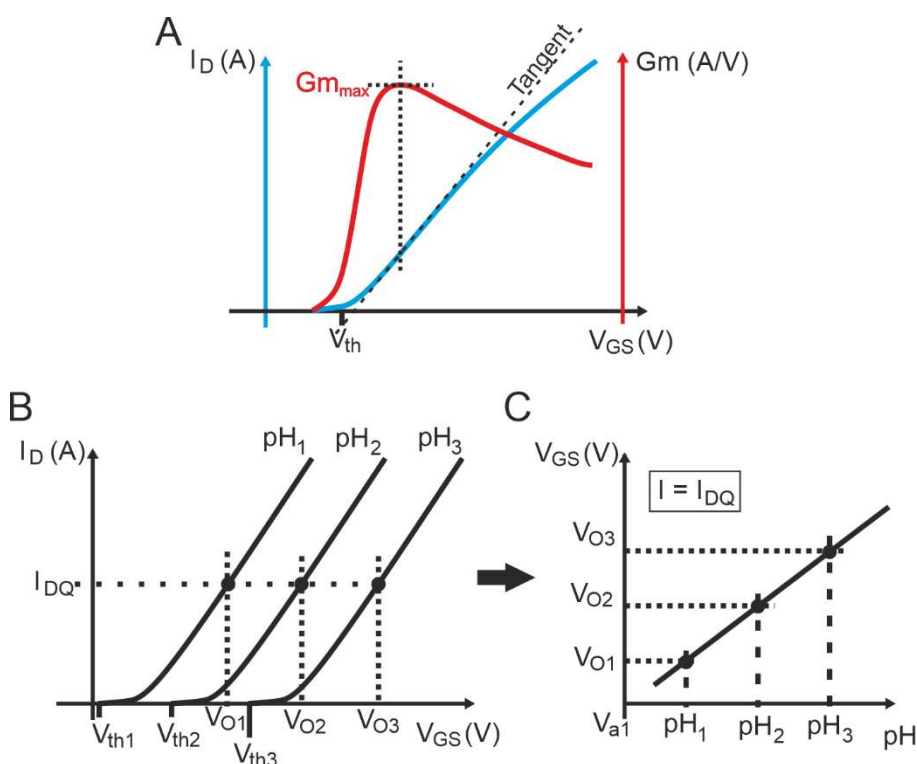


Figura 4.2.6: Determinació dels paràmetres electroquímics dels ISFETs.

(A) corba I_D - V_{GS} (vermell) i corba G_m - V_{GS} (blau). (B) Corba I_D - V_{GS} d'un ISFET respecte diferents pHs. (C) Calibratge a I_D constant.

Un cop realitzats els tests elèctrics es va procedir a la seva caracterització electroquímica com a sensor de pH.

En les mesures amb els ISFETs es va utilitzar un ISFET-metre dissenyat i fabricat a l'IMB-CNM, basat en un esquema de "*source and drain follower*" (Figura 4.2.7). Aquest sistema manté un potencial constant ($V_{DS} = 0,5 \text{ V}$) i un corrent de drenatge constant ($I_D = 0,1 \text{ mA}$) mitjançant l'ajust del potencial de porta (V_{GS}), que es realitza per comparació amb un elèctrode de referència Ag/AgCl miniaturitzat (Dri-ref, World Precision Instruments), caracteritzat per la seva alta estabilitat (deriva de $0,37 \text{ mV/h}$) i compatibilitat amb sistemes fluidics. El senyal resultant, proporcional al logaritme de l'activitat del ió segons

la llei de Nernst, es va adquirir mitjançant un sistema basat en una targeta d'adquisició de dades (National Instruments) fent servir el programari LabVIEW. L'instrument tenia una resolució de 0,1 mV per pas [29]. Aquestes mesures es va dur a terme utilitzant solucions estàndard de pH conegut entre pH 5 a 10 per tal de fer el calibratge.

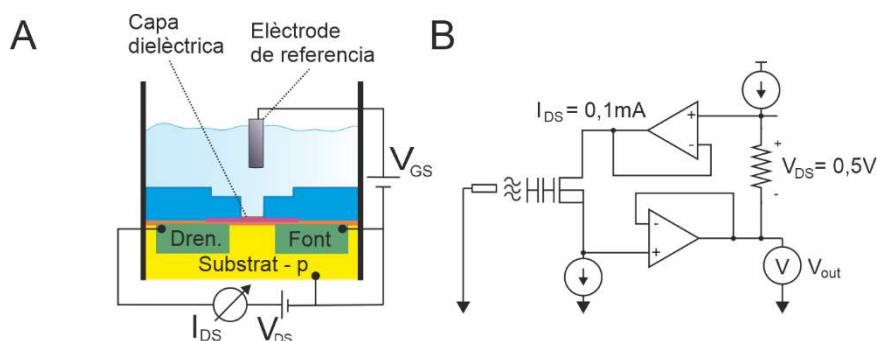


Figura 4.2.7: Esquema d'un ISFET i sistema de mesura. (A) Esquema general d'un ISFET NMOS. (B) Diagrama d'un circuit elèctric d'un ISFETòmetre.

4.2.1.3. Validació dels ISFETs en la monitorització de cultius cel·lulars

Els experiments amb cultius cel·lulars es van dur a terme en instal·lacions especialitzades de la Universitat de Sevilla (US) i de la Universitat Internacional de Catalunya (UIC).

La validació dels ISFETs es van realitzar en dues modalitats experimentals: (i) monitorització discreta, en la qual es realitzaven mesures puntuals d'aliquotes extretes del cultiu, i (ii) monitorització contínua, en la qual la cambra de mesura amb els sensors s'incorporava en un circuit fluídic tancat amb una bomba que recirculava el medi de cultiu de forma contínua pels ISFETs. Per tant, la diferència principal de les dues modalitats de mesura residia en temps de contacte entre el medi de cultiu i els ISFETs. En les mesures discretes, el temps de

contacte coincidia amb el temps necessari per realitzar la mesura. Per altra banda, el temps de contacte amb la monitorització contínua era molt més llarg i coincidia amb el temps de l'experiment, ja que el sensor s'insertava dins el sistema fluídic i no s'extreia fins que l'experiment s'havia acabat. Les condicions experimentals en cada cas es detallen a continuació.

Monitorització discreta

En la monitorització discreta, es van realitzar validacions amb tres tipus cel·lulars diferents: cèl·lules de neuroblastoma SK-N-SH, cultius primaris de neurones hipocampals de ratolí i neurones immortalitzades GT1-7.

Les cèl·lules SK-N-SH es van cultivar en plaques de petri de 8 cm en DMEM tamponat amb bicarbonat sòdic, i suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví (FBS), 100 U/ml de penicil·lina, i 100 µg/ml d'estreptomicina a densitats de 25.000-100.000 cèl·lules/cm². El cultiu es va introduir en un incubador on es va mantenir proliferant en condicions òptimes de temperatura (37°C), oxigen (21%), CO₂ (5%) i humitat relativa (>90%) durant tota la nit per induir la seva adhesió. Posteriorment, es va canviar el medi de cultiu, eliminant les cèl·lules no adherides. Les cèl·lules s'introdueixen novament a l'incubador i es deixaven cultivant fins a assolir una confluència del 90% (90% de recobriment superficial). Un cop validada la viabilitat de les cèl·lules, aquestes es tripsinitzaven amb una solució de tripsina-EDTA (ThermoFisher Scientific, Espanya) que permetia desenganxar-les de la superfície del recipient, i es recultivaven en un nou recipient en les condicions experimentals que es volien avaluar. En aquesta cas, els estudis farmacològics consistien en la incubació durant 3 dies amb un inhibidor mitòtic que contenia 5-fluoro-2'-desoxiuridina 0,3 mM

(Merck, $\geq 99\%$) i uridina 0,8 mM (Merck, $\geq 99\%$). Després de la incubació, s'extreia una alíquota de 500 μ l del medi de cultiu que s'introdueix en un eppendorf de 2 ml on es realitzaven les mesures amb els ISFETs (funcionalitzats i no funcionalitzats).

En el cas de les neurones de l'hipocamp, es van aïllar les cèl·lules primàries de ratolins P0 C57BL/6, procés realitzat per Urbano J. a la US.

En l'experiment, els cultius es van tractar amb el mateix inhibidor mitòtic que en el cas anterior (concretament 5-fluoro-2'-desoxiuridina 0,3 mM i uridina 0,8 mM) per estudiar el seu impacte en el creixement cel·lular. Es van recollir alíquotes de 350 μ l de medi de cultiu després de 72 hores d'incubació que es van analitzar mitjançant ISFETs (seguint el procediment anterior).

Finalment, en el cas de les neurones GT1-7, les cèl·lules neuronals es van cultivar en plaques de petri de 3,5 cm amb 4 ml d'una solució DMEM amb una densitat de 150000 cèl·lules/ml. El medi de cultiu estava suplementat amb 10% FBS i 1% penicil·lina/streptomicina, seguint el protocol descrit a [212]. Després de 24 hores d'incubació, les cèl·lules es tractaven amb el fàrmac d'interès, en aquest cas l'agent proliferatiu haloperidol (10 μ M en DMEM) o l'agent anti-proliferatiu puromicina que inhibeix la síntesi de proteïnes (0,25 μ g/ml). Els resultats de pH van ser obtinguts a partir d'ISFET nus i funcionalitzats amb seda als dies 3 i 7, i es van comparar amb el pH mesurat espectrofotomètricament mitjançant el dispositiu explicat al següent capítol. Les mesures espectrofotomètriques treien partit de la presència de l'indicador de pH vermell de fenol en el medi de cultiu, de manera que els canvis de color de l'indicador es podien correlacionar

directament amb el pH del medi. Aquest mètode es va fer servir com a mètode de referència en aquestes mesures on el petit volum de la mostra no permetia realitzar la detecció de pH fent servir un elèctrode de membrana de vidre.

Monitorització contínua

Per a la monitorització contínua del pH, es va utilitzar un sistema de circuit tancat, aquest sistema de bucle tancat comptava amb tres cambres: una cambra de cultiu cel·lular, una cambra espectrofotomètrica per realitzar mesures de pH òptiques utilitzant vermell de fenol com a indicador i la cambra que conté els ISFETs.

El disseny de la cambra amb el cultiu emulava les plaques de Petri però amb entrades i sortides fluídiques que permetien integrar-la en un sistema de flux continu. La cambra constava de 3 capes (Figura 4.2.8): una capa superior (capa 1) que incloïa dues obertures que actuaven com entrades i sortides fluídiques, la capa 2 que contenia uns canals laterals que connectaven l'interior i l'exterior de la cambra i permetien l'intercanvi de gasos (oxigen i diòxid de carboni) i la capa 3 que actuava com a suport (base). Les 3 capes es van fabricar en PMMA de diferent gruix (Especificat en l'Annex A) que es va processar (tallar i/o gravat) utilitzant el làser de CO₂ comentat anteriorment. Un cop fabricades, les capes 2 i 3 es van unir permanentment mitjançant unió tèrmica assistida per solvent emprant àcid metacrílic i la premsa tèrmica. En la capa 1 es van incorporar dues puntes de xeringa de tefló de diàmetre de 1 mm (Teknokroma, Espanya) per facilitar l'entrada i sortida del líquid. Les puntes de xeringa es van unir a la tapa mitjançant adhesiu acrílic. La capa 1, que actuava com a tapa, es dipositava sobre el sistema però no

s'unia de forma permanent permetent l'obertura i tancament del sistema abans, després i durant l'experiment.

Abans de la sembra de les cèl·lules, la base de la cambra es va funcionalitzar amb 2 ml de poli-L-lisina (PM 30 000–70 000, 0,1 % w/v; Merck, Alemanya) i es va incubar a 37 ° C durant 1 hora. Després d'això, es va eliminar la solució de poli-L-lisina sobrant i es va esbandir la cambra tres vegades amb solució PBS per garantir una superfície adequada per a l'adhesió i el creixement cel·lular.

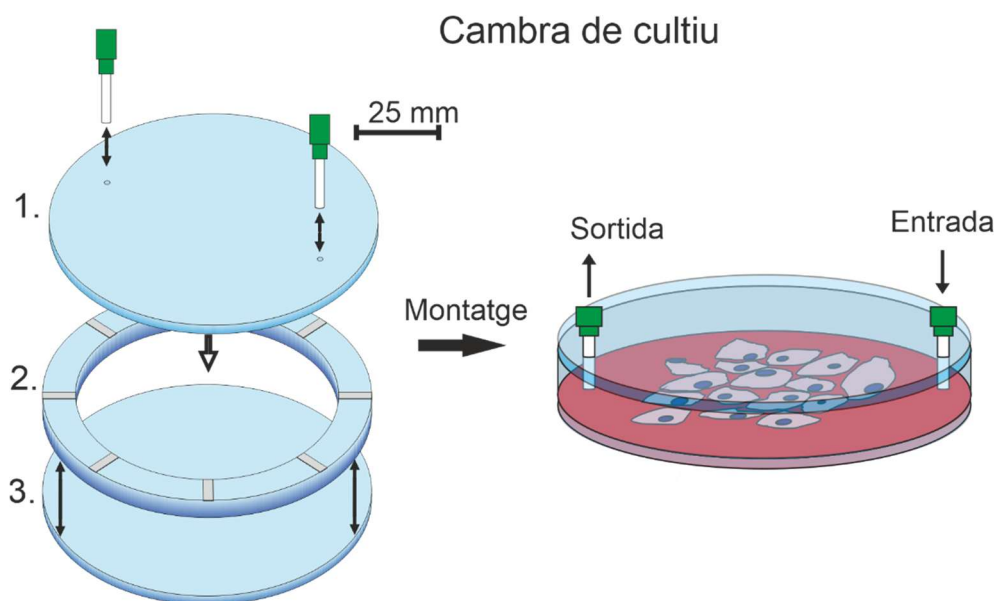


Figura 4.2.8: Il·lustració capa per capa de la fabricació de la cambra de cultiu i el seu muntatge.

La cambra per a la mesura colorimètrica del pH mitjançant vermell de fenol, constava de quatre capes de PMMA (Figura 4.2.9). Aquesta configuració forma una cubeta òptica per a mesures espectroscòpiques.

Les capes 1 i 3 conformaven les parets de la cubeta i cobrien la capa 2, que presentava obertures per connectar unes puntes de xeringa, que estaven segellades amb PDMS. La capa 4 envoltava les altres tres i contenia uns orificis i suports que permetien posicionar i alinear dues fibres òptiques. Totes 4 capes van ser químicament segellades amb àcid acrílic. Aquestes fibres es connectaven a un espectròmetre i a una font de llum que permetien realitzar mesures espectrofotomètriques. El disseny de la cambra amb els gruixos es pot trobar a l'Annex A.

Cambra per espectrometria

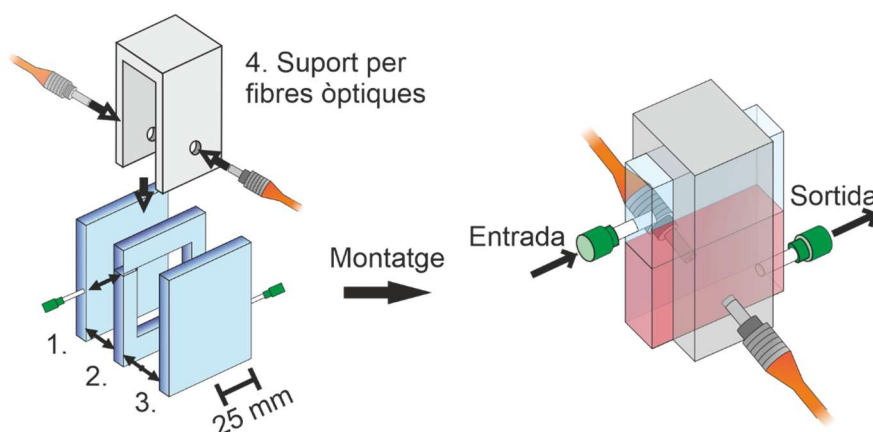


Figura 4.2.9: Il·lustració capa per capa de la fabricació de la cambra espectroscòpica i el seu muntatge.

Les tres cambres (cambra de cultiu, cambra espectroscòpica i cambra dels ISFETs) es van connectar fluidicament en un sistema de circuit tancat juntament amb una bomba peristàltica (Watson Marlow), que recirculava el medi de cultiu a través de les tres cambres a un flux constant de 10 µl/min que assegurava que les cèl·lules no patissin tensió de cisalla transversal que pogués afectar la seva proliferació (Figura 4.2.10).

La cambra de cultiu es posicionava dins de l'incubador per assegurar unes condicions òptimes de proliferació cel·lular, mentre que les dues cambres de mesura i la bomba peristàltica es situaven fora de l'incubador per evitar possibles contaminacions del cultiu. La cambra per a la mesura electroquímica amb ISFETs, contenia sis ISFETs preconditionats. La cambra espectroscòpica es va calibrar mitjançant la mesura dels espectres del fenol vermell en diferents pHs del medi.

Per garantir l'esterilitat del sistema, els tubs, les cambres i els ISFETs s'esterilitzaven per irradiació amb llum UV (Bio II Advance Plus) durant 15 minuts o per incubació amb una solució de lleixiu al 25% durant 10 minuts. Per no comprometre el creixent cel·lular, el sistema es netejava amb medi de cultiu durant 10 minuts per eliminar les restes de lleixiu.

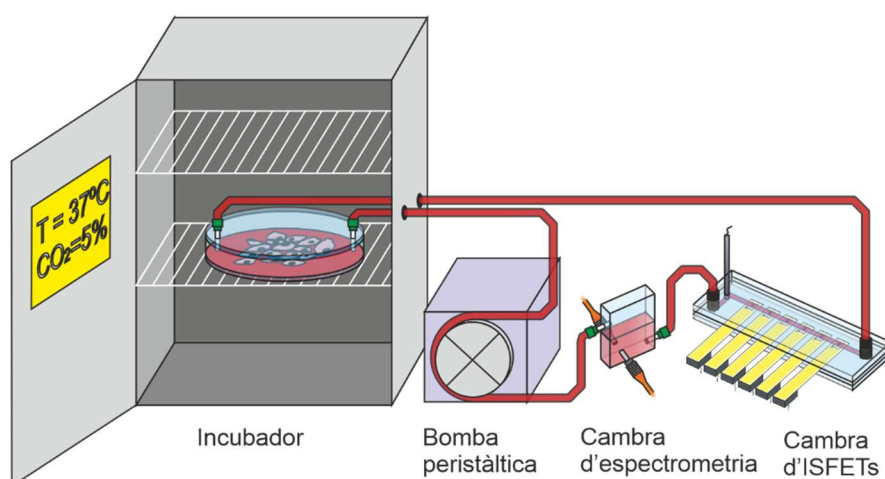


Figura 4.2.10: Esquema experimental del circuit circular format per la cambra de cultiu, la cambra d'espectrometria i la cambra dels ISFET.

Els experiments de monitorització contínua es van realitzar amb cèl·lules HEK293T. La sembra inicial es duia a terme en plaques de 35 mm de diàmetre on les cèl·lules es cultivaven en DMEM suplementat

amb 10% FBS, 1% Glutamax i 1% penicil·lina-estreptomicina a una densitat de 150.000 cèl·lules/ml en un volum total de 4 ml. Després de 24 hores, el medi de cultiu es substituïa DMEM dopat amb l'agent anti-proliferatiu puromicina a una concentració de 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml o 1,0 µg/ml segons l'experiment. Per tal d'avaluar l'estat de les cèl·lules, s'adquirien imatges de les mateixes amb un microscopi Olympus CKX41 equipat amb una càmera Nikon DS-Fi1. Les imatges es van adquirir amb un objectiu de 10× (10×/0,25 PhP).

4.2.2. Biosensors amperomètrics

El disseny del transductor amperomètric consistia en un elèctrode de treball i un contraelèctrode de platí dins d'un xip. S'han fet servir tres dissenys, incorporant 1, 2 o 3 elèctrodes de treball, i un contraelèctrode (Figura 4.2.11). En tot cas, només s'ha fet servir un dels elèctrodes de treball per cada xip. Els elèctrodes de treball mesuren 2,5 mm × 1 mm i els elèctrodes auxiliars mesuren 9 mm × 11 mm.

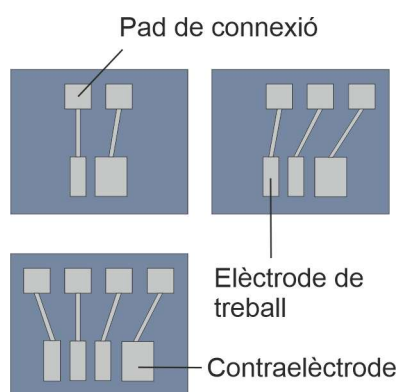


Figura 4.2.11: Disseny del xip amperomètric.

Aquests sensors amperomètrics han sigut fabricats a la sala blanca de l'IMB-CNM utilitzant un procés "*lift-off*" [213].

En primer lloc, es creixia una capa d'òxid tèrmic (dielèctric) de 1,5 μm sobre l'òxia de silici (b). Aquesta capa actua com una barrera aïllant fonamental per als processos posteriors (Figura 4.2.12a).

A continuació, es realitza una fotolitografia anomenada "*lift-off*" amb la primera màscara per delimitar les regions de les línies de contactes i els elèctrodes. Per fer-ho, es disposa una capa de fotoresina sobre l'òxia de silici (c) i es defineixen les zones de metal·lització.

Posteriorment es dipositaven els metalls: una capa de 25 nm de titani que es feia servir per millorar l'adhesió del platí, que es dipositava posteriorment en una capa de 150 nm, i que era el material escollit com a transductor per la seva elevada conductivitat elèctrica i estabilitat química. Ambdues capes es dipositen mitjançant deposició física amb la tècnica de canó d'electrons en fase vapor (PVD) (d, e). Finalment, s'eliminava la resina mitjançant un procés de revelat amb acetona que també eliminava el metall de les regions no desitjades (f).

Després del *lift-off*, es dipositava una capa de passivació de fotopolímer SU-8 de 100 μm de gruix (g). Aquesta passivació protegeix el dispositiu però permet accedir a les regions de l'elèctrode i als contactes elèctrics. Les obertures corresponents es van realitzar mitjançant un procés de gravat químic humit, que eliminava selectivament el material de passivació en les zones específiques irradiades (h).

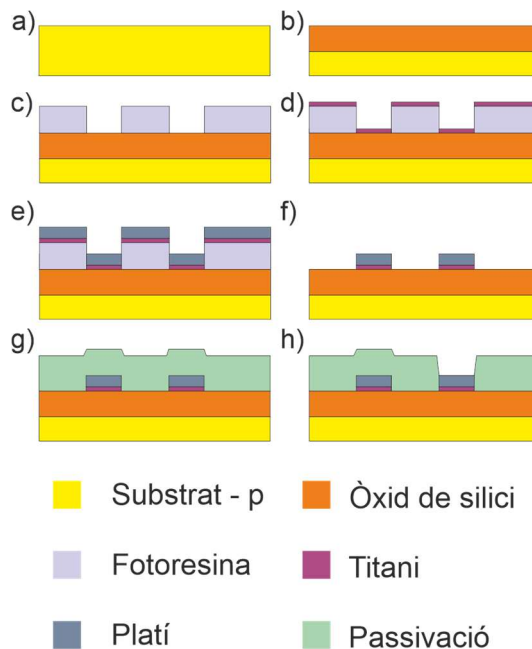


Figura 4.2.12: Representació esquemàtica del procés de fabricació: a) oblia de silici; b) creixement d'òxid de camp; c) deposició i gravat de fotoresina; d) dipòsit de titani; e) dipòsit de platí; f) eliminació de metalls no desitjats mitjançant *lift-off*; g) deposició de capa de passivació; h) gravat de passivació per obrir elèctrodes i contactes.

Un cop fabricats a nivell d'oblia, els dispositius s'individualitzaven com en el cas anterior però en xips de 9 mm x 11 mm . En aquest cas no feia falta realitzar processos de cablejat ni encapsulació ja que els contactes es realitzaven mitjançant un connector extern comercial accionat amb molla incorporat a la cambra de mesura.

Funcionalització de l'elèctrode de treball

Un cop fabricat el xip, l'elèctrode de treball era funcionalitzat mitjançant la deposició d'una membrana enzimàtica. Abans de la deposició, es realitzava un procediment de neteja i activació.

Prèviament a la seva funcionalització, es realitzava un procés de neteja i activació del sensor per assegurar la seva funcionalitat. En primer lloc, els elèctrodes es netejaven amb aigua desionitzada, s'assecaven amb aire comprimit i es sotmetien a quatre cicles addicionals d'immersió alterna entre etanol i aigua desionitzada durant 10 minuts cadascun per eliminar partícules dèbilment adherides a la superfície del sensor. Per eliminar restes orgàniques més fortament adherides a la superfície de l'elèctrode es duia a terme un procés manual de raspat seqüencial amb etanol al 96% i àcid sulfúric 6 M fent servir un pinzell. Després de cada aplicació, els elèctrodes es rentaven amb aigua desionitzada i s'eixugaven amb aire comprimit per evitar una exposició prolongada als reactius químics.

Finalment, l'activació electroquímica permetia eliminar qualsevol resta adherida a la superfície de l'elèctrode, tant restes de resina com òxids metàl·lics produïts durant la fabricació dels dispositius i que comprometien l'activitat electroquímica del transductor. En l'activació electroquímica del transductor, es van realitzar 18 cicles de voltametria cíclica (CV) en PBS entre -1 i $0,6$ V a una velocitat d'escaneig de $0,1$ V/s (Figura 4.2.13).

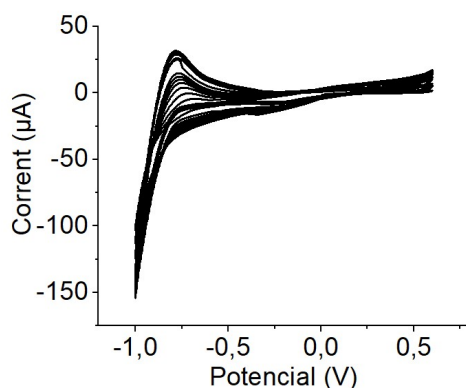


Figura 4.2.13: Registre de l'activació electroquímica dels elèctrodes de Pt.

Per avaluar l'àrea superficial activa de l'elèctrode després del procés de neteja i activació, voltametries cícliques (Figura 32A) es van dur a terme en una solució de ferricianur de potassi 5 mM a diverses velocitats d'escaneig (0,139, 0,1, 0,075, 0,05 i 0,02 V/s). Utilitzant l'equació de Randles-Sevcik, es va determinar l'àrea activa de l'elèctrode a partir de la pendent de la gràfica del corrent de pic (I_p) en funció de l'arrel quadrada de la velocitat d'escaneig ($\sqrt{v}$). En l'exemple mostrat (Figura 32B), el coeficient de correlació (R) obtingut va ser de 0,9992, la qual cosa indica que el ferricianur es difonia lliurement cap a la superfície de l'elèctrode sense efectes significatius d'adsorció. L'àrea activa calculada per als elèctrodes nous va ser de $380 \pm 90 \text{ A/(V/s)}^{1/2}$

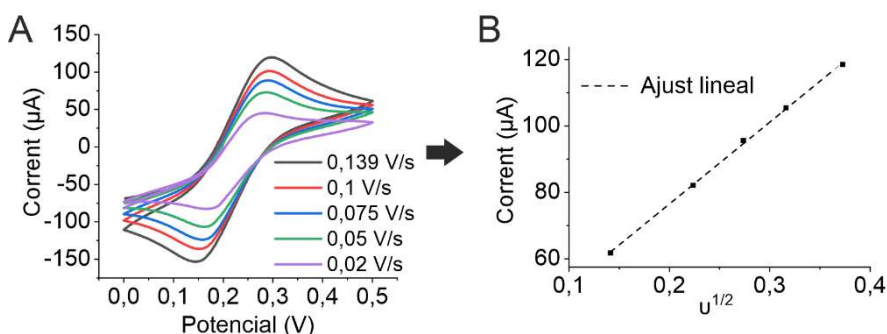


Figura 4.2.14: Validació i mesura de l'àrea activa de l'elèctrode. (A) Voltametria cíclica de ferricianur. (B) Ajust lineal del corrent amb l'arrel quadrada de la velocitat d'escaneig.

Un cop activat, l'elèctrode de treball es funcionalitzava amb una membrana de seda que contenia els enzims i mediadors necessaris per la reacció enzimàtica, en aquest cas GOx i el mediador redox. La membrana enzimàtica per a la mesura de glucosa es formava

combinant fibroïna, glucosa oxidasa (GOx) i un mediador, tetrametilbenzidina (TMB). Per a la preparació de la membrana, s'ha preparat una solució de fibroïna al 4% (p/v), que es barreja amb Gox i TMB per obtenir una solució homogènia. La concentració final de la membrana resultant és del 6% (p/p) GOx/Fibroïna i 10% (p/p) TMB/Fibroïna. Un cop preparada la solució, es dipositen 2 µl d'aquesta barreja sobre l'elèctrode de treball mitjançant una micropipeta (Eppendorf), assegurant una cobertura uniforme de la superfície de l'elèctrode. Després de la deposició, els elèctrodes es deixen assecar en un ambient fosc a temperatura ambient durant un dia, permetent l'evaporació de l'aigua. Posteriorment, es transfereixen al dessecador de buit a -900 mbar (Fisher Scientific) amb una atmosfera humida, on es mantenen durant 24 h per completar el procés de cristallització.

Per tal de poder reutilitzar els transductors amperomètrics, es va desenvolupar un procés de neteja que permetia eliminar selectivament la membrana de SF i recuperar el transductor sense modificar la seva capacitat sensora. En aquest cas, el procés de neteja s'iniciava amb un raspat amb pinzell fent servir una solució de LiBr 4 M per tal de solubilitzar i desadherir la membrana de seda. Posteriorment, els elèctrodes es submergien en una solució de LiBr 4 M i es sotmetien a vibracions ultrasòniques a 37 kHz durant 10 minuts en un bany d'ultrasons (Elmasonic A, ELMA) per eliminar les restes de membrana encara presents en la superfície sensora. A continuació, es realitzava el procés de neteja convencional amb aigua, etanol i una activació mitjançant CV en PBS, i s'avaluava la resposta del transductor amb solució tamponada de ferricianur abans de la seva refuncionalització.

4.2.2.1. Caracterització del biosensor enzimàtic

El biosensor enzimàtic es va caracteritzar composicional i morfològicament. Com en el cas de l'ISFET de seda, es va fer servir ATR-FTIR per confirmar la presència de la membrana de seda i el seu estat de cristallització, microscòpia òptica per caracteritzar morfològicament les membranes i perfilometria òptica confocal per determinar el gruix de les membranes.

Per a poder caracteritzar la resposta electroquímica dels biosensors enzimàtics es va dissenyar una cambra de mesura que emulava l'arquitectura d'una cel·la electroquímica (Figura 4.2.15) anomenada cambra estàtica. La fabricació de la cambra es va realitzar mitjançant un mètode d'assemblatge capa per capa, seguint un procediment similar al descrit per als dispositius fluídics dels ISFETs. Els dissenys de les cambres es troben detallats a l'Annex A.

La cambra estàtica integrava un xip d'elèctrodes i un port per a l'elèctrode de referència. Les capes 1 i 2 definien la zona de mesura on s'incorporava un *spring loader* per a la connexió dels pads elèctrics del xip amb el potenciostat, i, a més, s'incorporava la mostra. Aquestes capes estan unides de manera permanent amb àcid acrílic. La capa 3, fabricada en PDMS, actuava com una junta per evitar fuites de fluid entre el xip i la capa 2. Les capes 4 i 5, unides de manera permanent, allotgen el xip amb els elèctrodes; la capa 4 contenia una obertura que replicava la mida del xip i permetia el seu posicionament en l'estructura, mentre que la capa 5 feia de suport o base. Aquestes quatre capes es van fabricar en PMMA mitjançant ablació làser. Totes les capes contenien uns orificis en els extrems per a la introducció dels cargols que permetien unir les tres parts del sistema (la part 1-2, la capa 3 i la part 4-5).

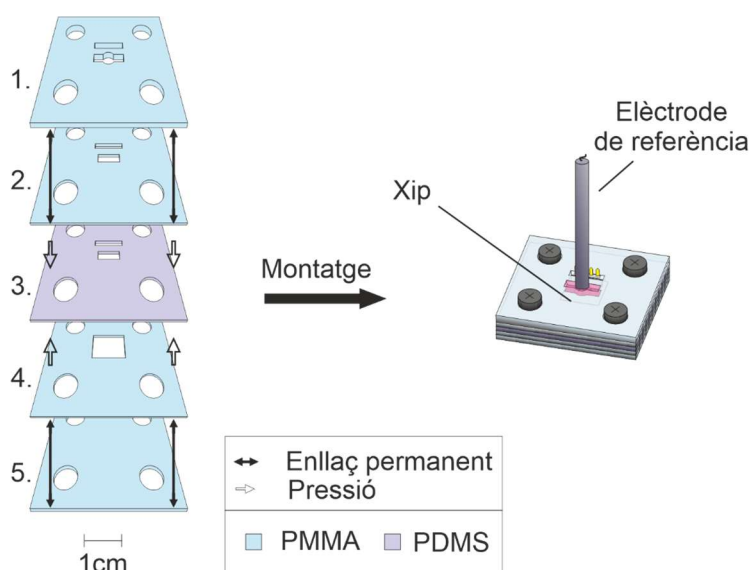


Figura 4.2.15: Il·lustració capa per capa de la fabricació de la cambra estàtica per xips amperomètrics i el seu muntatge.

Pels experiments que requerien un monitoratge continu de la mostra, una nova cambra electroquímica, anomenada cambra de flux, es va fabricar per permetre que el líquid fluís contínuament a través del transductor. La cambra de flux (Figura 4.2.16) presenta un disseny similar a la cambra estàtica, però incorpora característiques que permeten el flux de líquid a través del transductor. Les capes 1 i 2, unides de manera permanent, inclouen obertures per a connectors fluídics. Les obertures es van roscar amb un set de mascles de la marca obramat (Espanya). Les obertures actuaven com ports roscats, on s'introduïen connectors fluídics externs de rosca (Teknokroma) que feien d'entrada i sortida fluídica. Les capes 3 i 4, fabricades en PDMS, definien el canal de flux i asseguraven el segellat sota pressió. La capa 3 també conté una obertura dissenyada per allotjar una junta (*O-ring*), pel RE i evitant fuites fluídiques en aquest punt. Les capes 6 i 7 es fixen permanentment per subjectar el xip d'elèctrodes. Igual que en la cambra

estàtica, totes les capes inclouen forats a les cantonades per cargols, assegurant un assemblatge robust i una pressió de segellat constant.

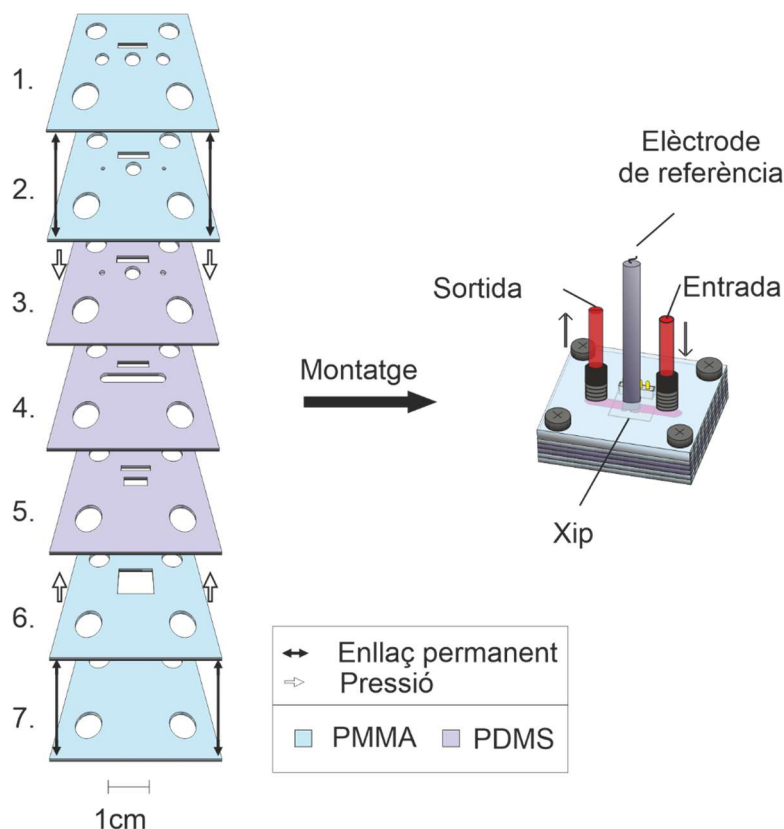


Figura 4.2.16: Il·lustració capa per capa de la fabricació de la cambra de flux per xips amperomètrics i el seu muntatge.

Des d'un punt de vista electroquímic, la cambra era una cel·la electroquímica de tres elèctrodes on el WE i el CE estaven integrats en el xip electroquímic, mentre que el RE (dri-ref-2SD; World Precision) s'incorporava en un port específic destinat a permetre el seu contacte amb la solució de mesura i subjectar-lo de forma estable durant els experiments. Els contactes entre els elèctrodes integrats al xip i els equips de mesura es realitzaven a través de connexions amb molla (*spring loader*), integrades en la arquitectura de la cambra.

La caracterització de la resposta electroquímica dels biosensors enzimàtics es va realitzar mitjançant CV i cronoamperometria en les condicions especificades en cadascun dels experiments. Es van fer servir dos potenciostats segons l'experiment, l'AUTOLAB PGSTAT 12/13 o l'AUTOLAB ECO μ AUT70532 (AUTOLAB, Espanya) que presentaven prestacions similars. Les mesures es van realitzar dins d'una gàbia de Faraday per eliminar interferències elèctriques externes. Abans del procés de caracterització, cada sensor es va sotmetre a un procés d'oxidació a 0,5 V vs Ag/AgCl durant 30 minuts per assegurar l'oxidació completa del mediador redox present en la membrana de seda.

La caracterització del biosensor incloïa tres tipus d'estudis per determinar (i) la resposta analítica del sensor, (ii) la seva estabilitat i (iii) la seva selectivitat.

Determinació de la resposta del biosensor

Per determinar la resposta del biosensor, es va preparar una solució mare de glucosa 50 mM (D-(+)-glucosa; Sigma Aldrich) i es deixava mutarotant tota la nit per establir l'equilibri entre les seves formes α - i β -D-glucosa, aquesta darrera la que reconeix selectivament l'enzim GOx. Aleshores, es preparava un banc de concentracions en el rang entre 0 i 20 mM, el que abarcava les concentracions presents en un medi de cultiu cel·lular convencional. Posteriorment, es va determinar la resposta del biosensor a les diferents concentracions preparades mitjançant cronoamperometria a 0,5V vs Ag/AgCl i 90 segons, fent servir la cambra electroquímica estàtica. Amb els valors obtinguts es va determinar la sensibilitat (pendent de la corba), temps de resposta (temps necessari per assolir el 90% de la resposta final), límit de detecció (utilitzant el mètode 3σ) i rang lineal del biosensor (considerant

com a valor més petit l'obtingut pel límit de detecció, i com el més gran, l'últim punt que manté linealitat amb les valors registrats).

Determinació de l'estabilitat del biosensor

L'estabilitat del biosensor es va determinar mitjançant mesures en continu amb la cambra de flux. Es van utilitzar dues bombes peristàltiques com a sistema d'impulsió, cadascuna d'elles connectada per una banda a la cambra electroquímica de flux, i per l'altra a un recipient amb una concentració específica de glucosa (0 mM per la primera bomba i 5 mM per la segona). Per poder connectar les dues bombes a una única cambra electroquímica es va fer servir un connector en tipus T. L'encesa i apagat de les bombes es va realitzar amb microprocessador Arduino micro (Arduino, Suïssa) emprant un script desenvolupant amb aquest objectiu que fixava el temps de bombeig de cada bomba en 90 segons. Les Bombes s'alternaven, deixant 13,5 minuts sense flux per fer la mesura. Per evitar la contaminació de les solucions de glucosa, aquestes s'esterilitzaven mitjançant irradiació ultraviolada durant 30 minuts i es reemplaçaven cada un o dos dies.

Es van dur a terme 3 experiments de diferent durada: 4h, 60h i 248h. La mesura d'amperometria es mantenia constant a 0,5V vs Ag/AgCl. Les solucions de glucosa utilitzades eren diferents per cada experiment, sent una de 0 mM i la segona solució de 4 o 5 mM.

Determinació de la selectivitat del biosensor

Es van dur a terme estudis de selectivitat per avaluar l'especificitat del biosensor en presència d'interferents amb propietats redox comunament presents en fluids biològics com l'oxigen i l'àcid ascòrbic, així com la influència del pH en la detecció de glucosa.

Aquestes mesures cronoamperomètriques es van realitzar amb la cambra electroquímica estàtica, a 0,5V vs Ag/AgCl i 90 segons.

Els nivells d'oxigen es van modificar bombollejant nitrogen durant 20 minuts en la mostra de PBS (amb glucosa 0 o 4 mM) per reduir-lo a 0, o aire comprimit durant 20 minuts per mantenir-lo a un valor proper al màxim de solubilitat d'oxigen (14 - 15 mg/L).

La interferència per presència d'àcid ascòrbic es va estudiar analitzant mostres de PBS en la que es va afegir 35 μ M d'àcid ascòrbic, una concentració que corresponia a unes 100 vegades els nivells fisiològics normals.

L'efecte del pH en la mesura es va determinar modificant el pH d'una mostra de PBS, ajustant-lo a valors de pH entre 6 i 8 amb solucions HCl 1 M i NaOH 1 M.

4.2.2.2. Optimització del biosensor enzimàtic

Es va estudiar la composició de la membrana de reconeixement i les condicions de la mesura per optimitzar la resposta del biosensor enzimàtic. Prèviament a l'optimització, es va desenvolupar un model computacional 2D en COMSOL Multiphysics (v6.2, COMSOL AB, Suècia) per estudiar la resposta del sistema i comparar-la amb els valors experimentals. El model teòric s'il·lustra a la Figura 4.2.17, i consistia en un canal fluídric de 1 mm amb un sistema d'un xip de 4 elèctrodes sent el segon l'actiu elèctricament. Sobre l'elèctrode, una barrera de difusió simulant la membrana de fibroïna.

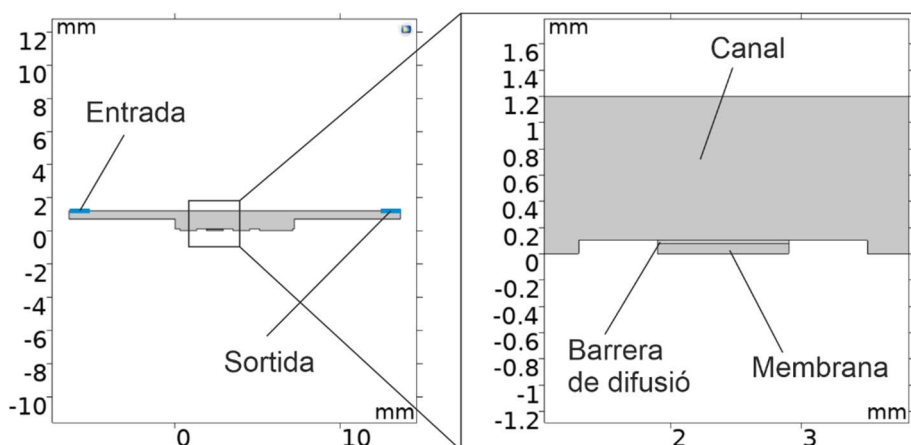


Figura 4.2.17: Representació esquemàtica de la simulació del sensor de glucosa. Esquerra: esquema del canal microfluídic mostrant l'entrada i la sortida. Dreta: detall de la posició de la membrana selectiva dins del sistema.

La simulació es va dissenyar per estudiar la interacció entre la dinàmica de fluids i els processos de transport de massa que condicionen el rendiment del sensor. Per estudiar el model teòric es van utilitzar dos mòduls principals, el mòdul *Laminar Flow* que permetia modelar el moviment del fluid i el transport de glucosa dins el microcanal, i el mòdul *Transport of Diluted Species* que es va utilitzar per simular la difusió a través de la membrana i la cinètica de reacció de les espècies químiques involucrades en el procés de detecció. Aquests mòduls es van acoblar mitjançant la interfície Multiphysics per simular els dos processos de forma conjunta i simultània.

La interfície *Laminar Flow* es va emprar per modelar el moviment del fluid dins el microcanal, on es va introduir un flux estacionari d'una solució de glucosa a 5 mM a través de l'entrada, transportant-la cap a la regió activa del sensor. Les equacions governants d'aquest mòdul són les equacions de Navier-Stokes, garantint un règim de flux laminar i incompressible, determinat pel nombre de Reynolds. Es va aplicar una

condició de contorn de no lliscament a les parets per assegurar una adhesió realista del fluid a les superfícies del canal.

La interfície *Transport of Diluted Species* es va utilitzar per simular la difusió i la cinètica de reacció de les espècies químiques involucrades en el procés de detecció. Dins de la membrana del sensor es van introduir l'enzim GOx i la forma oxidada de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB_{ox}). Es va incorporar una barrera de difusió per confinar l'enzim i el mediador dins la membrana, tot permetent el pas de glucosa i àcid glucònic. Es va assignar a la membrana un coeficient de difusió de $1 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ per a totes les espècies. Per definir la cinètica de la reacció es va considerar l'equació de Michaelis-Menten, en la qual la velocitat de reacció depenia de la velocitat màxima de la reacció (V_{max}), la constant de Michaelis (K_M) i la concentració de substrat (S), en aquest cas glucosa, segon l'expressió:

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad \text{Equació 13}$$

Aquests paràmetres es van fixar considerant valors reportats en la bibliografia [214].

Es va aplicar una malla controlada per la física amb una mida d'element *extremely coarse* per equilibrar eficiència computacional i precisió. La simulació es va realitzar en condicions dependents del temps, abastant de 0 a 1000 segons, amb un interval de pas de 10 segons per captar les variacions transitòries de concentració.

Per altra banda, a nivell experimental, es va seleccionar i optimitzar el mediador redox, la concentració i relació entre enzim i mediador, el potencial de treball i el flux fluídric dins la cambra.

Selecció del mediador redox

Per identificar el mediador més adequat per la transferència d'electrons entre l'enzim (GOx) i el transductor, es van testar sis possibles mediadors: ferricianur, HQ, PTQ, FBQ i TMB. Els mediadors es van incorporar a matrius de fibroïna de seda en concentracions compreses entre el 2,5% i el 15% (m/m) per determinar la capacitat màxima de dopatge de la membrana (màxima concentració de mediador que no comprometia les propietats mecàniques de la membrana) i l'estabilitat del mediador en la membrana. Les propietats mecàniques de la membrana es van determinar qualitativament per inspecció visual, diferenciant entre membranes estables quan eren homogènies a simple vista i no es trencaven en el contacte, de les membranes no estables, que presentaven esquerdes i es dissolien ràpidament en aigua indicant una cristal·lització incompleta.

Per altra banda, l'estabilitat del mediador a la membrana de SF es va determinar mitjançant CV realitzant cicles consecutius cada 5 minuts en el rang de potencials òptim per a cada mediador: 0 a 0,5V per ferricianur, -0,4 a 1V per HQ, -0,55 a -0,15V per PTQ i 0,1 a 0,6V per TMB (vs Ag/AgCl). Per a avaluar la retenció dels mediadors, en condicions dinàmiques, les membranes amb mediador es van exposar a un flux constant de 150 µl/min de solució tampó fosfat (PBS). L'estabilitat del compost en la membrana es va determinar quantitativament fent un seguiment del canvis en el valor de intensitat màxima del pic d'oxidació i reducció del compost per CV. El procés experimental implicava la introducció del sensor modificat amb el mediador d'interès en la cel·la electroquímica de flux, on es realitzaven 100 cicles consecutius en el rang de potencials prèviament establert per a cada mediador, esperant 5 minuts entre mesura i mesura. Les CV es realitzaven a una velocitat d'escaneig de 0,1V/s.

Optimització de les concentracions de l'enzim i el mediador

Les concentracions i relacions molars entre l'enzim i el mediador determinen la capacitat analítica del biosensor i la seva resposta. Per aquest motiu es va dur a terme un estudi sistemàtic de la composició de la membrana enzimàtica.

Per fer-ho es van preparar 8 membranes amb diferents proporcions que es presenten a la Taula 3.

Taula 3: Proporcions de enzim i mediador respecte la fibroïna per a la optimització del sensor de glucosa.

Gox (% m/m final)	TMB (% m/m final)
6	0
2	3
0,1	0
4	8
4	3
2	8
6	10
0,1	10

Les resposta de les membranes es va investigar en 8 concentracions de glucosa compreses entre 0 i 15 mM, determinant la sensibilitat (pendent de la corba corrent vs. concentració), el coeficient de correlació i ordenada a l'origen de la corba corrent vs. concentració, indicativa d'errors sistemàtics en la mesura.

Determinació del potencial de mesura òptim

En la anàlisi de mostres reals, el valor del potencial aplicat durant la mesura amperomètrica és fonamental. Potencials massa baixos

comprometen la sensibilitat de la mesura, mentre que potencials massa elevats comprometen la seva selectivitat ja que son sensibles a la presència molècules redox que podrien interferir en els resultats obtinguts. Per tal d'optimitzar el potencial emprat en la mesura cronoamperomètrica, es van realitzar corbes de calibratge a quatre potencials diferents en el rang òptim del mediador redox: 0,4 V, 0,45 V, 0,5 V i 0,6 V respecte a Ag/AgCl. Es van representar gràficament les respostes de corrent en funció de les concentracions de glucosa (0–5 mM), i es va calcular la sensibilitat i el límit de detecció (LoD) utilitzant el 3σ .

Efecte del cabal en el rendiment del sensor

Un altre paràmetre important en la mesura en sistemes fluídics és el cabal fluídric de la mostra. És important remarcar que en sistemes de cultiu cel·lular el cabal s'ha de mantenir a valor baixos per assegurar no tenir un estrès fluídric que pogués derivar en estrès oxidatiu en les cèl·lules i afectar els assajos realitzats. Per altra banda, la resposta del sistema electroquímic també depèn del cabal de la mesura i cabals elevats podrien derivar en una estabilització de la interfase elèctrode solució i la desaparició dels efectes de difusió. Per aquest motiu, es va estudiar l'efecte del cabal en la mesura amperomètrica emprant el sistema fluídric del capítol 4.2.2.1, connectat a una bomba peristàltica (Watson Marlow, Regne Unit). Es variava sistemàticament el cabal, enregistrant les respostes de corrent, les alçades dels pics i les àrees dels pics en un rang de cabals entre 0 i 3 $\mu\text{l/s}$.

4.2.2.3. Validació del biosensor enzimàtic en cultius cel·lulars

La validació del biosensor enzimàtic per glucosa es va realitzar en les instal·lacions per cultiu cel·lular de la UIC utilitzant el sistema de monitorització contínua descrit a l'apartat 4.2.2.1. El sistema es connectava de forma similar a la descrita en l'apartat 4.2.1.3. pels ISFETs, amb la cambra de cultiu cel·lular i una bomba peristàltica (*Watson Marlow*) que permetia mantenir un flux constant dins el sistema de 10 µl/min durant 40 minuts i detenint-se durant 20 minuts mentre es realitzaven les mesures.

Prèviament a la realització de l'assaig, el sistema de tubs i les cambres s'esterilitzava per exposició a llum UV durant 15 minuts o per rentat amb una solució de lleixiu al 25% durant almenys 10 minuts, seguit d'un rentat amb medi durant 10 minuts per eliminar residus de lleixiu. Posteriorment, el sensor enzimàtic es calibrava utilitzant un µStat 400 bipotenciostat portàtil (Dropsens, Espanya).

Les cèl·lules Neuro-2a s'introdueixen en la cambra de cultiu a una concentració de 20.000 cèl·lules/ml en *Eagle's Minimum Essential Medium* (MEM) suplementat amb 10% de sèrum fetal boví (FBS), 1% de penicil·lina/estreptomicina (P/S) i 1% de GlutaMax (L-glutamina) i glucosa de 5 mM. La cambra s'introdueix a l'incubador on es mantenia a 37°C en una atmosfera humida amb 5% CO₂, renovant el medi de cultiu cada 24-48 hores. Després del primer canvi de medi, la cambra es va connectar al sistema fluídric amb la cel·la electroquímica per realitzar el seguiment de la variació de la concentració de glucosa. Les mesures amperomètriques es realitzaven contínuament en condicions òptimes (0,5V vs Ag/AgCl, i només agafant els valors de corrent quan el flux de solució era 0).

Les lectures del biosensor es comparaven amb les proporcionades per un kit comercial Glucose MR (Linear Chemicals, Espanya). Aquest assaig enzimàtic colorimètric es basa en la catalització de la glucosa

per glucosa oxidasa (GOx), generant àcid glucònic i peròxid d'hidrogen (H_2O_2). Posteriorment, el H_2O_2 reacciona amb un substrat cromogènic en presència de peroxidasa, produint un canvi de color mesurable. Per a les mesures, s'extreien 200 μl de mostra (medi cel·lular) i es barrejaven amb 2 μl de reactiu enzimàtic, seguit d'una incubació a 37°C durant 5 minuts. L'absorbància es va enregistrar a 500 nm amb un espectrofotòmetre (Zuzi 4211/20, Zuzi, Espanya).

El procediment anterior de seguiment continu del cultiu es va repetir també després de l'addició d'un fàrmac per valorar la seva influència en el metabolisme cel·lular. En l'experiment amb el fàrmac AICAR, es va introduir 1 mM d'AICAR després de 24 hores de monitorització. El manteniment rutinari del cultiu cel·lular va incloure el rentat de les cèl·lules amb PBS, la seva desadhesió amb tripsina, i el resseminat a una dilució 1:15 després de la centrifugació i resuspensió en medi fresc per garantir un creixement òptim i evitar la sobreconfluència.

4.2.3. Transductor òptic

Es van desenvolupar dues plataformes òptiques per la mesura d'adipòcits: una basada en PMMA i una altra utilitzant una placa de Petri estàndard modificada. A més, es va fabricar un adaptador per alinear connectors estàndard SMA905 i el dispositiu òptic.

4.2.3.1. Fabricació de la plataforma òptica de cultiu en PMMA

Es va fabricar una estructura de PMMA mitjançant tall làser per integrar-hi dues fibres òptiques alineades frontalment, amb l'objectiu de realitzar un seguiment dels canvis en les propietats òptiques de cultius cel·lulars en temps real. L'estructura incloïa una cambra de cultiu rectangular i dues fibres òptiques enfrontades i alineades que permetien realitzar mesures de transmissió de llum en la zona del cultiu cel·lular.

El disseny del dispositiu consistia en tres capes de PMMA apilades i una capa extra per fer de tapa (Figura 4.2.19A). La capa 3 (inferior, de 3 mm de gruix) servia com a suport de l'estructura. La capa 2 (intermèdia, de 50 μ m de gruix) està dissenyada per guiar la fibra òptica a través d'un microcanal corbat i incloïa una finestra de 7,6 $\times$ 3,2 mm on les cèl·lules es col·locaven a l'alçada adequada per a l'anàlisi òptica. El diàmetre del nucli la fibra (50 μ m) es va seleccionar en funció de la mida mitjana dels adipòcits blancs diferenciats. Per garantir un posicionament precís i evitar el desplaçament durant l'adhesió, es van afegir dues pestanyes de suport en aquesta capa (es troben a la dreta i sota, envoltant els microcanals per on ha de passar la fibra), que es van retirar després de l'assemblatge. Un cop col·locada la fibra al canal, la capa 1 (superior, de 12 mm de gruix) es va unir per formar un reservori de cultiu (finestra de 7,6 $\times$ 12,7 mm).

La tapa es va fabricar a partir de dues capes de PMMA: una amb la mida de la finestra per ajustar-se correctament a la part superior de la cambra, i l'altra més gran amb quatre ranures amb canals gravats per permetre l'intercanvi de gas entre el cultiu i l'atmosfera de la incubadora. Ambdues capes es van unir químicament amb àcid acrílic.

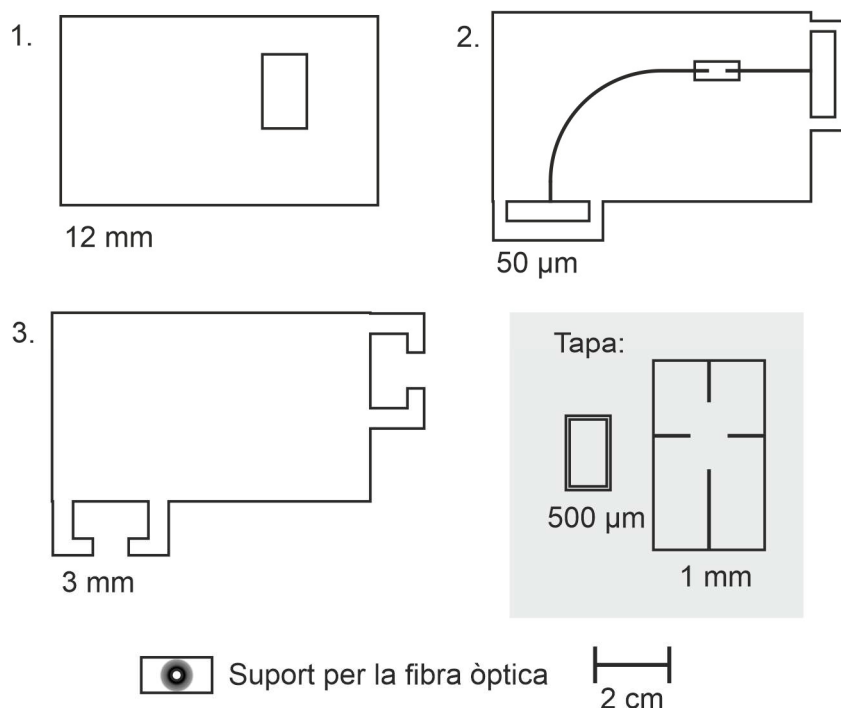


Figura 4.2.18: Disseny de la plataforma òptica de PMMA.

Una vegada el dispositiu va ser ensamblat (Figura 4.3.6A), les fibres òptiques es van situar als extrems oposats de la cambra de cultiu, una connectada a una font de llum i l'altra a un espectrofotòmetre. Per segellar els punts d'entrada de les fibres i evitar filtracions, es va aplicar PDMS als orificis corresponents i es va curar amb temperatura. A més, es van integrar unes estructures als punts de sortida de les fibres a la capa 1 per suportar fixacions externes de la fibra i reduir l'estrès mecànic, prevenint el doblec o trencament de les fibres. Aquests suports es van fixar amb adhesiu acrílic resultant en la Figura 4.2.19B. Per millorar l'adherència cel·lular a la superfície de PMMA, la cambra muntada es va funcionalitzar amb poli-L-lisina. Es va incubar la base de la cambra amb 2 ml de solució de poli-L-lisina a 37 °C durant una hora. Un cop finalitzada la incubació, es va retirar la solució i la superfície es

va esbandir tres vegades amb solució salina tampó fosfat (PBS) per eliminar qualsevol residu.

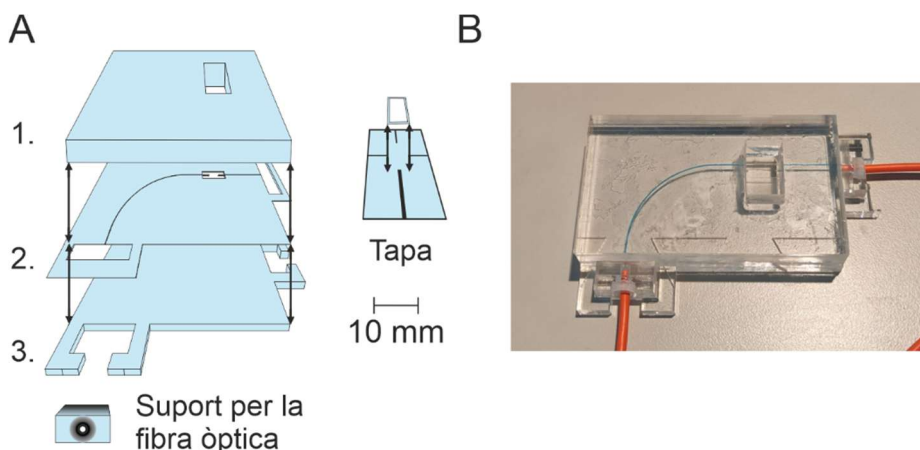


Figura 4.2.19: Dispositiu òptic amb PMMA. (A) Il·lustració capa per capa de la fabricació del dispositiu òptic amb PMMA. (B) Fotografia del dispositiu fabricat amb la fibra òptica integrada i les estructures de suport.

4.2.3.2. Adaptació de plaques de Petri estàndard

Es va desenvolupar un segon dispositiu òptic amb una nova configuració, utilitzant una placa de Petri estàndard per les cèl·lules. Aquest disseny tenia com a objectiu conservar la compatibilitat biològica dels plàstics de cultiu convencionals, tot integrant fibres òptiques per a un monitoratge basat en l'absorció. L'estratègia consistia a incorporar la placa de Petri en una plataforma de PMMA, que alineava les fibres òptiques a través de la superfície de cultiu.

La cambra constava de quatre capes de PMMA muntades al voltant d'una placa de Petri de 90 mm (Figura 4.2.20). La capa 4 (inferior, de 3 mm de gruix) servia com a base del dispositiu i incloïa un orifici circular central per facilitar la visualització microscòpica des de sota. Com en el prototip de PMMA, aquesta capa també incloïa estructures per incloure els suports de les fibres i reduir l'estrès sobre les fibres òptiques.

Aquesta capa es va unir químicament a la capa 3 (de 2,38 mm de gruix), que presentava un tall circular dimensionat amb precisió per allotjar la base de la placa de Petri. Aquest gruix es va seleccionar per elevar les fibres òptiques a l'alçada adequada, alineant-les amb la superfície del cultiu. La capa 2 (de 50 μm de gruix) replicava l'obertura de la capa 3 per allotjar la placa de Petri i incorporava dos microcanals laterals per a les fibres òptiques. Aquesta capa també es va unir químicament al conjunt inferior mitjançant àcid acrílic i calor. A continuació, es va fer servir una agulla per perforar petits orificis als extrems de la placa de petri per permetre la inserció de les fibres òptiques.

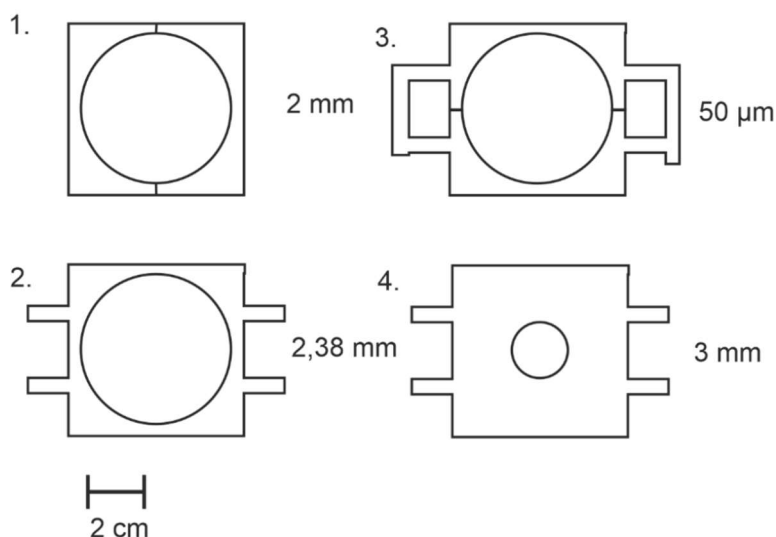


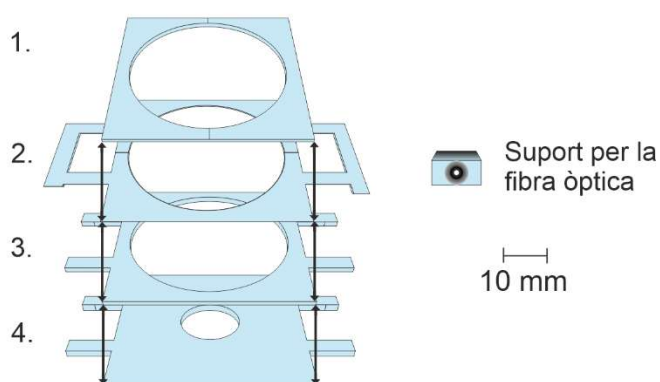
Figura 4.2.20: Disseny del dispositiu integrat òptic en placa de Petri.

La pròpia placa de Petri es va fixar a l'estructura utilitzant adhesiu acrílic, assegurant la seva integració amb l'estructura de PMMA. Finalment, es va afegir la capa 1 (de 2 mm de gruix) per completar el dispositiu (Figura 4.2.21A). Aquesta capa constava de dues peces dissenyades per envoltar els costats de la placa de Petri, mantenint-la al seu lloc i, alhora, cobrint els canals de les fibres òptiques.

Un cop les fibres van ser inserides i alineades correctament, els orificis es van segellar amb PDMS per evitar fuites. Els suports de les fibres es van enganxar amb adhesiu acrílic per minimitzar la flexió o el despreniment durant l'ús, igual que en la cambra anterior.

Aquest disseny (Figura 4.2.21B) conserva les propietats superficials d'una placa de Petri estàndard, tot permetent el monitoratge òptic en temps real mitjançant espectroscòpia d'absorció.

A



B

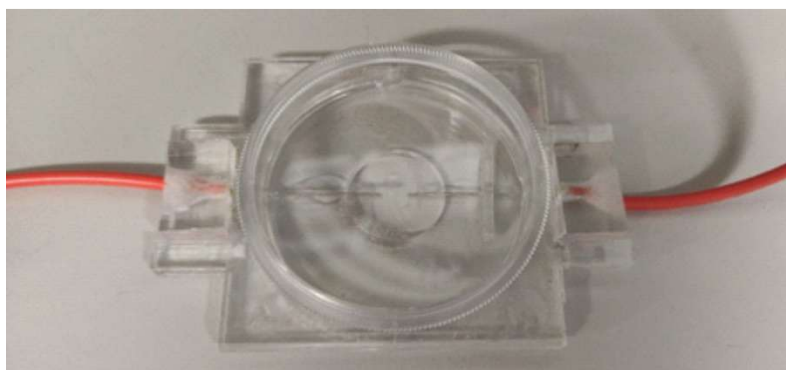


Figura 4.2.21: Dispositiu òptic en placa de Petri. (A) Il·lustració capa per capa de la fabricació del dispositiu òptic per placa de Petri. (B) Fotografia del dispositiu muntat amb la placa de Petri de 90 mm integrada i les fibres òptiques.

4.2.3.3. Adaptador per als connectors estàndard SMA905

En paral·lel al desenvolupament de la cambra òptica, es va dissenyar i fabricar un connector a mida per connectar les fibres òptiques amb connectors estàndard SMA905. L'objectiu d'aquest component era assegurar una connexió estable entre les fibres òptiques de 50 μm utilitzades a la cambra de detecció i la instrumentació òptica, com la font de llum i l'espectrofotòmetre.

El connector es va fabricar amb PMMA negre per evitar soroll extern. En una de les seves cares es va gravar una cavitat circular de 9,2 mm de diàmetre (cercle groc) i aproximadament 0,75 mm de profunditat mitjançant raspat làser per allotjar-hi la connexió SMA (Figura 4.2.22A). Al centre d'aquesta cavitat, es va perforar un petit orifici, de 50 μm de diàmetre, mitjançant làser per permetre la inserció del nucli de la fibra òptica, assegurant-ne l'alineació amb l'eix òptic del connector SMA resultant en Figura 4.2.22B.

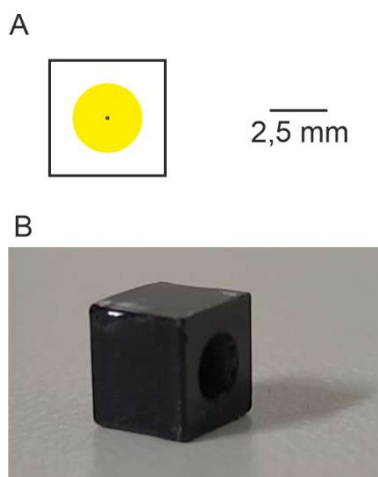


Figura 4.2.22: Connector per a SMA905. (A) Esquema de disseny del bloc connector fibra–SMA. L'orifici central allotja l'extrem nu de la fibra òptica; la

cavitat circular encaixa amb la interfície SMA. (B) Fotografia del connector final fabricat en PMMA negre.

4.2.3.4. Caracterització dels sensors òptics

El sistema òptic es va caracteritzar determinant la seva capacitat analítica en la mesura dels colorants blau de timol (pH 6) i taronja de metil (pH 2 i pH 9), seleccionats pels seus pics d'absorció característics a 598 nm, 460 nm i 508 nm, respectivament. En la mesura d'absorbància, el dispositiu òptic es connectava, per una banda a un espectrofotòmetre Maya (Ocean Optics, Estats Units), controlat mitjançant el programari SpectraSuite, i per l'altra, a una font de llum UV-VIS-NIR (model DH-200-BAL, Mikropack, Alemanya). Els espectres d'absorció es van adquirir i representar en funció de la concentració per obtenir corbes de calibratge lineals. Es va fer la mitjana de 3 mesures, amb un temps d'integració de 80 ms, i utilitzant aigua desionitzada com a referència. Els valors obtinguts es van comparar amb una cubeta de 1 cm de longitud, el qual es va tenir en compte per mesurar la distància real del camí òptic dels dispositius òptics fabricats. La cubeta es va mesurar en un suport per cubetes (Cuvette holder, Metrohm DropSens, Suïssa). A partir de la pendent de cada corba i dels coeficients d'extinció coneguts en condicions de cubeta, es va calcular la longitud de trajecte òptic efectiva del dispositiu utilitzant la llei de Beer-Lambert.

4.2.3.5. Validació dels sensors òptics per al cultiu cel·lular i diferenciació de preadipòcits 3T3-L1

Els dispositius òptics es van validar amb cultius de preadipòcits 3T3-L1 que es diferenciaven a adipòcits blancs. Els protocols de cultiu i diferenciació es detallen a continuació.

Els preadipòcits 3T3-L1 es van cultivar i diferenciar dins dels dispositius de detecció òptica utilitzant un protocol d'inducció adipogènica estàndard adaptat de Zebisch et al. (2012) [215]. Les cèl·lules es van sembrar a una densitat de 50.000 cèl·lules/cm² i es van mantenir en Medi Basal I (BMI), compost de DMEM sense vermell de fenol, 10% de sèrum de vedell, 1% de penicil·lina-estreptomicina i 1% de GlutaMAX. Després de 72 hores, un cop assolida la confluència completa, es va induir la diferenciació. El protocol implicava canviar el medi de cultiu per Medi de Diferenciació I (DMI), que contenia DMEM sense vermell de fenol, 10% de sèrum fetal boví, IBMX (0,5 mM), dexametasona (0,25 µM), insulina (1 µg/ml) i rosiglitazona (2 µg/ml) i deixar les cèl·lules en proliferació durant 48 hores. Seguidament, el medi de les cèl·lules es van canviar per Medi de Diferenciació II (DMII), format per DMEM amb 10 % FBS, 1 % penicil·lina-estreptomicina, 1 % GlutaMAX i 1 µg/ml insulina. Finalment, els cultius es van establir en Medi Basal II (BMII) constituït per DMEM, 10 % FBS, 1 % P/S i 1 % GlutaMAX.

Mesures en temps real

Durant tot el procés de diferenciació, es van adquirir espectres d'absorció òptica en temps real utilitzant un sistema de fibra òptica connectat a una font de llum i a un espectròmetre. L'espectròmetre (Ocean Optics, model USB4000) era controlat mitjançant el programari SpectraSuite, configurat per registrar un espectre cada 12 minuts. El temps d'integració es va fixar en 60 ms. La cambra de cultiu va romandre connectada de manera contínua al sistema òptic durant la incubació, permetent un monitoratge ininterromput. Les dades espectrals es van processar posteriorment per avaluar tendències en l'absorció.

Per validar l'acumulació de lípids en els adipòcits madurs, es va dur a terme un tenyit amb Oil Red O després de la diferenciació. Un cop retirat el medi de cultiu i rentades les cèl·lules amb PBS, es van fixar amb formaldehid al 4% durant 30 minuts. Després d'una breu exposició a isopropanol i assecat, les cèl·lules es van incubar durant una hora amb una solució d'Oil Red O preparada barrejant tres parts de tint amb dues parts d'aigua durant 30 minuts. Es va eliminar l'excés de tint amb rentats amb aigua destil·lada.

Es van utilitzar dues configuracions per avaluar la resposta òptica de les cèl·lules tenyides. En la configuració en pla, l'absorció es va mesurar horitzontalment a través del cultiu utilitzant fibres incrustades. En la configuració perpendicular, la placa de Petri es va muntar verticalment en una plataforma personalitzada i s'il·luminava de dalt a baix mitjançant dues fibres alineades.

5. Resultats

Aquest capítol presenta els principals resultats experimentals obtinguts. Està estructurat en tres subcapítols principals, cadascun dedicat a una tecnologia sensorial diferent: un sensor potenciomètric ISFET funcionalitzat amb fibroïna de seda, un biosensor amperomètric basat en GOx i TMB per a la detecció de glucosa, i un sensor òptic per al seguiment de la diferenciació cel·lular en línies 3T3-L1.

5.1. Sensors ISFETs funcionalitzats amb fibroïna de seda

Els resultats d'aquest capítol s'han realitzat amb col·laboració amb J. D. Urbano, F. Perdignes, C. Aracil, J. M. Quero de la USi M. Perez, A. C. Reguera, R. Rodríguez-Rodríguez de la UIC i han donat lloc a 1 publicació (Silk Fibroin-Functionalised ISFETs for Long-Term pH Monitoring in Cell Cultures) i 3 contribucions a congrés (XXC CMSB, 2021; EPoSS, 2022; 12th IACS, 2022).

Introducció

Mantenir un equilibri adequat del pH és crucial tant en sistemes fisiològics com en entorns de cultiu cel·lular (*in vitro*), on les activitats biològiques són sensibles a desviacions dels nivells òptims de pH. L'homeòstasi àcid-base en els sistemes biològics garanteix que el pH es mantingui dins d'un rang òptim (essent normalment un pH d'entre 7,2 a 7,6 en el cas de cèl·lules de mamífers [216]), permetent que les reaccions biològiques tinguin lloc de manera eficient. En cultius cel·lulars (models *in vitro* simplificats dels sistemes biològics complets), aquest equilibri no es regula de forma autònoma sinó que es manté normalment mitjançant l'ús de solucions tamponades com l'àcid 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfònic (HEPES) o el bicarbonat de sodi (sistema bicarbonat/ CO_2). Aquest últim, el més comú, regula el pH del medi a través d'un equilibri entre les seves formes solubles i gasoses. El seu funcionament es basa en establir uns nivells controlats de CO_2 per estabilitzar el pH ambiental. Per això, per optimitzar l'efecte tamponador del bicarbonat, els nivells de CO_2 en un incubador per cultius cel·lulars es sol fixar al 5% [217].

En el cultiu cel·lular, l'activitat metabòlica resulta en una acidificació del medi, quan el tampó perd la seva capacitat tamponadora. En aquest moment, es sol procedir a canviar el medi de cultiu de les cèl·lules per tal de restaurar uns nivells de pH fisiològics i proveir de nutrients per poder mantenir el cultiu en condicions de creixement òptimes. Per tal de poder determinar de forma simple i ràpida el moment adequat pel canvi de cultiu, els propis medis de cultiu solen incorporar indicadors de pH com vermell de fenol, un indicador de pH molt utilitzat per la seva elevada solubilitat, baixa toxicitat i evident transició de vermell a groc com a resultat de l'acidificació del medi fora del rang fisiològic [218].

Tanmateix, l'estret rang de detecció del vermell fenol (és només sensible a canvis de pH entre 6,8 i 8,2 unitats de pH [219]) i la seva potencial interferència amb els sistemes biològics (presenta activitat redox que podria interferir o modificar l'activitat metabòlica o el comportament dels fàrmacs [220]) limiten la seva utilitat. En conseqüència, s'han desenvolupat mètodes alternatius per tal de poder monitoritzar el pH de forma més precisa i innòcua pel cultiu com hidrogels sensibles al pH [221], sensors d'impedància d'estat sòlid [222] i transistors d'efecte de camp sensibles a ions (ISFET) [184]. Entre aquests, els ISFET destaquen per ser altament miniaturitzables i capaços de mesurar volums petits de mostra, integrables en estructures de cultiu cel·lular, robustos, sensibles i presentar uns temps de resposta curts.

No obstant, els ISFET s'enfronten a dos grans reptes: la deriva de la senyal i la seva susceptibilitat a l'adhesió de biomolècules presents en els medis de cultius cel·lulars que modifiquen la seva resposta (*biofouling*). Per tal de pal·liar aquests problemes, és comú que els ISFETs es modifiquin superficialment amb membranes que limiten el transport de matèria a la superfície sensora [223]. Tot i que s'han explorat alguns recobriments *antifouling*, com ara el diòxid de titani (TiO₂) [119], de poli(2-metil-2-oxazolina) [224], o de Nafion [225], no han permès allargar el temps de vida del sensor el suficient com per a poder realitzar un assaig farmacològic complet, procés que pot requerir fins a 7 dies [226].

En aquest capítol s'explorà l'ús d'un enfocament nou que utilitza la fibroïna de seda com a membrana *antifouling* i antiadherent per al desenvolupament de ISFET de pH de llarga vida per a la monitorització de cultius cel·lulars. Derivada del cuc de seda *Bombyx mori*, la fibroïna de seda presenta diverses propietats interessants, com ara la

resistència mecànica, l'estabilitat tèrmica, la biocompatibilitat i la facilitat d'integració en els processos de microfabricació. Els ISFET funcionalitzats amb membranes de fibroïna de seda cristal·lina s'avaluen estructural i funcionalment, comparant les seves capacitats analítiques abans i després de la funcionalització. Posteriorment es compara la seva capacitat de monitorització en mostres complexes, on es valora la seva estabilitat tant en termes de deriva de senyal com influència de la resposta a l'adhesió molecular i cel·lular. Finalment, es compara la capacitat analítica d'ISFETs funcionalitzats i no funcionalitzats en el seguiment de cultius cel·lulars, primer en mesures puntuals i posteriorment monitoritzant aquest paràmetre al llarg del temps durant un període de 8 dies en presència i absència d'agents pro i antiproliferatius. Els resultats proporcionats pels sensors es comparen en tot moment amb mètodes de referència com el sensors de membrana de vidre o indicadors de pH com el vermell de fenol.

5.1.1. Anàlisi estructural, de composició i electroquímica de pel·lícules de fibroïna de seda en ISFET

Per funcionalitzar els ISFETs de pH amb fibroïna, 2 µl d'una solució aquosa de fibroïna de seda (6% p/p) es van dipositar a la superfície de la porta de nitrur de silici de l'ISFET. Seguidament, es va fer un procés de cristal·lització, consistint en dues etapes, una primera de secat de 18-24 hores, i una segona etapa de recuit en atmosfera saturada d'aigua (Figura 5.1.1). Aquest procés dona lloc a la formació dels anomenats ISFETs de fibroïna.

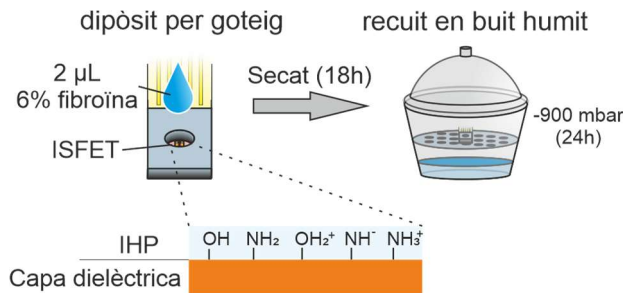


Figura 5.1.1: Esquema de la funcionalització de la seda de la porta de l'ISFET. El mecanisme de detecció ISFET es basa en la protonació/desprotonació dels grups funcionals hidroxil i amina presents a la porta ISFET, que canvien el potencial VGS proporcionalment a la concentració de protons.

Amb aquest procediment es van obtenir membranes de fibroïna de seda de $30 \pm 14 \mu\text{m}$ de gruix a la porta ISFET. Les capes no eren visibles a simple vista per la transparència del material, però donaven lloc a patrons de difracció com els que s'observen a la Figura 5.1.2A. Aquests patrons de difracció no eren observables en ISFETs sense modificar. No obstant, la confirmació de la presència de la membrana de fibroïna sobre la porta de l'ISFET es va realitzar mitjançant dues tècniques: Per imatges transversals de microscòpia electrònica, obtingudes després de tallar el dispositiu mitjançant un flux d'ions focalitzat i per espectroscòpia d'infraroig. En el primer cas, es va observar la presència de films de fibroïna sobre la porta d'òxid de nitrur de l'ISFET (Figura 5.1.2B), demostrant l'adhesió entre la fibroïna de seda i la capa dielèctrica del dispositiu.

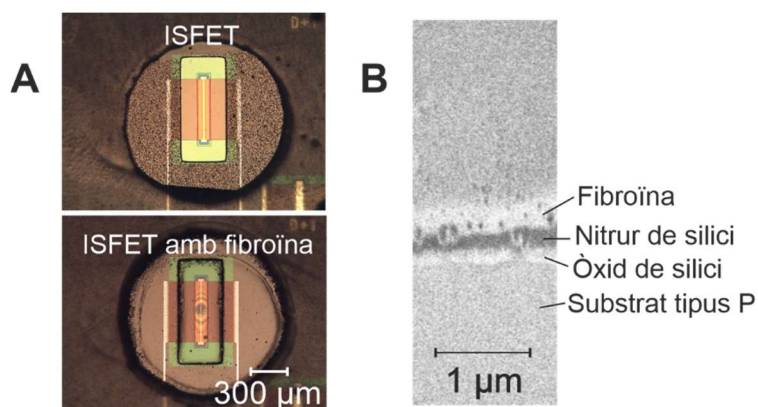


Figura 5.1.2: Caracterització òptica d'ISFETs amb membranes de fibroïna (A) Imatge de microscòpia d'ISFET amb pel·lícules de seda (inferior) i sense (superior). (B) Secció transversal de l'ISFET obtinguda per FIB, amb la membrana de seda a la part superior de la porta.

Per altra banda, les mesures d'infraroig, concretament ATR-IR (*Attenuated Total Reflectance Infrared Spectroscopy*), no només confirmaven la presència de la membrana de seda, sinó que també indicaven la seva naturalesa cristal·lina. En la Figura 5.1.3 s'analitzen i es comparen els espectres ATR-IR de solucions aquoses de fibroïna de seda i membranes de seda abans i després del procés de cristal·lització formades en dos substrats: sobre plaques de Petri i a la superfície ISFET. Les solucions de fibroïna de seda presentaven un pic característic a 1637 cm^{-1} associat a l'amida I, un pic a 1513 cm^{-1} i una petita espatlla a 1546 cm^{-1} que corresponia als grups amida II. A les membranes amorfes de seda, l'aportació d'aquest pic de 1513 cm^{-1} va ser molt superior a la corresponent als 1546 cm^{-1} , una variació associada a la pèrdua d'aigua per l'etapa d'assecat. Després de l'etapa de recuit, va aparèixer un nou pic a l'espectre IR a 1620 cm^{-1} , que s'associava als grups amida I de les regions amb làmines β de l'estructura fibroïna II. Aquests pics són indicatius que el procés de

crystal·lització s'ha dut a terme de forma correcta, confirmant que el procés era adequat per produir membranes de fibroïna cristal·lines en ISFETs. Els ISFETs resultat d'aquest procés es van anomenar ISFETs de fibroïna per simplificar. La semblança dels espectres IR de la seda cristal·lina en els dos substrats, és a dir, plaques de Petri polimèriques i ISFET, va confirmar la robustesa del protocol de crystal·lització i la similitud estructural de les pel·lícules de seda cristal·lina en ambdós substrats.

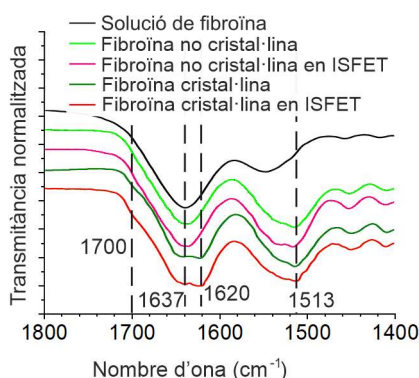


Figura 5.1.3: Els espectres IR de la solució aquosa de fibroïna de seda, fibroïna de seda no cristal·litzada i cristal·litzada. Aquestes es produeixen sobre poliestirè o sobre la porta ISFET.

Elèctricament, els ISFETs amb fibroïna es van comportar de manera similar als ISFETs no modificats (Figura 5.1.4). A nivell funcional, les corbes característiques I_D - V_{GS} abans i després de la funcionalització amb fibroïna van mostrar canvis mínims en el valor de la V_{GS} , amb només un petit canvi en la tensió llindar (+34 mV a pH 7 després de la funcionalització) i una variació insignificant en la transconductància màxima (499,4 μ A per a ISFET no modificats a 500,6 μ A després de la deposició de membrana de seda).

Aquestes diferències menors no comprometen la sensibilitat del sensor, ja que tant els ISFETs amb fibroïna com sense van mostrar respostes similars a les variacions de pH, amb sensibilitats sub-Nerstianes de 51 ± 4 mV/pH per a ambdós casos. Aquests resultats indiquen que la membrana de fibroïna de seda no interferia amb la capacitat sensora de l'ISFET.

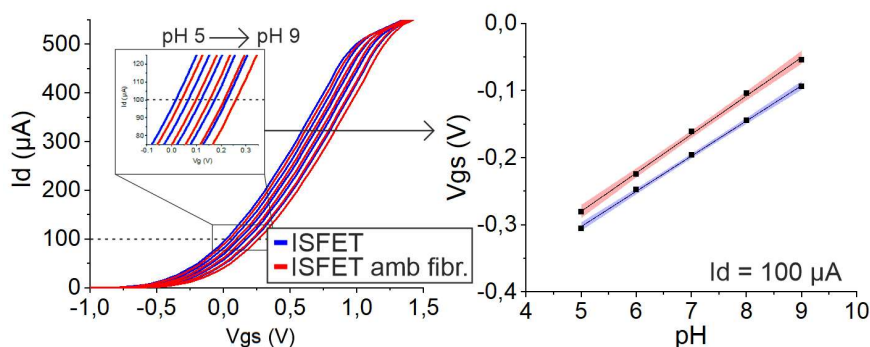


Figura 5.1.4: Estudi elèctric ISFETs. Característica ID-VGS dels ISFETs abans (blau) i després (vermell) de la deposició de fibroïna a diferents pH, i les corbes de calibratge resultants representen la variació del valor V_{GS} amb el pH.

5.1.2. Rendiment dels ISFETs de fibroïna

La capacitat analítica dels ISFETs de fibroïna es va avaluar a través de diversos paràmetres: temps de resposta, sensibilitat, rang lineal, límit de detecció, reproductibilitat, histèresi i deriva.

5.1.2.1. Temps de respost, sensibilitat, rang lineal i límit de detecció

La presència de la membrana de fibroïna en la zona sensora de l'ISFET influïa significativament en el temps de resposta del dispositiu. Els ISFETs sense membrana van aconseguir l'estabilització del senyal en $2,0 \pm 0,6$ segons (temps necessari per assolir el 95% del senyal final),

mentre que els ISFETs amb fibroïna requerien 20 ± 9 segons per establir-se (Figura 5.1.5A). Aquest retard s'atribueix a les limitacions difusionals introduïdes per la membrana de seda. Malgrat això, els sensors modificats presentaven una resposta sub-nernstiana en un ampli rang de pHs (pH 1 a 14) (Figura 5.1.5B). Els ISFETs amb fibroïna demostraven una sensibilitat de $55,1 \pm 2$ mV/pH (mitjana entre 12 sensors independents).

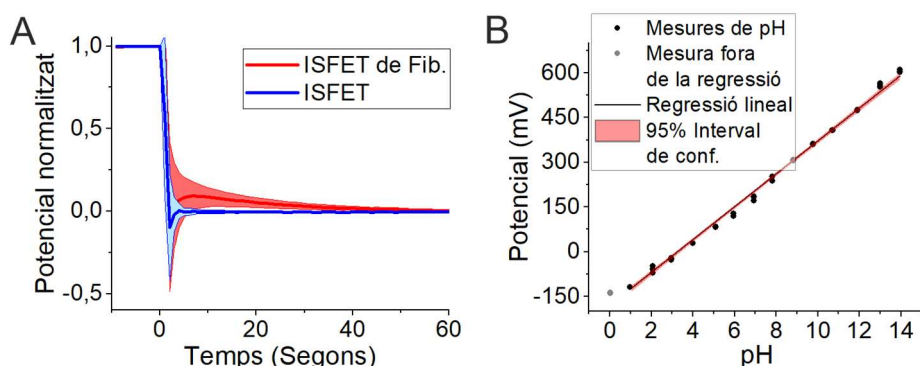


Figura 5.1.5: Estudi del temps de resposta. (A) Enregistrament del temps de resposta a un canvi d'una unitat de pH per a ISFET de fibroïna (vermell) i no modificats (blau). (B) Calibratge per al rang lineal de pH 0 a 14 per a un ISFET de fibroïna. Ajust lineal: $y = 55,1x - 180$.

5.1.2.2. Deriva

La deriva dels sensors, el canvi gradual en el potencial llindar al llarg del temps, es va investigar submergeint ISFET no modificats i ISFETs funcionalitzats en una solució tampó de pH 7 mentre es monitoritzava el potencial durant 60 hores. Els resultats indicaven diferències significatives entre els dos tipus de sensors. Els ISFETs no modificats mostraven una deriva inicial més gran, començant amb variacions de potencial de 5 mV/h i que estabilitzaven després de 10 hores, resultant en una deriva residual de $0,93 \pm 0,22$ mV/h. Per altra banda, els ISFETs de fibroïna demostraven un comportament més estable, presentaven

deriva inicial més petita, amb variacions de 2,4 mV/h que s'estabilitzava en 20 minuts fins a una deriva residual similar de $0,96 \pm 0,15$ mV/h (Figura 5.1.6A i B). La reducció del temps d'estabilització es pot atribuir a la forta interacció entre la fibroïna de seda i el substrat de silici, que estabilitzava la interfase ISFET-electròlit, reduint les alteracions superficials causades per processos com la hidratació i l'oxidació, responsables de la deriva observada en aquest tipus de dispositius.

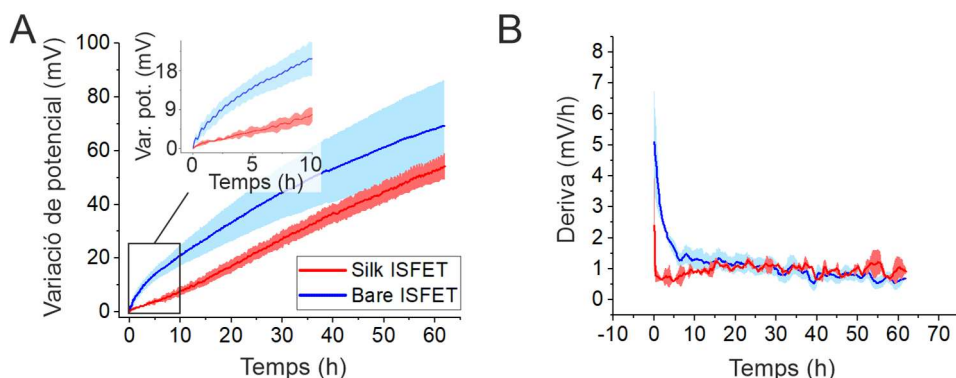


Figura 5.1.6: Estudi de la deriva dels ISFETs. (A) Estabilitat del senyal temporal al llarg del temps per a ISFET no modificats (blau) i de fibroïna (vermell) en tampó de pH 7. L'àrea ombrejada representa la desviació estàndard de la mesura. (B) Valors de deriva per als diferents tipus d'ISFET. La deriva s'ha calculat mitjançant la derivada del temps de respecte potencial.

5.1.2.3. Histèresi

La histèresi dels dispositius, entesa com la dependència de la senyal de sortida del sensor del seu estat anterior, es va avaluar realitzant variacions cícliques de pH, tant creixents com decreixents, amb ambdós tipus d'ISFET. El pH de la solució es va variar entre pH 5 i pH 10 en una solució tampó Britton-Robinson, mitjançant adicions de petits volums de HCl (1 M) i NaOH concentrats (1 M). Per valorar l'histèresi del sistema, es va analitzar el temps de resposta del sensor (temps necessari per assolir un 85% de la senyal final del sensor) així com els

canvis de sensibilitat (pendent de la corba de calibrat) associats a processos d'increment i disminució seqüencial de pH.

Considerant el temps de resposta, els ISFET de seda requerien temps més llargs d'estabilització després dels canvis de pH degut a les limitacions difusionals introduïdes per la membrana (Figura 5.1.7A). En relació a la sensibilitat de la mesura, els dos dispositius presentaven bones sensibilitats (> 50 mV/pH) tant en les respostes durant les corbes de calibratge ascendents (increment de pH) com descendents (disminució de pH). No obstant, hi havia lleugeres diferències en els dos casos en els propis valors de sensibilitat, sent sempre més elevades en el cas descendent que en l'ascendent (Figura 5.1.7B). Aquesta diferència, observada en els dos casos i, per tant, no associable a la presència de les membranes de fibroïna, està relacionada amb variacions en la cinètica de protonació i desprotonació a la superfície de la porta ISFET, un aspecte que ja havia estat reportat en la bibliografia [207]. Finalment, indicar que els dos dispositius presentaven un bon índex de regressió (superior a 0,99) quan es comparaven amb un sensor de pH de membrana de vidre, que es va emprar com a dispositiu de referència.

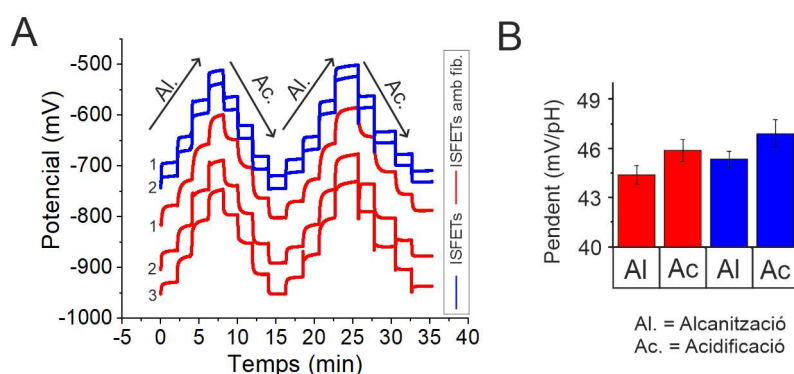


Figura 5.1.7: Estudis d'histèresi. (A) Enregistrament de proves d'histèresi a diferents pH (entre 5 i 10) en solució Britton-Robinson amb ISFET de fibroïna

(vermell) i ISFET no modificat (blau). (B) Pendent de calibratge en augmentar i disminuir el pH en la solució de Britton-Robinson (n=5).

5.1.3. Estudis d'adhesió superficial

Un cop avaluada la resposta dels ISFETs, es va estudiar la seva robustesa en la mesura de pH en matrius biològiques complexes, concretament (i) un medi amb una elevada concentració proteica (d'albúmina 45 mg/ml, similar a la que hi hauria fluids biològics com la sang), i (ii) una solució d'*Escherichia coli* (*E. coli*), emprada per estudiar l'adhesió cel·lular a la superfície del sensor. El procediment experimental consistia en tres monitoritzacions consecutives de 24 hores: la primera en tampó de fosfat per estudiar la deriva del sensor, la segona en albúmina per estudiar els processos d'adhesió molecular i la tercera en la suspensió bacteriana per estudiar els processos d'adhesió cel·lular. La Figura 5.1.8A mostra la variació del valor de potencial al llarg del temps tant en ISFETs modificats i no modificats. Els resultats evidenciaven la capacitat antiadherent de la membrana de fibroïna present en els ISFETs modificats, que presentaven una menor variació de potencial al llarg de les tres incubacions que els ISFET no modificats, així com una menor variabilitat entre les mesures proporcionades pels tres ISFETs analitzats (n=3 en els dos casos). En particular, després de la introducció de l'albúmina a les 24 hores i l'exposició posterior a *E. coli*, l'ISFET no modificat mostrava desviacions més grans i una pèrdua de sensibilitat més elevada que els ISFETs modificats a causa de l'adhesió de biomolècules i cèl·lules.

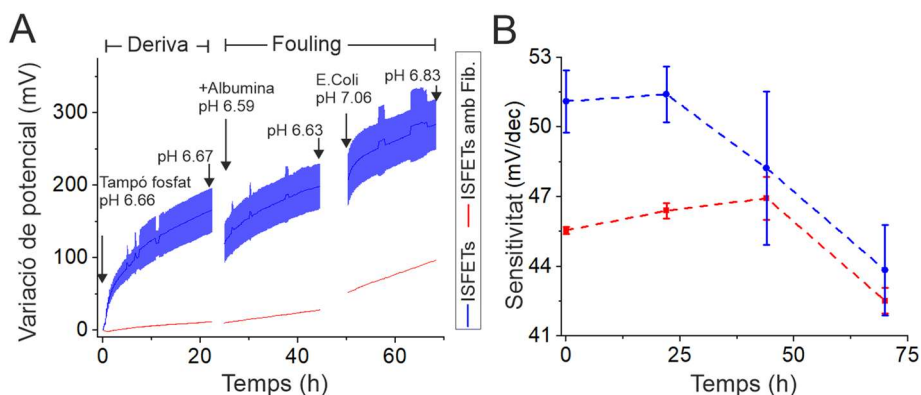


Figura 5.1.8: Estudis de *biofouling* 1. (A) Monitorització dels ISFETs no modificats i de fibroïna, primer en una solució tamponada amb fosfat i després amb una concentració d'albumina de 45 mg/ml. (B) Estudi de sensibilitat dels ISFETs durant el procés de seguiment.

Per tal d'avaluar la pèrdua de capacitat analítica dels sensors associada al procés d'adsorció molecular i cel·lular, després de cada incubació es va realitzar un calibrat amb 4 solucions patró de pH (pH 6, 7 8 i 9) i es va determinar la sensibilitat dels sensors (Figura 5.1.8B).

Inicialment, la sensibilitat d'ambdós sensors és similar (al voltant de 50 mV / dec), i es mantenia pràcticament inalterada després de la primera incubació amb tampó fosfat. Les primeres diferències significatives entre sensors modificats amb membrana de fibroïna i no modificats apareixen després de la incubació amb albumina. Mentre els ISFETs de fibroïna no mostraven diferències significatives abans i després de la incubació amb albumina, el ISFETs no modificats presentaven una disminució molt important i significativa de sensibilitat. Aquesta variació, associada a l'adsorció inespecífica d'albumina en la superfície del sensor, es va corroborar mitjançant microscòpia. En la Figura 5.1.9A es mostren els canvis superficials després de la incubació amb albumina pels dos dispositius. S'observa com, mentre l'ISFET no modificat

presenta una gran quantitat de matèria adherida a la superfície, l'ISFET de fibroïna presenta una superfície més neta que suggereix una menor adhesió molecular, i per tant, una certa resistència al *biofouling*.

La disminució de sensibilitat després de la incubació amb la suspensió bacteriana és evident en els dos casos i ve justificada considerant l'elevada adhesió de bactèries en la superfície sensora en els dos casos. Aquesta justificació es va confirmar mitjançant microscòpia òptica i electrònica (Figura 5.1.9B i C), on la presència de bacteris adherits era evident en els dos casos.

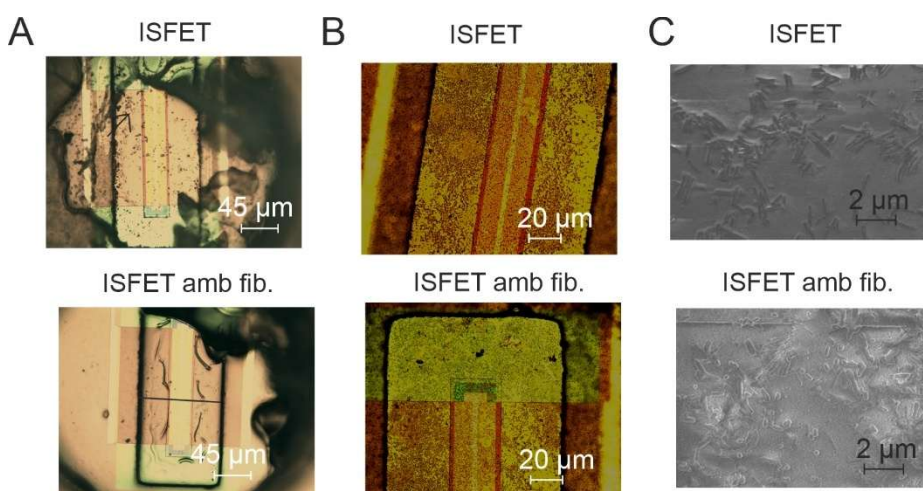


Figura 5.1.9: Estudis de *biofouling* 2. (A) Imatges òptiques dels ISFETs després del seguiment d'una alta concentració d'albúmina. (B) Imatges òptiques dels ISFETs després del seguiment d'una solució d'*E. coli* a alta concentració. (C) Imatges SEM dels ISFETs després del seguiment d'una solució d'*E. coli* a alta concentració.

Els resultats generals suggereixen que els ISFETs recoberts de fibroïna de seda ofereixen una millor resistència a l'adhesió inespecífica, mantenint el rendiment del sensor durant períodes més llargs en comparació amb els ISFETs no modificats.

5.1.4. Mesures discretes de pH en mostres de cultiu cel·lular

La determinació puntual del pH amb ISFETs modificats i sense modificar es va dur a terme en intervals de temps discrets per a tres sistemes biològics: cultiu de neuroblastoma SK-N-SH (NB), neurones de l'hipocamp i cèl·lules neuronals GT1-7. Els cultius es van estudiar amb diferents tractaments farmacològics, incloent; agents proliferatius i anti-proliferatius.

En el cultiu de neuroblastoma, les mesures de pH es van realitzar després d'un període d'incubació de tres dies. Es va extreure una alíquota (500 µl) i es va analitzar amb els diferents tipus d'ISFETs (Figura 5.1.10A). Els resultats es van comparar amb mostres de medi sense cèl·lules incubades en les mateixes condicions que les anteriors. Tant en les mostres control (sense cèl·lules) com en les mostres amb cèl·lules es va observar una acidificació del medi. No obstant, l'acidificació en les mostres amb cèl·lules era significativament més gran degut a l'acidificació metabòlica per l'acumulació de subproductes àcids [227]. En comparar els dos tipus d'ISFET, es va observar que les variacions de pH en els dos casos eren similars (6,9 vs 6,7, en el cas del cultiu amb cèl·lules per ISFETs no modificats i modificats respectivament), confirmant el rendiment comparable dels dos tipus de sensors.

En els experiments amb neurones de l'hipocamp, es va comparar l'acidificació d'aquestes cèl·lules amb i sense l'aplicació de l'inhibidor mitòtic FUDR/uridina, un compost anti-proliferatiu que redueix el creixement glial [228]. Els resultats obtinguts amb ambdós tipus d'ISFET eren novament coincidents i coherents amb les condicions de la mesura: mentre les mostres incubades durant tres dies amb cèl·lules mostraven una certa acidificació, les mostres incubades amb l'anti-

proliferatiu presentaven una menor acidificació deguda a la inhibició de la proliferació (Figura 5.1.10B).

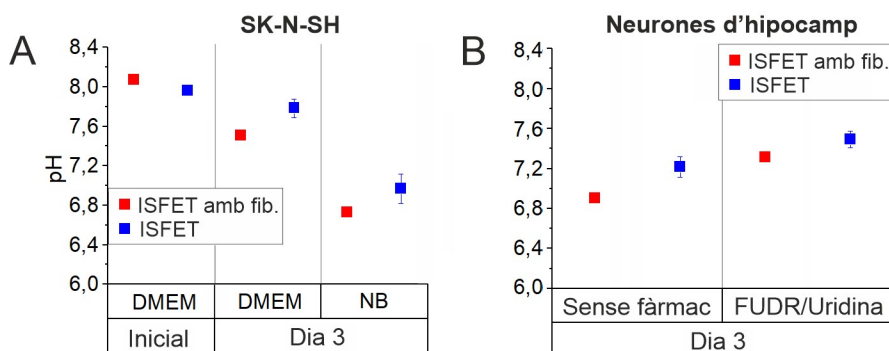


Figura 5.1.10: Mesures discontinües amb cultius cel·lulars 1. (A) Mesura discreta del pH dels cultius de neuroblastoma inicialment i després del 3r dia. (B) Mesura discreta del pH de les neurones de l'hipocamp després del 3r dia en condicions normals i amb l'inhibidor mitòtic FUDR/uridina.

El tercer experiment, realitzat amb cèl·lules neuronals GT1-7, presentava quatre diferències principals respecte els anteriors. En primer lloc, en comptes d'alíquotes de 500 µl es van analitzar alíquotes de 350 µl per validar la capacitat del sensor de mesurar volums més petits de mostra. Aquesta reducció de volum feia impossible validar els valors de pH amb un elèctrode de vidre convencional i, per aquest motiu, es va emprar el vermell de fenol present en el medi de cultiu com a mètode comparatiu de referència. El vermell de fenol, un indicador de pH comú en medis de cultiu cel·lular, proporcionava valors d'absorbància a 559 nm, que es poden correlacionar directament amb els canvis de pH del medi un cop interpolats en la recta de regressió corresponent (Figura 5.1.11A).. La corba de calibratge representada a la Figura 5.1.11B mostrava que la intensitat d'absorció a 559 nm era linealment proporcional al pH en el rang de 6,6 a 8,6 unitats de pH,

corresponent al rang d'interès en l'experiment. L'ajust lineal va mostrar una pendent de $0,141 \pm 0,005$ i una intersecció de $-0,93 \pm 0,04$.

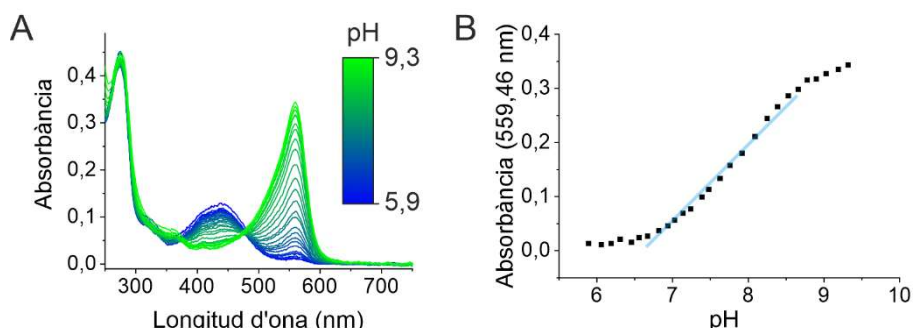


Figura 5.1.11: Gràfic de calibratge per a la mesura òptica del pH. (A) Espectre d'absorbància de vermell fenol en medi entre un rang de pH (5,8 a 9,3) de solucions amb vermell de fenol (B) Corba de calibratge per al pic a 559,46 nm.

La tercera i la quarta diferències en aquest experiment impliquen el procediment experimental emprat. En primer lloc, mentre en l'anterior experiment el cultiu es mesurava una sola vegada després de 3 dies d'incubació, en aquest experiment es mesurava dos cops: després de 3 i 7 dies d'incubació. La darrera variació tenia a veure amb les condicions del cultiu, ja que aquesta vegada, a part del propi cultiu, es va analitzar l'efecte de dos fàrmacs, l'inhibidor mitòtic FUDR/uridina i haloperidol, un agent proliferatiu. El pH es va mesurar mitjançant ISFETs amb fibroïna, ISFETs descoberts i amb vermell de fenol després de 3 i 7 dies d'incubació.

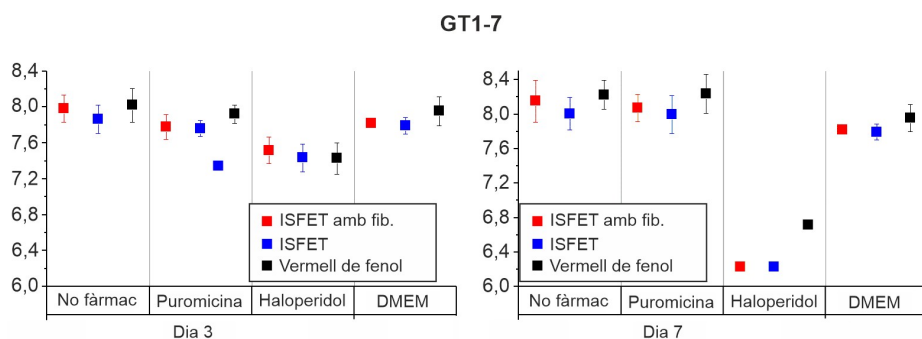


Figura 5.1.12: Mesures discontinuïes amb cultius cel·lulars 2. Mesures discretes de pH en cultius de cèl·lules GT1-7 amb inhibidor de la síntesi de proteïnes puromicina i l'agent pro-proliferant haloperidol. Les mesures es van fer amb vermell fenol (en negre), ISFET de fibroïna (vermell) i ISFET no modificats (blau). El primer gràfic correspon al tercer dia i el segon al setè dia d'incubació.

Després de 3 dies d'incubació, només les mostres tractades amb l'agent haloperidol van mostrar una reducció significativa del valor del pH (pH 7,6), mentre que la resta de mostres mostraven valors que no diferien significativament del valor obtingut amb el medi de cultiu inicial, indicatiu d'una major activitat metabòlica que va provocar més acidificació del medi (Figura 5.1.12). És important remarcar que aquestes diferències es van obtenir amb els tres tipus de sensors emprats, i que no es van detectar diferències significatives entre ells en cap de les condicions analitzades.

En les mesures realitzades al cap de 7 dies, les mostres no tractades amb haloperidol no van mostrar cap canvi significatiu en el pH en cap dels sensors emprats. En canvi, en les cèl·lules tractades amb l'haloperidol, l'activitat metabòlica es va accentuar significativament, assolint valors de pH de 6,2 amb els ISFETs i un pH de 6,6 amb el vermell de fenol. Aquesta diferència significativa de valors es va associar a la incapacitat de l'indicador de pH vermell de fenol de donar

valors reals per sota d'un pH de 6,8. Aquest fet posa en valor la capacitat analítica dels ISFETs, capaços de proporcionar valor molt precisos en un rang lineal molt més ampli que els indicadors de pH.

En general, els resultats obtinguts van demostrar la capacitat consistent dels ISFET, tant dels modificats amb fibroïna i com els no modificats, per proporcionar valors acurats i precisos de pH en mesures discretes de medis de cultiu cel·lular. És important destacar que el temps de contacte dels sensors amb el medi era molt curt, el que minimitzava els problemes associats a la deriva de la senyal del sensor i a l'adsorció molecular de substàncies presents en el medi.

5.1.5. Monitoritzacions en línia del pH en sistemes de cultiu cel·lular

En la monitorització contínua del pH de cultius cel·lulars, es va emprar el sistema fluídric descrit a l'apartat 4.2.1.1 de la secció de Materials i Mètodes, i il·lustrat a la Figura 4.2.10 de la mateixa secció. El sistema era un circuit tancat en recirculació on el medi de cultius passava per la cambra de cultiu, on hi havia les cèl·lules proliferant; després el medi circulava per la càmera de mesura òptica, on es mesurava el pH a través del canvi de color de l'indicador de pH, i després per la cambra de mesura potenciomètrica que contenia sis ISFETs, tres modificats i tres no modificats. Posteriorment, i amb l'ajuda de la bomba peristàltica, el medi tornava novament a la cambra de cultiu en un cicle que es repetia de forma contínua a un flux de 10 µl/min.

Per obtenir valors de pH precisos, es van corregir les dades en brut dels ISFETs per compensar la deriva. Els valors de potencial es van transformar a valors de pH mitjançant una corba de calibratge obtinguda prèviament per cadascun dels ISFETs emprats. Les caigudes anòmales de potencial degudes a interferències elèctriques es van corregir

digitalment mitjançant un recalibratge dels sensors. Tots els ISFETs sense funcionalitzar van ser condicionats durant 48 hores abans de la seva utilització per estabilitzar la seva resposta, assegurant un rendiment fiable i consistent durant els experiments (Figura 5.1.13).

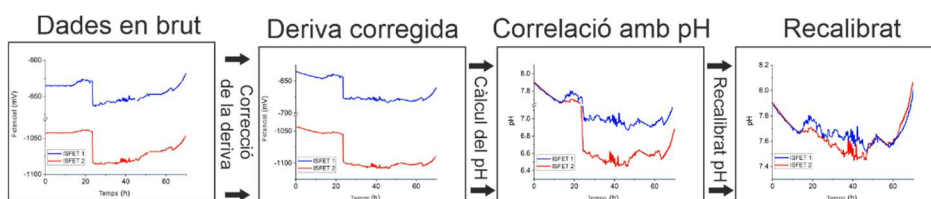


Figura 5.1.13: Tractament del senyal de la monitorització del cultiu de ronyó (HEK293T) amb ISFETs. Tractament del senyal per obtenir els valors de pH mesurats pels ISFET, consistent en: correcció de deriva, càlcul del pH i recalibratge del pH.

En aquest estudi es van realitzar dos experiments per valorar la capacitat dels ISFETs de fer seguiments llargs de les variacions de pH. En ambdós casos es van fer servir cèl·lules HEK293T de ronyó ja que presentaven un metabolisme molt més actiu que les neurones.

En el primer experiment les cèl·lules es van monitoritzar durant 70 hores de forma contínua i sense fàrmacs (Figura 5.1.14A). Els tres sistemes de mesura utilitzats per determinar el pH (ISFETs modificats, no modificats i el vermell de fenol) mostraven un comportament similar al llarg de l'experiment. En les primeres 45 hores d'incubació, es va registrar una caiguda del pH de 7,9 a 7,5, que es va associar a l'acidificació del medi deguda a l'activitat metabòlica del cultiu. De les 45 a les 70 hores es va registrar un increment de pH que no ha pogut associar-se a cap fenomen biològic, malgrat ser consistent amb els tres sistemes de mesura emprats.

Malgrat les tendències observades eren similars, els valors obtinguts presentaven diferències importants, sobretot després de llargs períodes

de monitorització. Els valors proporcionats pels tres sistemes de mesura de pH eren comparables i no presentaven diferències significatives durant les 8 primeres hores d'experiment. Els coeficients segons la correlació de Pearson eren propers a la unitat tant pels ISFETs modificat com no modificats quan es comparen amb el vermell fenol (Figura 5.1.14B), confirmant la fiabilitat analítica dels sensors en els estadis inicials de mesura.

No obstant, després de 8 hores d'ús continu (Figura 5.1.14C), només els ISFET modificats amb fibroïna van mantenir una bona correlació amb el mètode òptic (pendent = $0,93 \pm 0,02$ i índex de regressió = 0,94), permetent una mesura acurada i precisa durant les 70 hores d'assaig, mentre que els ISFETs no modificats van perdre la bona correlació inicial, proporcionant valors molt allunyats de la unitat ($0,53 \pm 0,02$ de pendent) que indicava una pèrdua de la seva capacitat analítica.

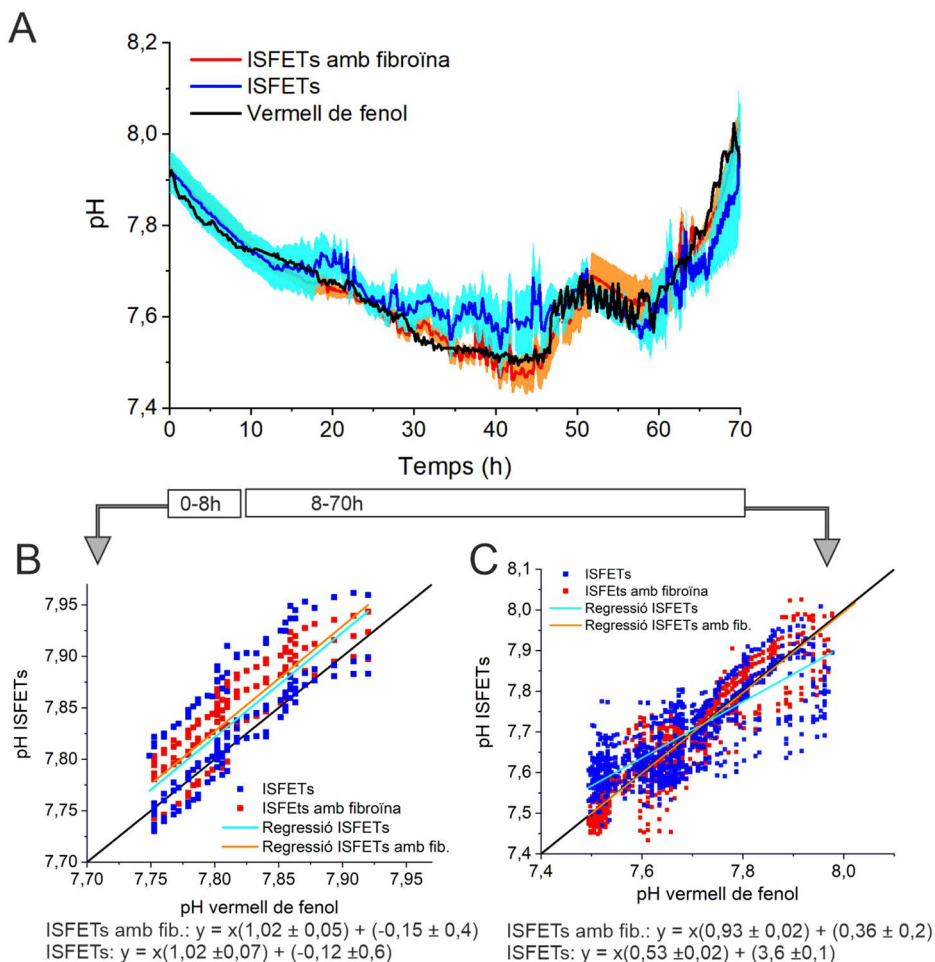


Figura 5.1.14: Monitoratge de pH durant 70 hores. (A) pH mesurat amb ISFET amb fibroïna, sense i amb vermell de fenol d'un cultiu HEK293T. (B)

Correlació de Pearson que compara les mesures de pH amb la espectrofotometria del vermell de fenol i els dos tipus d'ISFETs de 0 a 8 hores de l'experiment. (C) Correlació de Pearson que compara mesures de pH amb espectrofotometria del vermell de fenol i els ISFETs de 8 a 70 hores.

En el segon monitoratge a llarg termini, es va mesurar el pH durant 180 hores al llarg de 2 cultius consecutius de cèl·lules HEK293T (Figura 5.1.14). El procediment experimental consistia en inocular les cèl·lules

en la cambra de cultiu, les quals prèviament van ser incubades durant 24 hores. Posteriorment, la cambra de cultiu es connectava al sistema fluídric i es realitzava un seguiment continu del pH del medi.

Per emular el que seria un estudi farmacològic convencional, al cap de 46 hores de proliferació es va afegir l'agent pro-proliferatiu d'haloperidol (10 μ M) i es va estudiar el seu efecte en el metabolisme cel·lular. Després de l'addició, el cultiu es va monitoritzar durant gairebé 80 hores més (121 h). Un cop finalitzat l'experiment farmacològic, i sense calibrar ni netejar els sensors integrats en les cambres de mesura, es va canviar la cambra de cultiu per un segon cultiu fresc (prèviament incubat 24h per garantir l'adhesió cel·lular) i es va estudiar el canvi de pH durant 40 hores més (180 h). Tal i com s'havia realitzat en l'experiment anterior, els resultats proporcionats pels ISFETs (modificats i no modificats) es van comparar amb els obtinguts mitjançant el sistema espectrofotomètric que monitoritzava el canvi de color de l'indicador de pH vermell de fenol, que es va fer servir com a mètode de referència. Les dades proporcionades pels dispositius es van analitzar mitjançant la correlació de Pearson i l'índex de Willmott en tres intervals temporals: de 0–46 h (Figura 5.1.14B), 46–120 h (Figura 5.1.14C) i 120–165 h (Figura 5.1.14D). Els valors entre 165 i 180 h no es van considerar ja que contenien valors de pH que quedaven fora del rang lineal del vermell de fenol.

Durant la primera fase entre (de 0 a 46 h), es va observar una acidificació progressiva del medi, semblant a la que s'havia observat en els experiments anteriors i associada a causada de l'activitat metabòlica del cultiu. Els tres sensors mostraven una tendència similar. Tot i això, la diferència entre els ISFETs modificats i no modificats era evident, especialment a partir de les 8-10 hores de funcionament.

Aquesta discrepància es va fer evident quan es comparaven les correlacions de Pearson dels dispositius, on els ISFETs amb fibroïna presentaven valors de pendent lleugerament més propers a la unitat (1,14) que els ISFETs no modificats (0,80). També l'índex de Willmott confirmava la millor correlació dels valors dels ISFETs modificats, amb un valor de 0,97 respecte els no modificats que presentaven un valor de 0,8.

Malgrat l'addició d'un agent pro-proliferatiu, el valor de pH registrat pels 3 sensors pràcticament no varia entre les 46 i 120 h, probablement per mort cel·lular en arribar a confluència, ja que s'observava poca adherència de les cèl·lules amb el microscopi. Els valors proporcionats per l'ISFET no modificat s'allunyaven molt dels del mètode de referència, el que queda ben reflexat en uns valors molt allunyats de la unitat tant en la correlació de Pearson (-0,09), com amb l'índex de Willmott (0,17). Per altra banda, els ISFETs amb fibroïna proporcionaven resultats molt més similars als del mètode de referència, amb un valor de correlació de Pearson de 0,71 i un índex de Willmott de 0,93.

El nou cultiu cel·lular analitzat entre els temps 120 i 165 h estava plenament actiu i va produir canvis de pH detectables similars als observat en la primera etapa de l'experiment. Els canvis es van detectar clarament amb l'ISFET modificat i amb el mètode de referència, però no va ser possible detectar-lo amb els ISFETs no modificats. Els ISFETs no modificats presentaven pendents gairebé nuls (-0,02) i baixos índexs de Willmott (-0,49) que evidenciaven una pèrdua completa de correlació amb el mètode de referència, probablement per una elevada adhesió molecular produïda al llarg de l'experiment.

Les correlacions obtingudes entre els ISFETs amb fibroïna i el mètode de referència van ser novament molt bones (1,02 en la pendent de la correlació de Pearson i 0,92 en l'índex de Willmott) sense necessitat de neteja ni recalibració del dispositiu sensor durant les 180 hores de mesura.

En resum, aquests resultats validen l'ús dels ISFETs funcionalitzats amb fibroïna com a eines altament estables i robustes per a la monitorització prolongada del pH en matrius complexes com són els medis de cultiu cel·lular, mantenint una forta correlació amb els mètodes de referència i superant clarament els sensors no recoberts en termes d'exactitud i fiabilitat. La membrana de fibroïna protegeix eficaçment la superfície del sensor dels processos d'adhesió molecular i cel·lular i estableix el *drift*, donant lloc a mesures de pH més estables i precises durant períodes prolongats.

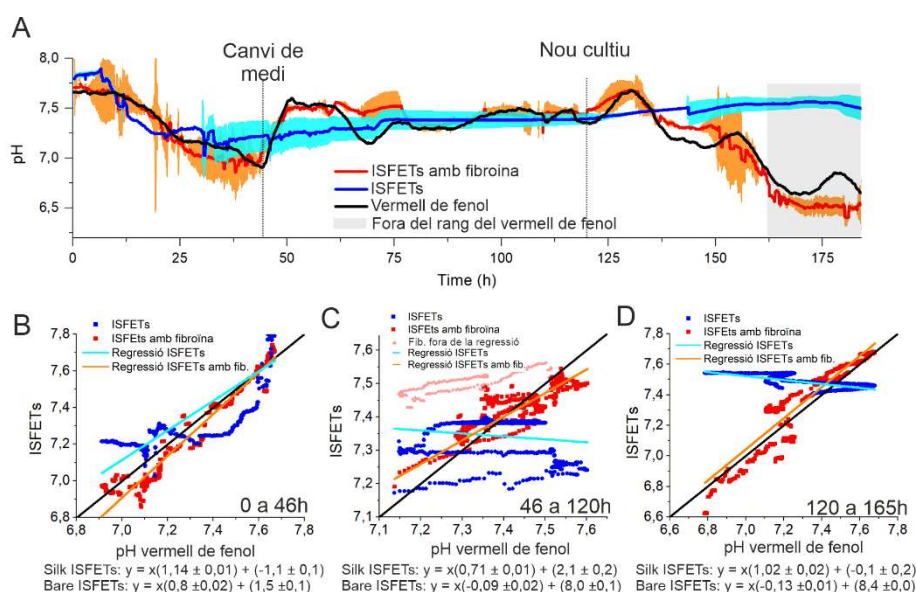


Figura 5.1.15: Monitoratge a llarg termini del pH en cultius cel·lulars amb ISFETs. (A) Evolució del pH durant 180 hores. (B–D) Gràfics de correlació de Pearson entre les mesures d'ISFETs i el pH estimat amb vermell de fenol per tres períodes: (B) de 0 a 46 h, (C) de 46 a 120 h, i (D) de 120 a 165 h.

**5.2. Sensors
amperomètrics
enzimàtics
funcionalitzats amb
fibroïna**

Els resultats d'aquest capítol s'han realitzat amb col·laboració amb J. D. Urbano, F. Perdigones, C. Aracil, J. M. Quero de la US i M. Perez, A. C. Reguera, R. Rodríguez-Rodríguez de la UIC i han donat lloc a 2 publicacions (Silk based enzymatic biosensor with a superior stability for long-term amperometric glucose monitoring in cell cultures i Nanoporous silk films with capillary action and size-exclusion capacity for sensitive glucose determination in whole blood) i 2 contribucions a congrés (EPoSS, 2022; XXVII TMSB, 2023).

Introducció

Els cultius cel·lulars són eines imprescindibles en les primeres fases de desenvolupament farmacològic [229], [230], toxicologia [231] i modelització de malalties [232], ja que permeten estudiar de manera controlada les respostes cel·lulars a fàrmacs, contaminants ambientals i altres agents químics. Entre els paràmetres bioquímics clau, la glucosa és especialment crítica: actua com a principal font energètica en els medis de cultiu de cèl·lules de mamífer, i les seves fluctuacions alteren profundament la fisiologia cel·lular [233]. Concentracions elevades poden induir apoptosi [234], [235], [236], mentre que nivells baixos provoquen retard del creixement [237] i resultats experimentals esbiaixats [238], [239]. Per això, el monitoratge continu de glucosa és indispensable, sobretot en assaigs de llarga durada, per assegurar la viabilitat, mantenir la funció metabòlica i garantir la reproductibilitat [240].

Els biosensors amperomètrics enzimàtics són la tecnologia més utilitzada per a la detecció contínua de glucosa. Aprofiten l'activitat catalítica de la glucosa oxidasa (GOx), que oxida la glucosa a gluconolactona generant peròxid d'hidrogen [241]. El peròxid pot reaccionar amb un mediador redox com la 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) [242] o bé ser oxidat directament a l'elèctrode, produint un corrent proporcional a la concentració de glucosa [243]. Tanmateix, els dispositius convencionals pateixen desnaturalització enzimàtica [244], pèrdua de mediador [245] i fouling de l'elèctrode [246], fets que en limiten la vida operativa.

Els sistemes comercials de monitoratge continu de glucosa (CGM) dissenyats per al control de la diabetis han solucionat bona part d'aquests problemes. Els dispositius electro-enzimàtics d'un sol ús

Dexcom G6/G7 [247] i Abbott FreeStyle Libre [248] surten calibrats de fàbrica i funcionen durant aproximadament 10–15 dies. Per la seva banda, el dispositiu implantable Senseonics Eversense [249] utilitza un polímer fluorescent sense enzims que és mesurat per un transmissor òptic extern [250]; malgrat la companyia el publicita amb 12 mesos de durada [251], els estudis clínics només han demostrat una operativitat fiable d'uns 180 dies amb recalibració dues vegades al dia [252]. Aquesta estratègia evita la inestabilitat pròpia dels sensors basats en GOx, però ho fa a costa de la selectivitat molecular que ofereix el reconeixement enzimàtic.

Tot i la seva robustesa en el líquid intersticial subcutani, aquests CGMs no són adequats per a sistemes microfisiològics de cultiu cel·lular: presenten un encapsulat hermètic, estan certificats només per ambients amb poca càrrega proteica i es desconeix el seu comportament de fouling en medis rics proteïnes com és el sèrum [201]. L'adaptació directa a organ-on-a-chip o plataformes d'alt rendiment és, per tant, problemàtica, fet que ha incentivat la recerca de biosensors miniaturitzats i optimitzats per a cultius.

Diverses línies de treball han abordat aquesta necessitat. Donhorn et al. [253] van integrar sensors amperomètrics de glucosa, oxigen i lactat en un organ-on-a-chip i obtingueren estabilitat superior a una setmana en flux dinàmic; tanmateix, el mètode es basava en la detecció de peròxid d'hidrogen, que requereix potencials alts i és susceptible a interferències electroactives. El grup GTQ va descriure anteriorment una plataforma microfluídica que utilitzava ferrocianur com a mediador, amb bones prestacions [254]. Tot i això, mentre que el sistema permetia mesures reproduïbles durant el cribratge de fàrmacs amb

cultius de fibroblasts, requeria un recalibratge entre experiments, cosa que complicava el disseny microfluídic.

Degut a totes aquestes limitacions, en aquest capítol es proposa una estratègia que combina la biocompatibilitat i estabilitat de la fibroïna de seda amb l'especificitat de GOx. La fibroïna, proteïna estructural extreta del cuc de seda *Bombyx mori*, forma pel·lícules nanoporoses i hidratades després d'un procés d'anuealing aquós. Aquesta matriu actua com a barrera d'exclusió molecular, protegeix l'enzim de la desnaturalització, redueix la pèrdua de TMB i minimitza el fouling de l'elèctrode. El grup GTQ ja havia demostrat que enzims immobilitzats en fibroïna mantenen activitat >8 mesos a temperatura ambient [170] i que el drift del sensor disminueix significativament [255].

En aquest capítol es descriu de manera detallada el procés d'identificació del mediador òptim, seguit de l'optimització sistemàtica (concentració de GOx/TMB, potencial de treball i condicions de flux) i la caracterització electroquímica i funcional d'un biosensor amperomètric de glucosa que co-immobilitza GOx i TMB dins d'una membrana de fibroïna cristal·litzada. Finalment, el dispositiu s'integra en un sistema microfisiològic i s'avalua amb cultius Neuro-2a sota tractament amb AICAR. Els resultats mostren una monitorització estable i sense recalibració durant >90 hores, amb alta correlació respecte als assaigs colorimètrics estàndard.

En conjunt, el sensor desenvolupat constitueix una solució duradora, miniaturitzada i escalable per al monitoratge continu de glucosa in vitro, amb aplicacions potencials en toxicologia, bioprocessos, vigilància ambiental i tecnologies organ-on-a-chip.

5.2.1. Optimització de la membrana del sensor

5.2.1.1. Selecció del mediador

L'objectiu d'aquest estudi fou identificar un mediador capaç de facilitar una transferència eficient d'electrons entre la glucosa oxidasa (GOx) i un elèctrode, per al desenvolupament del sensor de glucosa. Un mediador adequat ha de presentar activitat redox reversible, estabilitat química i física, i una bona retenció dins la matriu selectiva de fibroïna al llarg del temps. Els mediadors avaluats en aquest treball van ser ferricianur (Fc), hidroquinona (HQ), fenantrenoquinona (PTQ), tetrafluorbenzoquinona (FBQ) i tetrametilbenzidina (TMB).

Cada mediador va ser analitzat considerant la seva compatibilitat amb el procés de cristal·lització de la fibroïna, la seva estabilitat en la matriu fibroïna i la seva sensibilitat, entesa com la seva resposta electroquímica.

Per tal de determinar la màxima capacitat de dopatge de la membrana (concentració màxima de mediador que permetia la cristal·lització de films de seda), es van preparar solucions aquoses de fibroïna (6% m/m) dopades amb 2,5%, 5%, 10%, 12,5%, 15%, 20% i 30% en pes de mediador.

La presència de FBQ provocava la gelificació immediata de la seda, el que impedia la formació de films cristal·lins, pel que aquest mediador es va descartar pel desenvolupament del biosensor. Aquest comportament es podria atribuir a interaccions entre la FBQ i la fibroïna, probablement afavorides per la formació accelerada de làmines β induïdes per interaccions hidrofòbiques i químiques.

La resta de medidors no produïen aquest efecte i es va poder determinar la seva concentració màxima de dopatge: 20% (m/m) per al ferricianur, 12,5% (m/m) per a la HQ, la BQ, la PTQ i la TMB.

Concentracions superiors resultaven en films inestables, amb esquerdes i fissures, que fins i tot en alguns casos es trencaven en manipular-los. Aquests efectes es van atribuir a una formació excessiva de làmines β , probablement induïda per interaccions hidrofòbiques entre el mediador i la fibroïna, la qual comprometia l'estabilitat general de la matriu.

Per avaluar l'estabilitat del mediador en la membrana, es van produir elèctrodes amperomètrics amb membranes de seda dopades amb el mediador que es van introduir en un sistema fluïdic que operava a un flux continu de PBS de 150 $\mu\text{l}/\text{min}$, realitzant 100 cicles consecutius de potencial en el rang de potencials òptim per a cada mediador. En el cas del ferricianur, es va observar un comportament reversible pel mediador immobilitzat en la membrana, similar del que s'obtenia en solució, amb pics d'oxidació i reducció a 0,28 V i 0,20 V (vs Ag/AgCl), respectivament (Figura 5.2.1). La intensitat del corrent dels pics disminuïa de manera significativa al cap de només 30 minuts de mesura, el que indica una pèrdua significativa de ferricianur de la matriu de fibroïna fins i tot després de curts temps de mesura. Aquesta baixa retenció del mediador en la membrana es va atribuir a la seva petita mida i a les interaccions febles que aquest podia establir amb els component de la matriu proteica.

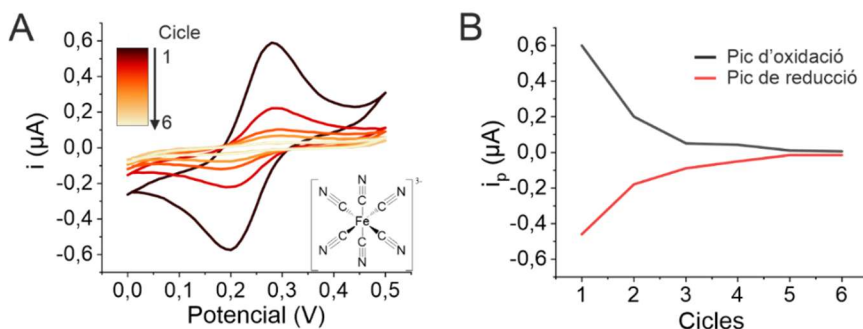


Figura 5.2.1: Estabilitat del ferricianur en films basats en fibroïna.

(A) Voltametria cíclica (CV) d'un elèctrode recobert amb un film de seda de fibroïna que conté ferricianur (10% m/m). Les mesures es van fer mentre es feia circular solució de PBS (150 μ l/min) durant 5 minuts entre cicles.

(B) Evolució dels corrents dels pics d'oxidació i reducció al llarg dels cicles de CV consecutius.

De forma similar, la HQ mostrava pics reversibles a 0,6 V (oxidació) i -0,13 V (reducció) vs. Ag/AgCl (Figura 5.2.2) que pràcticament desapareixien en menys de 45 minuts. Novament, aquest comportament es va associar a la petita mida i poca interacció del mediador amb els components de la matriu de la seda.

La fenantrenoquinona també va mostrar una retenció i estabilitat robustes. El seu comportament redox es va presentar un pic d'oxidació a 0,30 V i un de reducció a -0,37 V, amb els corrents de pic estabilitzant-se després d'un augment inicial durant els primers deu cicles de CV. La seva major mida molecular i conjugació estesa probablement afavoreixen les interaccions amb la matriu de fibroïna, contribuint a la seva retenció i estabilitat prolongades.

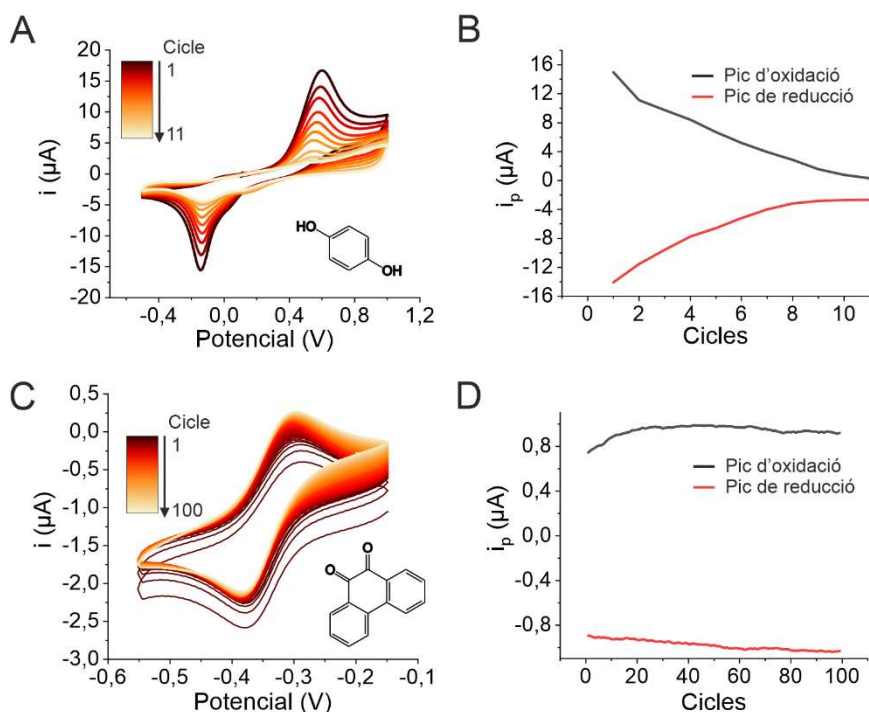


Figura 5.2.2: Estabilitat de quinones en films basats en fibroïna. (A, C): Voltametria cíclica (CV) d'electrodes recoberts amb films de seda de fibroïna que contenen hidroquinona (A), o fenantrenoquinona (C) al 10% p/p. La solució de PBS (150 μl/s) es va fer circular pel sensor durant 5 minuts entre cicles. (B, D): Evolució corresponent dels corrents de pic d'oxidació i reducció per a la hidroquinona (B), la fenantrenoquinona (D) al llarg dels cicles de CV.

La TMB va mostrar una bona retenció (Figura 5.2.3), amb pics redox situats a 0,4 V (oxidació) i 0,3 V (reducció). Tot i que els corrents de pic van disminuir durant els tres primers cicles, posteriorment es van estabilitzar, indicant una retenció de la TMB dins la matriu de fibroïna.

A partir d'aquests resultats, es conclou que la fenantrenoquinona i la TMB són els mediadors més adequats per aplicacions de llarga

durada en films de fibroïna. Tots tres van mostrar un comportament redox estable i reversible, així com una bona retenció dins la matriu.

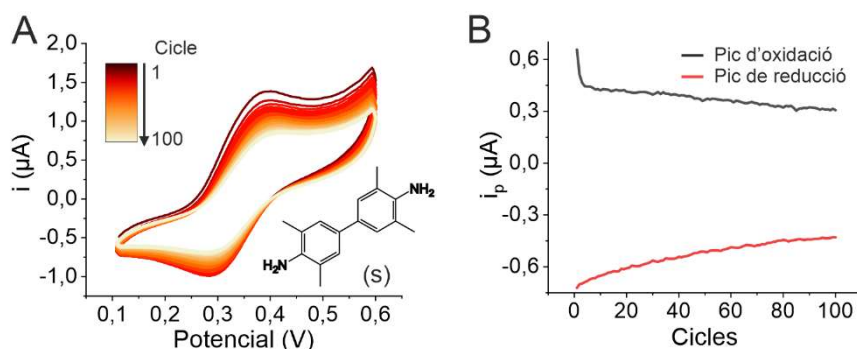


Figura 5.2.3: Estabilitat de la TMB en films basats en fibroïna. (A) Voltametria cíclica (CV) d'elèctrodes recoberts amb films de seda de fibroïna que contenen TMB en la seva formulació al 10% p/p. Es va fer circular PBS (150 μ l/s) pel sensor durant 5 minuts entre cicles. (B) Evolució dels corrents de pic d'oxidació i reducció per a la TMB al llarg dels cicles successius.

Finalment, es va seleccionar la TMB com a mediador per acoblar amb la glucosa oxidasa en la fabricació del sensor de glucosa. Aquesta elecció es fonamenta en la seva compatibilitat demostrada amb sistemes enzimàtics, el seu comportament redox estable, i la seva retenció efectiva dins la matriu de fibroïna, fet que la converteix en una candidata prometedora per al desenvolupament d'una plataforma de detecció de glucosa fiable i duradora.

5.2.1.2. Caracterització del mediador

La resposta del mediador es va estudiar en diferents condicions experimentals. En primer lloc, es va analitzar la influència del pH en la resposta electroquímica del mediador. A valors propers a pH 7, el

TMB, que es trobava majoritàriament en forma neutra, mostrava dos processos de transferència d'electrons independents, amb dos pics d'oxidació a 0,47 i 0,32 V, i dos pics de reducció a 0,43 V i 0,28 V (Figura 5.2.4, gràfics A i B). La primera etapa corresponia als processos de transferència electrònica entre TMB que s'oxidava a TMB^+ , mentre que la segona corresponia a la transferència entre el TMB^+ i el TMB^{2+} . La simetria i estabilitat dels pics indicava que la reacció era eficient, ràpida i reversible a pH fisiològic.

Malgrat a pHs 6,25 i 7,3, la forma neutra continua sent la majoritària, a aquests valors de pH s'observen petits desplaçaments en la posició de pics que indiquen que el pH podia modular lleugerament la dinàmica del procés de transferència d'electrons. Aquesta sensibilitat del potencial a petites variacions de pH podria afectar la resposta amperomètrica del sensor en aplicacions reals, especialment en entorns cel·lulars on el pH podia disminuir significativament degut a l'activitat metabòlica. Així doncs, tot i que el sistema mantenia un comportament estable prop del pH fisiològic, la influència del pH en les propietats electroquímiques del mediador redox podria influir la sensibilitat del sensor i s'hauria de tenir en compte.

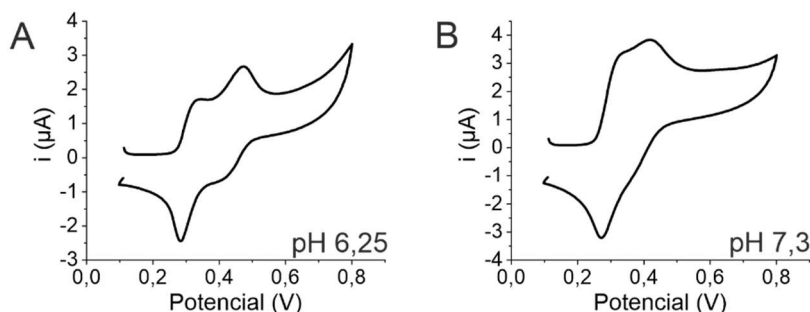


Figura 5.2.4: Voltametria cíclica del TMB a diferents valors de pH i comportament redox dependent de la protonació. (A) pH 6,25; (B) pH 7,3.

La caracterització electroquímica del TMB en presència de glucosa i glucosa oxidasa (GOx) es va dur a terme amb l'objectiu de demostrar l'activitat catalítica de l'enzim i el seu acoblament amb el TMB com a mediador. Es van realitzar experiments de voltametria cíclica sota quatre condicions diferents utilitzant un elèctrode polit sense modificacions: (1) amb solució tampó fosfatada salina (PBS) sola, (2) PBS amb TMB (2,5 mM), (3) PBS amb TMB i glucosa (14 mM), i (4) PBS amb TMB, glucosa i GOx (82 $\mu\text{g/ml}$). Els voltamogrames resultants es presenten a la Figura 5.2.5.

En absència de TMB (condició 1), el voltamograma en PBS no mostrava cap resposta de corrent significativa, confirmant que el tampó no contenia molècules amb propietats redox en el rang de mesura. Quan es va introduir TMB en el sistema (condició 2), es van observar pics d'oxidació i reducció característics a potencials d'aproximadament 0,3 V i 0,45 V vs. Ag/AgCl. Aquests pics corresponen al procés redox reversible del TMB, implicant la seva

oxidació i reducció posterior a l'estat original. L'addició de glucosa (condició 3) no produïa cap canvi significatiu en el voltagrama.

La introducció de GOx al sistema, juntament amb glucosa i TMB, va provocar un augment substancial de la intensitat de corrent, especialment a potencials més alts. Aquest increment marcat s'atribueix a l'oxidació catalítica de la glucosa per part de la GOx. Aquest redueix el TMB oxidat, facilitant un cicle redox ràpid i sostingut amb transferència d'electrons cap a l'elèctrode. Aquest fenomen es reflecteix en un pic catalític pronunciat al voltagrama, que serveix com a prova clara de l'eficient acoblament de la reacció enzimàtica amb el TMB com a mediador.

El pic catalític observat en presència de GOx subratlla la capacitat de l'enzim per augmentar significativament la resposta electroquímica, afavorint així una detecció sensible de la glucosa.

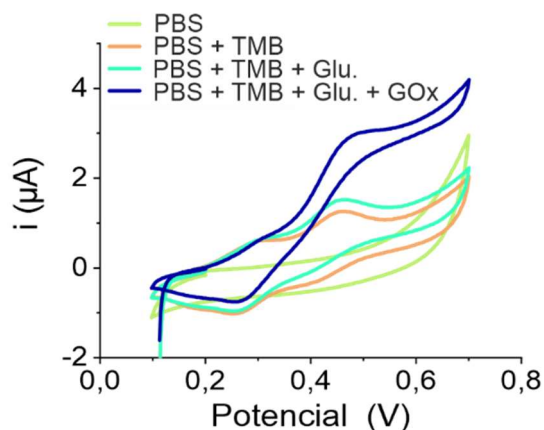


Figura 5.2.5: Pic catalític de TMB i GOx. Resposta electroquímica del TMB sota addicions seqüencials de glucosa i GOx.

5.2.2. Optimització de la composició de la membrana

Per optimitzar la composició de la matriu de fibroïna de seda per al sensor de glucosa, es van estudiar sistemàticament les concentracions i proporcions de l'enzim (GOx) i del mediador (TMB). Per garantir l'estabilitat i durabilitat de la matriu, els experiments d'optimització es van limitar a concentracions màximes del 10% de TMB i el 6% de Gox ja que per sobre d'aquests valors no es podia formar el film .

El mapa de sensibilitat (Figura 5.2.6A) mostra la variació en el valor de sensibilitat del sensor en funció de la variació de les concentracions i proporcions dels dos components. S'observa com les sensibilitats més altes s'obtenien amb concentracions de GOx d'entre el 5 i el 6% i concentracions de TMB entre el 8 i el 10%, les més grans que es podien introduir en les membranes, que venien representades per les zones vermelles i grogues del mapa. A concentracions més baixes de TMB i GOx, així com a concentracions elevades de TMB combinades amb nivells baixos de Gox, la sensibilitat disminuïa significativament (zones blaves).

El mapa d'intersecció amb l'eix Y (Figura 5.2.6B) marcava que el corrent de base del sensor roman mínim a totes les condicions assajades.

El mapa del coeficient de correlació (R^2) (Figura 5.2.6C) proporcionava informació sobre la linealitat de la resposta del sensor dins del rang de concentració de glucosa de 0 a 5 mM. Es van observar que el coeficient de correlació era molt dependent de la concentració de TMB, i les correlacions més grans (zones vermelles) es van obtenir per concentracions de TMB elevades, d'entre el 6 i el 10%. No obstant, la concentració de GOx no influïa

significativament en el valor del coeficient de correlació i es van obtenir bons coeficients per varies concentracions de GOx.

Finalment, també es va estudiar el rang lineal del biosensor de glucosa en funció del percentatge de GOx incorporat a la matriu de fibroïna (Figura 5.2.6D), mantenint constant la concentració de mediador en la membrana (TMB 10% m/m).

Petites concentracions de GOx (0,1% en massa) presentaven rangs lineals fins a valor propers a 5 mM. L'increment de la concentració de GOx al 3% (m/m) produïa un augment en el rang lineal, que assolía valors de 8 mM. No obstant, en continuar augmentat la concentració de GOx fins al 6% (m/m), el rang lineal es tornava a reduir fins a un valor de 6 mM. Aquest resultat confirmava la relació entre la proporció GOx: TMB i el rang lineal del sensor, obtenint un valor òptim per la proporció.

Considerant els resultats obtinguts, es va fixar com a òptima la composició de la membrana que contenia un 10% de TMB i un 6% de GOx, el que representa una relació en massa de 5:3. Aquest equilibri proporciona la màxima sensibilitat, un corrent de base mínim, una forta linealitat i un rang de detecció adequat, fet que el feia idoni per a la detecció de glucosa.

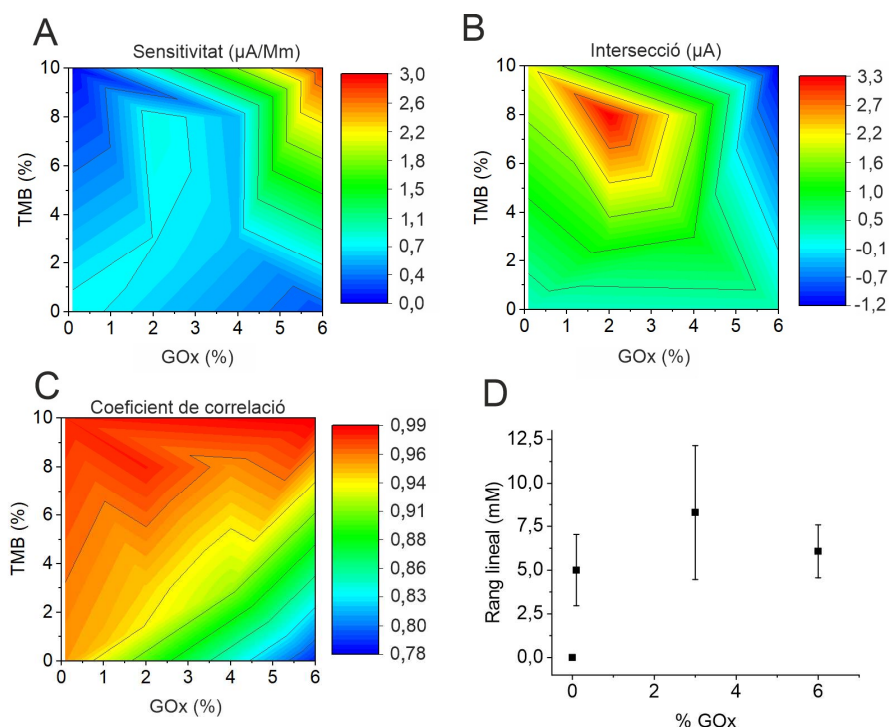


Figura 5.2.6: Optimització de la composició de la membrana: (A)

Mapa de sensibilitat per a diferents concentracions de TMB i GOx en la membrana del sensor. (B) Mapa de la intersecció amb l'eix Y per a diferents concentracions de TMB i GOx. (C) Mapa del coeficient de correlació per al rang de 0 a 5 mM en funció de les concentracions de TMB i GOx. (D) Rang lineal amb un coeficient de correlació mínim de 0,96 i una sensibilitat de 0,03 μA/mM per a xips amb membranes que contenen 10% de TMB i concentracions variables de GOx.

Un altre paràmetre que podia afectar la resposta del biosensor era el gruix de la membrana de seda. Per avaluar la seva influència en la resposta del biosensor, es van preparar biosensors dipositant diferent volums (1, 2, 4 i 8 μl) d'una solució que contenia un 4% de fibroïna de seda, un 6% de GOx i un 10% de TMB en la superfície

de l'elèctrode de treball, i es van assecar i cristal·litzar seguint el protocol detallat en materials i mètodes. Els gruixos resultants de les membranes van variar des de 1,4 μm (1 μl) fins a aproximadament 12 μm (8 μl). Tal i com es mostra a la Figura 5.2.7, el pic de corrent incrementava a mesura que augmentava el gruix de la membrana, degut a la major quantitat d'enzim i mediador immobilitzades en l'elèctrode. No obstant, la variabilitat de la mesura també augmentava amb el gruix de la membrana, pel es van escollir gruixos de 4 μm que corresponien a la deposició de 2 μl de mostra en la finestra de l'elèctrode de treball.

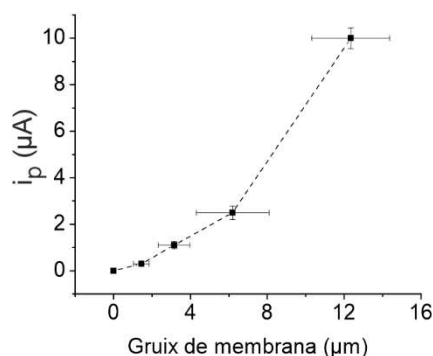


Figura 5.2.7: Estudi del gruix de membrana: Gruix de la membrana i pic de corrent obtingut per voltametria cíclica en xips amb diferents volums de deposició (0, 1, 2, 4 i 8 μl) d'una solució de 2% de fibroïna, 6% de GOx i 10% de TMB.

5.2.3. Anàlisi estructural, composicional i elèctric de les pel·lícules de fibroïna de seda en sensors enzimàtics

Les propietats estructurals i composicionals de les pel·lícules de fibroïna de seda van ser analitzades mitjançant espectroscòpia FTIR per estudiar les interaccions moleculars, la cristal·linitat i els efectes del dopatge químic i enzimàtic. La Figura 5.2.8 mostra els espectres

FTIR de pel·lícules de fibroïna en quatre estats diferents: fibroïna amorfa, fibroïna cristal·lina, fibroïna dopada amb GOx, i fibroïna dopada tant amb GOx com amb TMB. Les variacions espectrals entre aquestes mostres ofereixen informació sobre les modificacions estructurals induïdes per la cristal·lització i la incorporació de biomolècules.

Tots els espectres presenten una banda d'absorció àmplia centrada a 3300 cm^{-1} , corresponent a les vibracions d'estirament dels grups funcionals N–H i O–H, juntament amb pics a 2930 cm^{-1} i 2875 cm^{-1} atribuïts a modes d'estirament C–H (Figura 5.2.8A). La regió espectral entre 1800 i 400 cm^{-1} (Figura 5.2.8B) revela les diferències estructurals més significatives entre les mostres. La transició de fibroïna amorfa a cristal·lina es caracteritza per l'aparició d'un pic definit a 1619 cm^{-1} , característic de l'estructura de làmina β (β -sheet), absent en la forma amorfa. Per contra, el pic a 1643 cm^{-1} , present tant en la fibroïna amorfa com en la cristal·lina, s'associa a estructures alfa en espiral desordenada (*random coil*), indicant regions de desordre molecular.

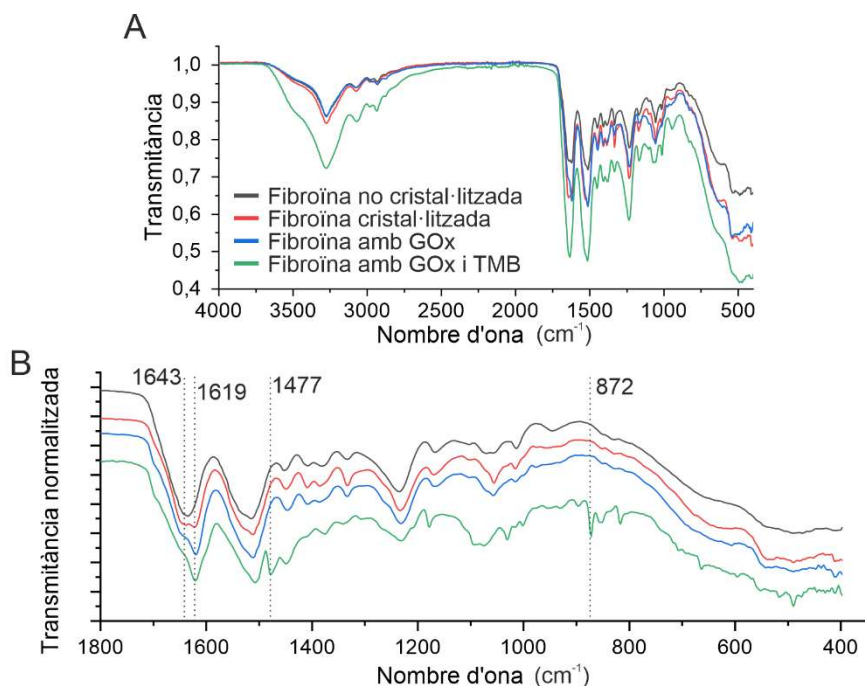


Figura 5.2.8: Espectres FTIR de pel·lícules de fibroïna en formes amorfa i cristal·lina, així com fibroïna dopada amb GOx i amb GOx + TMB. (A) Rang espectral complet mostrant les vibracions dels grups funcionals principals. (B) Regió expandida (1800–400 cm^{-1}).

El dopatge amb GOx i posteriorment amb TMB indueix modificacions espectrals addicionals, suggerint noves interaccions moleculars. La mostra de fibroïna que conté tant GOx com TMB mostra una intensificació del pic de làmina β a 1619 cm^{-1} , fet que indica una possible estabilització o reforç de les estructures ordenades després de la incorporació del TMB. A més, apareix un nou pic a 1477 cm^{-1} exclusivament en la mostra dopada amb GOx–TMB, confirmant la presència del TMB dins la matriu de fibroïna i suggerint que el compost roman químicament inalterat després de la seva integració.

Els desplaçaments en la posició dels pics posen de manifest reorganitzacions estructurals degudes al dopatge. Mentre que la fibroïna sense dopar i la dopada amb GOx mostren un pic a 1169 cm^{-1} , aquest es desplaça fins a 1177 cm^{-1} en la mostra GOx–TMB, indicant una reorganització subtil de la xarxa de fibroïna com a resposta a la incorporació del TMB. A la regió de nombres d'ona baixos, la fibroïna dopada amb GOx–TMB presenta nous pics a 872, 816, 662 i 490 cm^{-1} , absents en les altres mostres. Aquests senyals vibracionals únics es poden associar a interaccions específiques del TMB i a modificacions en l'estructura de la fibroïna causades per la seva presència conjunta amb GOx.

En conjunt, l'anàlisi FTIR confirma que la cristal·lització afavoreix la formació d'estructures de làmina β a les pel·lícules de fibroïna, mentre que la introducció de GOx i TMB provoca modificacions estructurals addicionals.

Les propietats estructurals de les pel·lícules de fibroïna de seda (SF) van ser analitzades mitjançant difracció de raigs X (XRD) per estudiar els canvis en la cristal·linitat després del dopatge enzimàtic i molecular (Figura 5.2.9). Es van examinar quatre mostres diferenciades: una membrana de fibroïna sense el pas final de cristal·lització (fibroïna no cristal·litzada), una membrana de fibroïna totalment cristal·litzada, una altra amb un 8% de glucosa oxidasa (GOx) i una altra amb un 8% de GOx i un 15% de TMB.

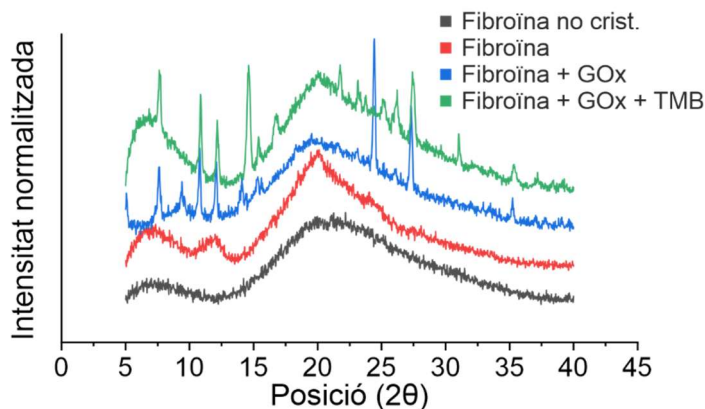


Figura 5.2.9: Difracció de Raigs X: Patrons de difracció de membranes de fibroïna de seda amb i sense glucosa oxidasa i TMB.

El patró de difracció de la membrana de fibroïna no cristal·litzada presenta un pic ample centrat al voltant de 21°, que pot correspondre a la superposició de dos pics solapats. Un cop cristal·litzada, aquest pic emergeix més definit, suggerint una transformació estructural. Aquests resultats són coherents amb estudis previs on s'han reportat pics de difracció de SF a 11,95° i 24° [256], associats a conformacions d'hèlix α .

Quan la fibroïna es dopa amb un 8% de GOx, apareixen nous pics nítids a 7,7°, 9,4°, 11°, 14,2°, 15,3°, 24,4°, 27,3° i 35°. Aquests pics estrets suggereixen que l'enzim pateix una cristal·lització parcial dins la matriu de fibroïna. L'aparició d'aquests senyals implica que la xarxa de fibroïna facilita l'estabilització de GOx en un estat semiordenat.

Es detecten modificacions estructurals addicionals quan s'introdueix un 15% de TMB al sistema de fibroïna-GOx. En aquesta mostra apareixen nous pics a 16,7°, 21,7°, 23,1°, 25,3°, 26,2° i 31°, indicant la cristal·lització del TMB dins la matriu de fibroïna. No obstant això,

alguns pics associats a GOx, particularment els de $9,4^\circ$ i $24,4^\circ$, desapareixen. Això suggereix que la presència de TMB altera l'organització estructural de GOx, possiblement afectant el seu empaquetament molecular o les interaccions dins l'esquelet de fibroïna. A més, el pic de difracció de les làmines β a $20,34^\circ$ esdevé més estret, demostrant que el dopatge amb TMB afavoreix una cristal·linitat més elevada. Aquests resultats posen de manifest la complexa interacció entre la fibroïna, el GOx i el TMB.

5.2.4. Optimització dels paràmetres de mesura

Optimització del potencial de treball

El potencial de treball òptim per al biosensor es va determinar realitzant calibrats a diferents potencials aplicats propers al pic del TMB (0,4 V, 0,45 V, 0,5 V i 0,6 V) i determinant la sensibilitat del sensor (pendent de la recta en el rang lineal) i el límit de detecció en cada cas (Figura 5.2.10). A potencials inferiors a 0,45 V, la sensibilitat del sensor es reduïa significativament, fet que limita la seva utilitat per a la detecció de glucosa. A potencials més elevats, com ara 0,6 V, proporcionaven una sensibilitat més alta ($0,097 \mu\text{A}/\text{mM}$) i un límit de detecció (LoD) més baix ($0,003 \text{ mM}$), tot i que també comporten un risc més gran d'interferències provinents de l'activitat electroquímica de fons. A 0,5 V, el sensor presenta una sensibilitat de $0,084 \mu\text{A}/\text{mM}$ i un LoD de $0,04 \text{ mM}$, especificacions similars a les obtingudes a 0,6 V.

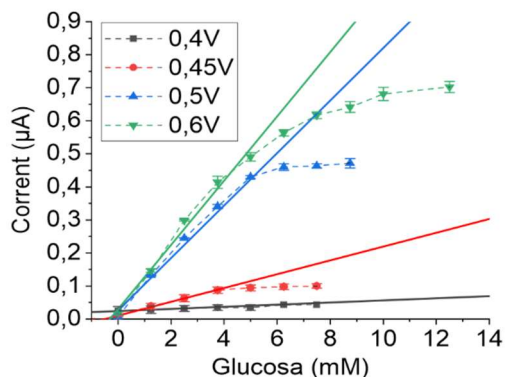


Figura 5.2.10: Optimització del potencial: Corbes de calibratge amb diferents potencials aplicats.

Per saber si el medi de cultiu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) podia afectar la mesura, es va caracteritzar el seu comportament electroquímic mitjançant voltametria cíclica en absència de glucosa (Figura 5.2.11). El corrent augmenta ràpidament a potencials a partir de 0,6 V, incrementant-se progressivament fins a 0,8 V. Aquest comportament suggereix la presència de processos electroquímics de fons, probablement relacionats amb la hidròlisi de l'aigua.

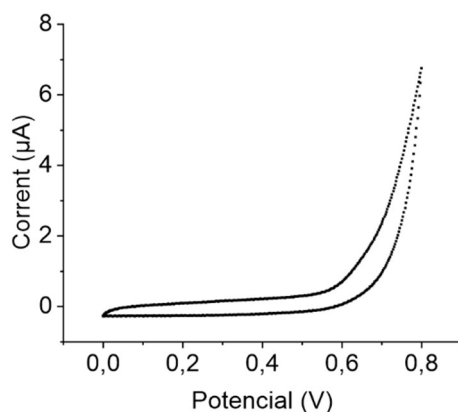


Figura 5.2.11: Voltametria cíclica del medi DMEM.

Tot i que a 0,6 V el sensor ofereix una sensibilitat més elevada, es va decidir fer les mesures a 0,5 V, on s'aconsegueix un millor equilibri entre sensibilitat i especificitat. A més, el coeficient de regressió de 0,99 per a la corba de calibratge dins el rang 0–5 mM de glucosa va confirmar la seva linealitat i fiabilitat per a la detecció de glucosa en medis cel·lulars. Aquest potencial garanteix una interferència mínima tot mantenint una bona sensibilitat, fet que el converteix en el potencial de treball més adequat per al monitoratge de glucosa en DMEM.

Estudi computacional i efecte del cabal sobre el rendiment del sensor

Un altre aspecte a tenir en compte en el cas de mesures amperomètriques en sistemes fluídics és l'efecte del cabal en la resposta del sensor. Aquest efecte es va estudiar computacionalment mitjançant simulacions amb COMSOL Multiphysics, i experimentalment amb el sistema fluídic descrit a la Figura 4.2.16.

A nivell computacional, les simulacions es van dur a terme en un sistema que emulava l'arquitectura del sensor en el sistema fluídic experimental per estudiar els mecanismes de transport i reacció que tenen lloc dins del sensor de glucosa. L'arquitectura considerava un elèctrode metàl·lic de 1 mm recobert amb una capa porosa (coeficient de difusió de $1 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ per a totes les espècies) que contenia els enzims i el mediador en una estructura fluídica que tenia una entrada, una sortida i un canal de 1 mm. En el canal es van estudiar els mecanismes de transport i reacció que tenien lloc

dins del sensor de glucosa (Figura 5.2.12). Per a fer-ho, es va considerar la llei de Michaelis Menten per a l'activitat enzimàtica.

$$R = v_{max} \frac{C_G}{K_m + C_G} \quad \text{Equació 5}$$

On R és la velocitat de reacció, v_{max} és la velocitat màxima de la reacció enzimàtica, C_G és la concentració de glucosa i K_m és la constant de Michaelis.

En la simulació, la solució de glucosa (5mM) s'introduïa al canal, el que generava un fort gradient de concentració a l'entrada que s'homogeneïtzava al cap de poc temps gràcies a l'efecte de la difusió, assolint una concentració estable de 5 mM després de només 10 segons (Figura 5.2.12A).

Dins de la membrana del sensor, la concentració de glucosa no arribava a assolir el valor de 5 mM sinó que s'estabilitzava al voltant de 4 mM degut a l'equilibri entre la difusió de l'espècie a través de la matriu polimèrica i al continu consum de la glucosa en la reacció enzimàtica que donava lloc a la resposta electroquímica del biosensor (Figura 5.2.12B).

Considerant la concentració del mediador redox, el TMB que es trobava inicialment a una concentració de 50 mM (que corresponia al 10% en massa) dins la membrana (Figura 5.2.12C) es reduïa progressivament degut a la reacció enzimàtica fins a arribar a un valor de 0 mM després de 200 segons (Figura 5.2.12D).

Els resultats suggereixen que el sensor operava sota limitacions de transport de massa, ja que la difusió a través de la membrana i la cinètica de la reacció enzimàtica influeixen en el temps de resposta del sensor. La simulació indica que les cinètiques de reacció podrien tenir un paper significatiu en el rendiment del sensor; no obstant

això, requereix confirmació experimental. La depleció total del TMB en 200 segons podria indicar un temps de resposta estabilitzat, però aquesta conclusió s'hauria de considerar com a preliminar sense suport empíric addicional. A més, el temps fins l'estabilitat canviaria si es té en compte la reacció d'oxidació del TMB per part de l'elèctrode.

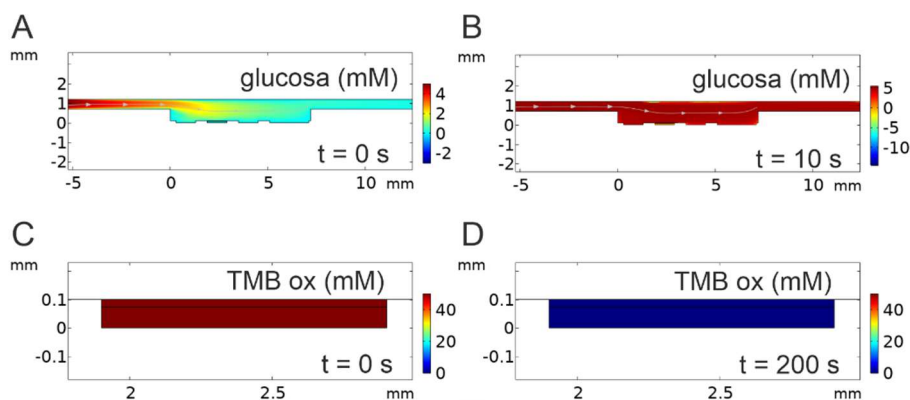


Figura 5.2.12: Evolució temporal simulada de les concentracions de glucosa i TMB. Es mostren quatre mapes de concentració: (A) Distribució inicial de glucosa a $t = 0$ s a tot el dispositiu, (B) Concentració de glucosa després de 10 s a tot el dispositiu, (C) Concentració inicial del TMB oxidat dins la membrana, i (D) Depleció del TMB després de 200 s dins la membrana.

A nivell experimental, la resposta del sensor es va estudiar en el rang de cabals compresos entre 0 i 3 $\mu\text{l/s}$ (Figura 5.2.13A i B). Les dades amperomètriques indicaven una disminució en la intensitat de corrent proporcionada pel sensor en augmentar el cabal, valor que s'estabilitzava al voltant de 2 $\mu\text{l/s}$. Aquesta disminució s'atribueix al menor temps de les molècules de glucosa i la superfície de la membrana, fet que limita la concentració real dins d'aquesta. Com era d'esperar, les mostres de PBS, que no tenen glucosa, mostren

respostes de corrent molt més petites, i amb una influència menor del cabal, ja que en aquest cas la reacció enzimàtica no tenia lloc.

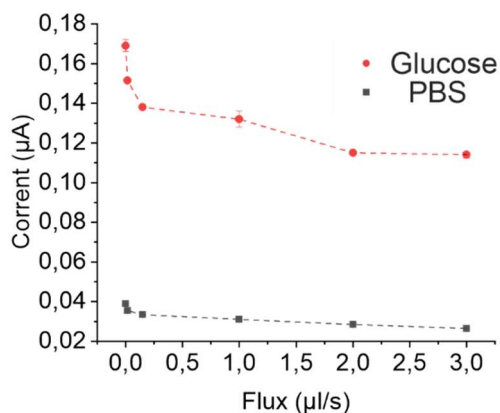


Figura 5.2.13: Anàlisi amperomètrica del sensor dependent del cabal: Corrent final estable mesurat amb 0 mM i 3 mM de glucosa a diferents fluxos.

Tenint en compte aquests resultats, es considera un cabal de 0 µl/s com a òptim, valor que es va fer servir en la resta d'experiments presentats en aquesta tesi.

5.2.5. Resposta analítica dels sensors enzimàtics

La capacitat analítica del biosensors es va avaluar en termes de sensibilitat, rang lineal, límit de detecció, reproductibilitat, estabilitat i interferències.

El procés de calibratge es va dur a terme dins la cambra microfluídica. Cada solució era inserida durant mínim 3 minuts a un cabal de 5 µl/s, assegurant que cada nova solució de glucosa introduïda substituís completament la mostra anterior. El corrent era

mesurada en tot moment, amb un potencial aplicat de 0,5V vs Ag/AgCl. El biosensor proporcionava valors de corrent més elevats amb les successives addicions de glucosa (Figura 5.2.14A). La resposta del sensor va mostrar un augment clar i progressiu del corrent amb les successives addicions de glucosa, demostrant una generació de senyal consistent al llarg del temps. Cal tenir en compte l'efecte del flux al canviar la mostra sobre el senyal electroquímic, ja que l'activació del flux va provocar una disminució de la intensitat del senyal. No obstant això, quan el flux s'atura, el senyal torna a augmentar i estabilitzar-se.

Es va observar una correlació lineal entre el corrent mesurat i la concentració de glucosa fins a 6 mM (Figura 5.2.14B). La sensibilitat del sensor, corresponent a la pendent de la recta de calibrat, es va determinar com $0,016 \pm 0,0007 \mu\text{A}/\text{mM}$, calculada a partir de múltiples calibratges independents. El límit de detecció (LOD) es va estimar en 0,5 mM, pel que el rang lineal del biosensor era de 0,5 a 6 mM, un rang ampli i adequat per a la detecció de glucosa en cultius cel·lular.

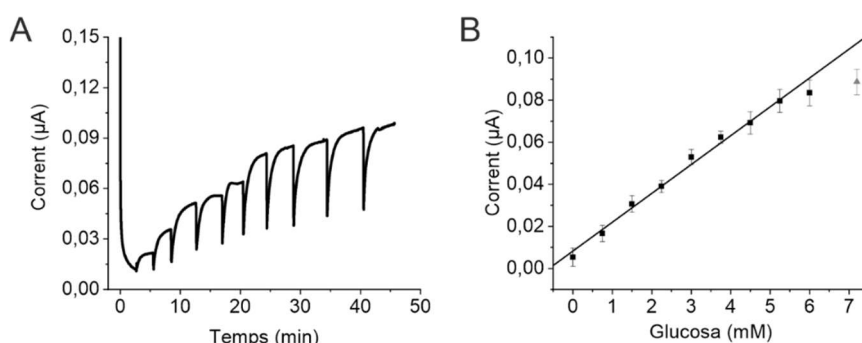


Figura 5.2.14: Resposta electroquímica del sensor de glucosa. (A)
Resposta cronoamperomètrica a l'addició de glucosa en una cambra

microfluídica. (B) Corba de calibratge que mostra la relació lineal entre el corrent i la concentració de glucosa (0–6 mM).

Els sensors fabricats dins la mateixa sèrie de producció van demostrar una alta reproductibilitat, amb valors similars de sensibilitat ($0,018 \pm 0,0052 \mu\text{A}/\text{mM}$), màxim del rang lineal ($5,5 \pm 0,4$) i LOD ($0,5 \pm 0,1 \text{ mM}$). Tanmateix, es van observar variacions entre sensors de diferents lots (256%), probablement degudes a diferències en la composició i gruix de la membrana de bioreconeixament, que es poden corregir a partir del procés de calibratge del dispositiu.

5.2.6. Estabilitat operacional del sensor de glucosa

Per tal d'avaluar l'estabilitat operacional del sensor de glucosa, es van dur a terme una sèrie d'experiments de monitoratge a llarg termini en condicions de mesura contínua. Aquests experiments tenien com a objectiu determinar la capacitat del sensor per mantenir lectures consistents, precises i fiables durant períodes prolongats.

En el muntatge experimental, s'alternaven dues solucions: una amb tampó fosfat salí (PBS) com a control (0 mM de glucosa) i una altra amb una concentració fixa de glucosa. L'alternança es va realitzar mitjançant dues bombes peristàltiques que funcionaven a un cabal de $10 \mu\text{l}/\text{s}$, permetent al sensor alternant solucions amb i sense glucosa (Figura 5.2.15). Entre canvis de medi, el flux d'ambdues bombes es parava per tal de tenir mesures de glucosa precises.

Es presenten tres experiments representatius de monitoratge per il·lustrar el comportament del sensor i les dificultats trobades durant el seu ús prolongat.

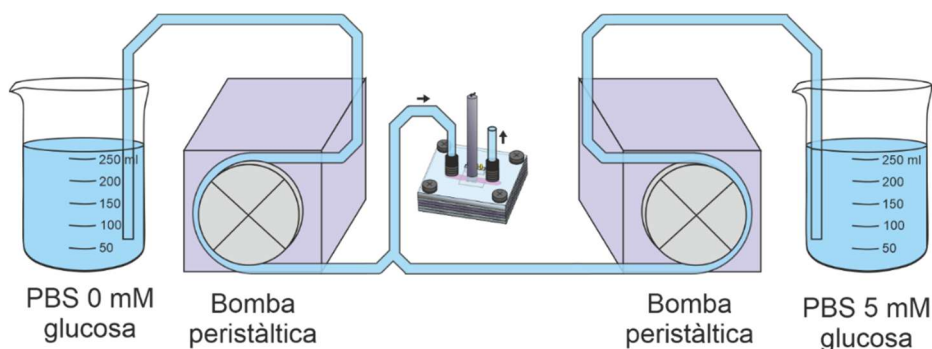


Figura 5.2.15: Muntatge experimental per a l'avaluació de l'estabilitat del sensor de glucosa.

Estabilitat a Curt Termini: Monitoratge de 4 Hores

El primer experiment (Figura 5.2.16) va consistir en un monitoratge de 4 hores utilitzant una solució de glucosa a 3 mM. El sensor va detectar amb èxit les alternances entre concentracions de glucosa, mostrant un canvi clar en la resposta de corrent amb cada canvi de solució. Els canvis eren molt repetitius i durant les 4 hores no es van observar diferències significatives entre els dos tipus de mostra. Es van observar petits transitoris i fluctuacions al llarg de l'experiment, especialment en els moments en que es canviava d'un medi a un altres, que es van associar a la influència del flux en la mesura amperomètrica. No obstant, un cop realitzat el canvi, el senyal tornava a un estat estacionari, confirmant la capacitat del sensor per oferir lectures fiables en condicions de flux continu.

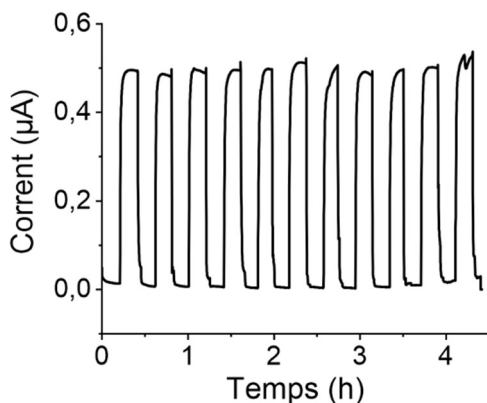


Figura 5.2.16: Monitoratge a curt termini del sensor en condicions alternants de PBS i PBS amb 3 mM de glucosa.

Estabilitat a mig termini: Monitoratge de 60 hores

En un segon experiment, la resposta del biosensor a l'alternança entre el medi tampó sense glucosa i amb 5 mM de glucosa es va mesurar durant 60 hores. Per avaluar la fiabilitat de la mesura, es van realitzar calibratges del biosensor a l'inici, a les 15 hores i a les 60 hores (Figura 5.2.17). Durant les 15 primeres hores, el biosensor presentava una resposta repetitiva igual que la que s'havia obtingut en el primer experiment. No obstant això, després del calibratge intermedi a les 15 hores, i degut a l'entrada d'una bombolla d'aire que va ser impossible eliminar, els valors de corrent es van veure lleugerament alterats, baixant a 0,7 µA cap al final de la mesura de la solució amb glucosa. Aquest artefacte va impactar principalment les mesures corresponents a la solució amb 5 mM de glucosa, provocant una disminució en la intensitat del senyal després d'assolir el màxim esperat. La presència de la bombolla no va alterar la sensibilitat del biosensor, on els valors de sensibilitat obtinguts en els calibratges van ser de $0,150 \pm 0,010$, $0,144 \pm 0,006$ i $0,170 \pm$

0,003 $\mu\text{A}/\text{mM}$ (Figura 5.2.17B), indicant fluctuacions menors però estabilitat global.

Per avaluar la repetibilitat, es van analitzar els senyals màxims i mínims de cada cicle de mesura (Figura 5.2.17C). La resposta de corrent mitjana per a la solució amb glucosa va ser de $0,99 \pm 0,04$ μA (tenint en compte la màxima senyal per evitar les alteracions amb la bombolla), mentre que les mesures de control amb PBS van tenir una mitjana de $0,06 \mu\text{A} \pm 0,03 \mu\text{A}$. Aquests resultats confirmen que el sensor va romandre estable i altament fiable durant tot el període de 60 hores, malgrat la pertorbació ocasionada per la bombolla.

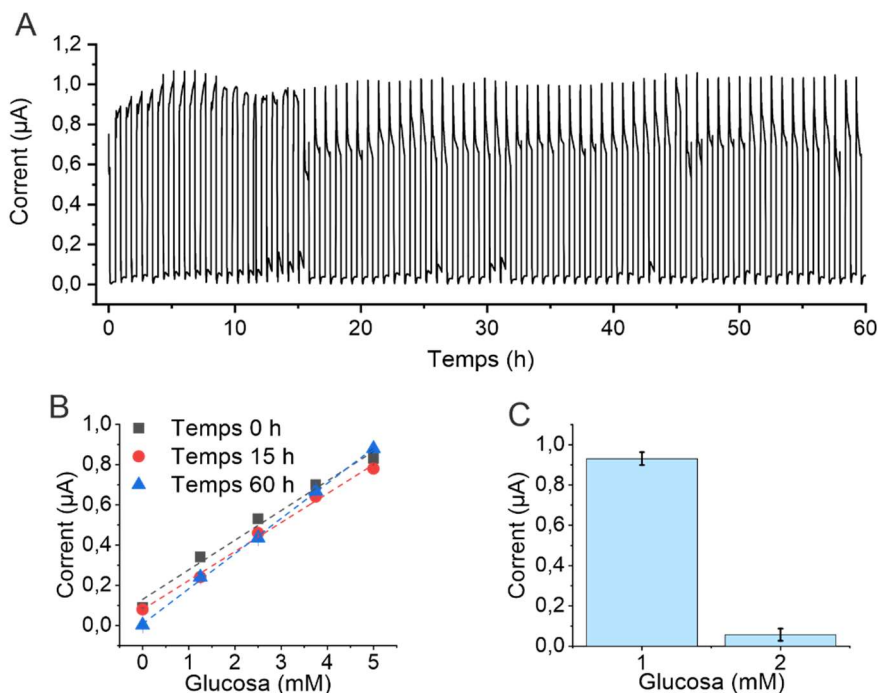


Figura 5.2.17: Monitoratge de 60 hores. (A) Monitoratge a mitjà termini alternant solucions de PBS i PBS amb 5 mM de glucosa. (B) Corbes de calibratge del sensor durant el monitoratge a mitjà termini. (C) Anàlisi de senyals màxims i mínims registrats per avaluar la repetibilitat.

Estabilitat a llarg termini: Monitoratge de 248 hores

Finalment, es va realitzar un tercer experiment en el que l'alternança entre les solucions es va monitoritzar durant 248 hores fent servir medi de cultiu DMEM en comptes de PBS per poder valorar efectes de matriu i d'adhesió molecular per part de components del medi (Figura 5.2.178). Les mesures de cada cicle mostraven un pic d'estabilització poc reproduïble quan el flux s'aturava, per la qual cosa cal tenir en compte la mesura una vegada aquest pic desapareix. Durant les primeres 92 hores, el sensor va mostrar un comportament estable, amb una resposta mitjana de $0,48 \mu\text{A} \pm 0,02 \mu\text{A}$. No obstant això, després d'aquest període, es va observar un descens progressiu de la sensibilitat, i el senyal es va estabilitzar a un valor més baix ($0,20 \pm 0,02 \mu\text{A}$). A més de la reducció en la intensitat del senyal, la desviació estàndard va augmentar fins a aproximadament un 10% del senyal mesurat, indicant una variabilitat més alta. La sensibilitat inicial es va quantificar en $0,157 \pm 0,008 \mu\text{A}/\text{mM}$, mentre que al final de l'experiment va disminuir fins a $0,063 \pm 0,006 \mu\text{A}/\text{mM}$, la qual cosa representa una reducció en la sensibilitat del 40%.

No obstant, tal i com s'havia observat en el cas del PBS, el sensor mantenia fiabilitat durant més de 90 hores de mesura sense necessitat de recalibratge, i malgrat el canvi de sensibilitat reportat posteriorment, els valors proporcionats podien ser fiables si es realitzava un nou recalibrat. Els resultats confirmen, per tant, que el sensor és fiable per realitzar mesures contínues de glucosa en medis de cultiu sense requerir recalibracions durant unes 90 hores d'experiment.

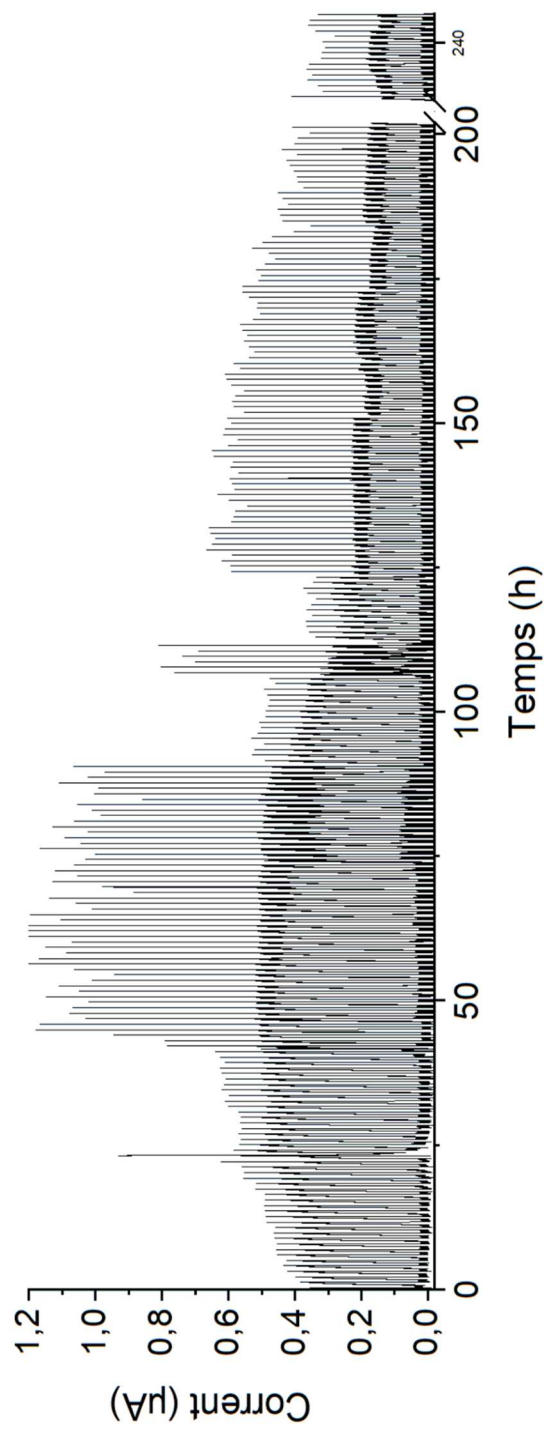


Figura 5.2.18: Monitoratge a llarg termini alternant DMEM i DMEM amb 3 mM de glucosa.

Impacte de possibles interferències en el sensor amperomètric enzimàtic

Es va analitzar la interferència de l'àcid ascòrbic, la molècula amb propietats redox més comunament present en medis de cultiu i fluids biològics (àcid ascòrbic), així com l'efecte dels nivells d'oxigen i de pH del medi (Figura 5.2.19). L'estudi es va realitzar mitjançant mesures amperomètriques a 0,5 V en solucions de tampó i glucosa (4 mM), amb absència o presència del potencial interferent, o modificant les condicions de la mesura a nivell de pH o concentració d'oxigen.

Per estudiar la influència de l'oxigen, es va comparar la resposta del biosensor en presència tres condicions d'oxigenació del medi: presència d'oxigen, saturació d'oxigen (condició obtinguda bombollejant aire) i anòxia (condició obtinguda bombollejant nitrogen). S'observa com en absència d'oxigen, la resposta del biosensor és menor, mentre que la corrent registrada augmenta en incrementar la seva concentració en el medi. Aquest fet es pot explicar considerant la participació d'aquesta molècula en la reacció enzimàtica, de manera, que la falta d'oxigen redueix significativament l'eficiència de la reacció.

Per altra banda, l'addició de 35 μM d'àcid ascòrbic en la mostra, un valor unes 100 vegades superior als nivells fisiològics típics, resultava en un augment significatiu de la resposta del sensor en absència de glucosa. No obstant, aquesta interferència era menor quan hi havia una concentració elevada de glucosa ja que la major part de la senyal obtinguda derivada de la reacció enzimàtica i només un percentatge molt petit de la presència d'àcid ascòrbic. Tenint en compte que la concentració en la que es treballa supera

en dos ordres de magnitud la que es troba convencionalment en el medi de cultiu, es podia concloure que la interferència d'aquesta espècie en les condicions de mesura hauria de ser molt petita i despreciable.

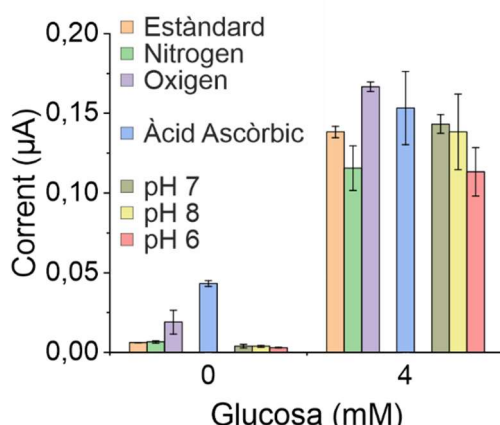


Figura 5.2.19: Estudi d'interferències: Senyal electroquímica mesurada en PBS a concentracions de glucosa de 0 mM i 4 mM sota diferents condicions: mostra estàndard, mostres amb nitrogen (desoxigenada), amb aire (oxigenada), amb àcid ascòrbic (0,035 mM), i amb ajustos de pH a 6, 7 i 8.

Finalment, es va valorar l'efecte del pH en la resposta del biosensor ajustant el pH del medi de cultiu a valors de pH 6, 7 i 8, un rang comú en la mesura de cultius cel·lulars, tal i com s'ha demostrat en l'apartat anterior.

La resposta del biosensor presentava diferències significatives en funció del pH en presència de glucosa, el que confirmava la dependència de la resposta enzimàtica del pH del medi. Mentre el biosensor presentava una resposta similar (no significativament diferent) a pHs entre 7 i 8, aquesta disminuïa de forma significativa a pH 6. Aquesta disminució es podia associar a la combinació d'una

disminució de l'activitat enzimàtica de la GOx a pH 6, així com a una disminució de la capacitat de transferència electrònica del mediador redox, el TMB, una molècula que ja s'ha demostrat sensible a les condicions de pH. Tot i que en condicions normals de cultiu cel·lular el pH no acostuma a descendir fins a valors tan baixos (pH 6), aquests resultats posen de manifest la importància de controlar l'acidificació del medi per evitar possibles interferències en la resposta del sensor.

En resum, es pot concloure que malgrat el biosensor era sensible a les condicions de la mesura (pH i concentració d'oxigen) i a la presència de molècules amb propietats redox, les concentracions comuns de l'interferent i els canvis de pH i oxigenació del medi de cultiu no haurien d'afectar de forma significativa la resposta del biosensor, que hauria de ser fiable durant l'assaig.

5.2.7. Validació del biosensor en cultius cel·lulars de neurones

Per avaluar el rendiment del sensor de glucosa desenvolupat en entorns biològics, es va testar la seva eficàcia en cultius cel·lulars de Neuro-2a (Figura 5.2.20) i es va comparar amb un mètode convencional d'anàlisi espectroscòpica de glucosa, el test Glucose MR de Clonatest. Es van dur a terme tres experiments independents de monitoratge, seguint l'evolució de la concentració de glucosa en el medi de cultiu al llarg del temps. En cada experiment, el medi es renovava periòdicament, i els nivells de glucosa es mesuraven tant amb el mètode comercial com amb el sensor de monitoratge continu desenvolupat. A més, per avaluar la capacitat del sensor de detectar canvis metabòlics, un dels experiments va incloure l'aplicació de 5-

aminoimidazole-4-carboxamida ribonucleòtid (AICAR), un agent farmacològic conegut per potenciar la captació de glucosa mitjançant l'activació de la quinasa activada per AMP (AMPK).

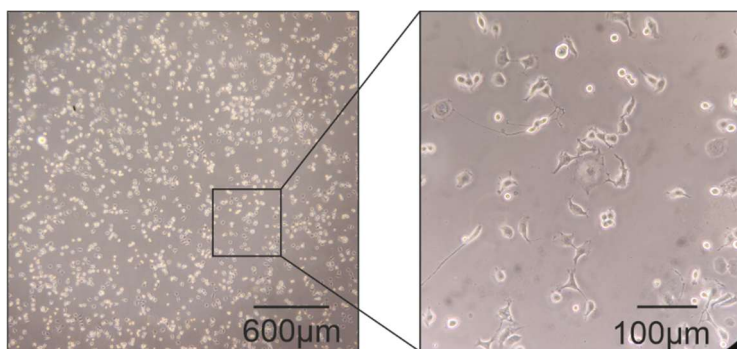


Figura 5.2.20: Cultius cel·lulars Neuro-2a – Imatge microscòpica de cèl·lules Neuro-2a després de tres dies de cultiu, mostrant-ne la morfologia i densitat.

En el primer experiment de monitoratge (Figura 5.2.21A), la glucosa inicialment present en el medi (5 mM) es va consumir progressivament fins assolir valors propers a 0 al cap d'unes 30 hores. El medi es va renovar en l'hora 45, restablint els nivells inicials de glucosa en el medi (5 mM), el que es va validar tant amb el mètode de referència com amb el biosensor, sense necessitat de recalibració ni neteja. Novament, les cèl·lules de neuroblastoma van consumir ràpidament la glucosa, aquest cop en menys de 20 hores, probablement pel nombre més elevat de cèl·lules present en la cambra de cultiu. A continuació, les cèl·lules van consumir ràpidament la glucosa novament disponible en un període aproximat de 12 hores. El medi de cultiu es va canviar novament, iniciant un nou cicle de reposició de glucosa, el que es va poder monitoritzar novament tant amb el biosensor com el sistema de referència,

validant així el bon funcionament del biosensor, amb bona sensibilitat, resolució temporal i fiabilitat.

Els resultats es van poder replicar en un segon experiment en el consum de glucosa per part de les cèl·lules de neuroblastoma es va monitoritzar durant 80 hores, realitzant 4 canvis de medi en temps

diferents i obtenint consums similars als obtinguts en el primer experiments, que van ser corroborats pel mètode de referència (Figura 5.2.21B).

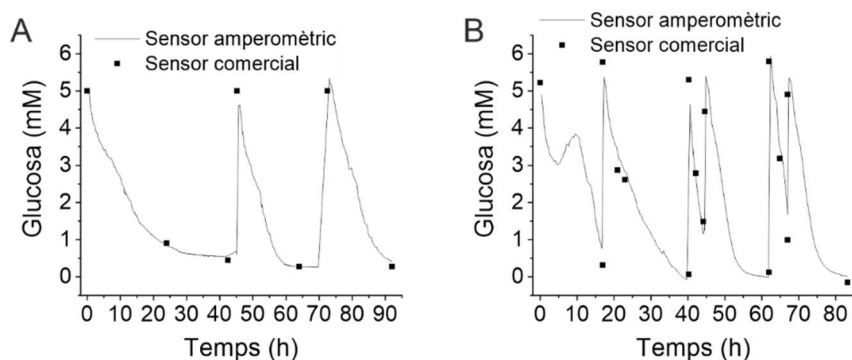


Figura 5.2.21: Comparació de mètodes de monitoratge de glucosa.

(A) Primer experiment de monitoratge continu de glucosa en cultius de cèl·lules Neuro-2a utilitzant el sensor enzimàtic, correlacionat amb mesures discretes obtingudes amb el test comercial Glucose MR. Canvis de medi a les 45 h i 70 h. (B) Segon experiment de monitoratge continu amb canvis de medi a les 16 h, 40 h, 45 h, 62 h i 67 h.

En el tercer experiment, es va cultivar un nombre inferior de cèl·lules (20.000 cèl·lules/ml respecte les 40.000 cèl·lules/ml inoculades en els casos anteriors) per reduir el consum d'oxigen i poder valorar l'efecte de la inoculació d'AICAR, un anàleg de l'AMP, que activa l'AMPK, un enzim clau en la homeòstasi energètica cel·lular que

promou l'absorció i l'oxidació de la glucosa, i per tant, accelera el metabolisme cel·lular. En introduir aquest fàrmac en el medi a les 24 hores de cultiu, es va produir un descens ràpid en la concentració de glucosa, que va caure per sota de 2 mM en poques hores, el que indicava un increment significatiu en el metabolisme de la glucosa (Figura 5.2.22). El canvi es va poder detectar de forma immediata amb el sensor, i es va validar amb el sistema de referència, el que validava la capacitat del biosensor per monitoritzar canvis metabòlics aguts en entorns cel·lulars. Malgrat el mètode comercial de referència també va confirmava aquesta tendència, la seva naturalesa discreta i la menor resolució temporal de la mesura, que requeria extracció de la mostra i mesura amb un equip de sobretaula, no permetia detectar els canvis dinàmics registrats amb el biosensor.

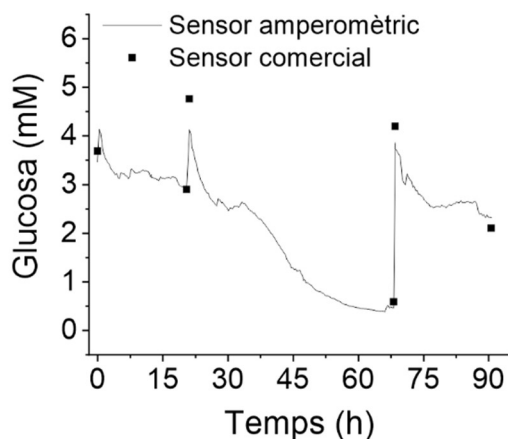


Figura 5.2.22: Efecte de l'AICAR sobre el metabolisme de la glucosa.

Dinàmica del consum de glucosa en cultius de cèl·lules Neuro-2a després del tractament amb AICAR (1 mM). Monitoratge continu mitjançant el

sensor enzimàtic de glucosa comparat amb mesures discretes del mètode comercial en punts de canvi de medi.

Per tal d'avaluar l'exactitud del sensor de glucosa desenvolupat, es va realitzar una anàlisi de correlació de Pearson i índex de Willmott entre les mesures obtingudes amb el sensor i els resultats del mètode comercial espectrofotomètric en els tres experiments (Figura 5.2.23). Els resultats van mostrar una forta correlació amb els dos mètodes, amb una pendent de regressió propera a 1 (de 0,96) i una ordenada a l'origen propera a 0 (de 0,13) que confirma la bondat de les dades obtingudes amb el biosensor durant l'experiment.

El test t realitzat amb les mateixes dades va donar com a resultat un valor de t de -0,085 amb un nivell de significació de 0,05, corresponent a un valor de p de 0,933 amb 28 graus de llibertat, el que indicava que no hi havia diferències estadísticament significatives entre els dos mètodes, corroborant la fiabilitat del sensor desenvolupat per a aplicacions biològiques.

A més, el sensor va mostrar una excel·lent concordança amb el mètode comercial, amb un coeficient de Willmott de 0,992, posant de manifest una elevada correlació global entre ambdues tècniques.

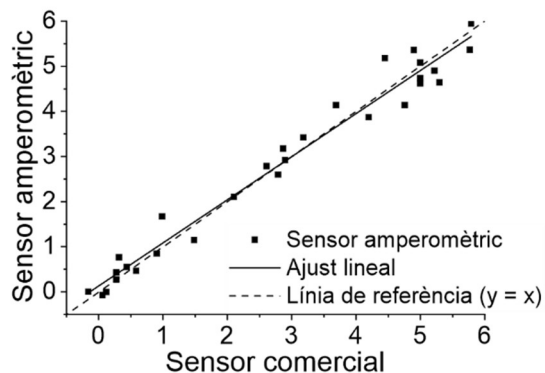


Figura 5.2.23: Validació del sensor de glucosa. Anàlisi de correlació de Pearson entre el sensor de glucosa desenvolupat i el mètode comercial espectrofotomètric.

Els resultats obtinguts, per tant, confirmaven la gran capacitat analítica del sensor desenvolupat pel seguiment continuu del consum de glucosa per part de les cèl·lules presents en la cambra de cultiu, proporcionant valors fiables durant llargs períodes de temps. A més, el sistema realitzava totes aquestes mesures amb un manteniment mínim, ja que no requeria de neteges ni recalibrats al llarg de l'experiment, el que el convertia en un dispositiu molt competitiu a nivell comercial

5.3. Sensor òptic d'absorbància per adipòcits

Els resultats d'aquest capítol s'han realitzat amb la col·laboració de A. C. Reguera i R. Rodríguez-Rodríguez de la UIC i han donat lloc a 2 publicacions per presentar (Demonstrator for optical biosensing of cell activity using 3D cell guides i Thermal transference of micro-waveguides to solvent-sensitive thermoplastic substrates in the production of all-polymeric photonic lab-on-a-chip devices.) i 1 contribució a congrés (V BioImpresión 3D).

Introducció

La radiació electromagnètica s'ha utilitzat durant dècades en diagnòstic clínic, per exemple: raigs X [257], la ressonància magnètica [258] i l'espectroscòpia en infraroig proper (NIRS) [259]. En canvi, l'explotació de la llum visible (VIS) ha estat molt més limitada pel fort apantallament òptic dels teixits: la dispersió i l'absorció extingeixen la llum després de pocs centenars de micres [260]. Quan, però, es treballa amb monocapes cel·lulars o teixits primis (com en cultius *in vitro*) aquesta mateixa interacció esdevé un avantatge, ja que les cèl·lules contenen cromòfors i microestructures que deixen una petjada fotònica (*photonic fingerprint*) dependent de la seva bioquímica i morfologia [261].

Un exemple paradigmàtic és el de les cèl·lules gials de Müller: aquests prolongats astràgals cel·lulars de la retina guien la llum naturalment i actuen com guies d'ona cel·lulars, confinant-hi la radiació al seu interior gràcies al contrast de refracció respecte al citoplasma circumdant [262]. Aquest fenomen demostra que la pròpia cèl·lula pot esdevenir un component òptic (base del concepte de fotònica viva) i inspira sensors on la mostra és alhora transductor i objecte d'anàlisi.

En l'àmbit metabòlic, els adipòcits ofereixen un cas d'estudi atractiu. Les cèl·lules precursoras (preadipòcits 3T3-L1) presenten morfologia fibroblàstica, però en diferenciar-se cap a adipòcits blancs acumulen gotes lipídiques [263]; Aquesta transformació altera l'absorció i la dispersió de la llum tal i com es veu a la Figura 5.3.1A i, per tant, poden ser detectades òpticament.

Diversos estudis han començat a explorar plataformes fotòniques integrades per a explotar les diferències òptiques entre cèl·lules amb diverses estratègies: evanescència [264], interferometria [265], luminescència retardada ultra-dèbil [266] o per espectroscòpia del infraroig en plasmó superficial [267]. A més dels exemples pioners de sensors implantables per sensar en neurones [268], l'ús de fibres òptiques de petit diàmetre permet un muntatge econòmic, escalable i sense marcatge químic.

En aquest capítol es presenta un sensor d'absorció i dispersió en llum visible basat en fibra òptica (Figura 5.3.1B) dissenyat per monitoritzar en temps real la diferenciació de preadipòcits 3T3-L1. Aprofitant la variació espectral induïda per la formació de gotes lipídiques, es demostra que és possible detectar l'inici de l'adipogènesi sense fluoròfors, tincions ni manipulació genètica.

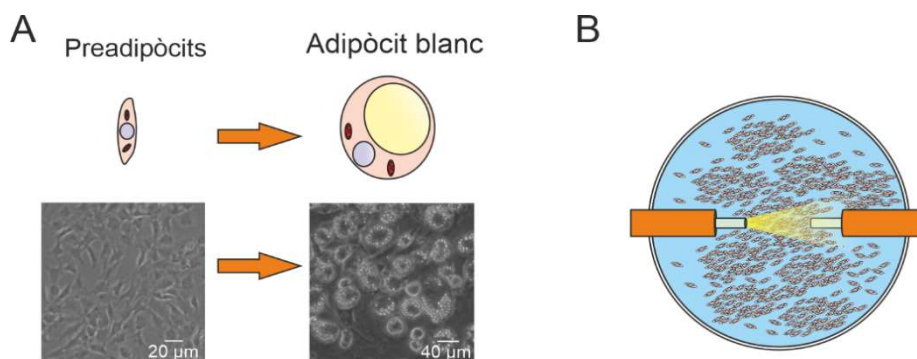


Figura 5.3.1: Diferenciació de preadipòcits a adipòcits blancs. (A) Diferències morfològiques i òptiques entre preadipòcits i adipòcits blancs madurs. (B) Esquema del sistema sensor basat en fibra òptica per al monitoratge de la diferenciació adipocitària.

5.3.1. Cultiu d'adipòcits en substrats de PMMA i poliestirè

Per validar la compatibilitat biològica i l'adhesió cel·lular a les plataformes òptiques desenvolupades (Fabricació explicada la secció 4.2.3.1 pel substrat de PMMA i a la secció 4.2.3.2 pel substrat de poliestirè), es van cultivar i diferenciar preadipòcits 3T3-L1 tant a la cambra fabricada amb PMMA com en un substrat de poliestirè. L'objectiu era avaluar la capacitat de cada plataforma per suportar l'adhesió, proliferació i diferenciació dels adipòcits.

Els preadipòcits es van sembrar a cada cambra amb diferents substrats a una densitat de 50.000 cèl·lules/cm² (ajustada a l'àrea de cada cambra) i es van cultivar seguint un protocol estàndard de diferenciació cap a adipòcits blancs. El procediment va consistir en l'exposició seqüencial a diferents medis de cultiu:

Dia 1–3, medi "BMI", medi basal I per fomentar adhesió i proliferació. Dia 4–5, "DMI", medi de diferenciació I (IBMX, dexametasona, insulina, rosiglitazona) per induir l'adipogènesi.

Dia 6–7, "DMII", medi de diferenciació II mantingut amb insulina.

Dia 8–10, "BMII", medi basal II per a l'estabilització. Al dia 8 la diferenciació es considera completa.

Cambra de PMMA

Les cèl·lules sembrades a la cambra de PMMA van mostrar una adhesió reduïda en comparació amb les plaques de cultiu estàndard, malgrat el tractament de la superfície amb poli-L-lisina. Tal com s'observa a la Figura 5.3.2, no es va assolir la confluència de manera consistent. Tot i que els canvis morfològics característics de la diferenciació adipocitària, com la formació de gotícules lipídiques i l'augment de la brillantor, eren visibles a partir del dia 6 i

es van accentuar fins al dia 10, la densitat cel·lular era notablement inferior. En alguns experiments, la confluència només va assolir aproximadament el 30% en comparació amb les plaques de cultiu estàndard sembrades amb la mateixa densitat.

Aquesta adhesió limitada s'atribueix probablement a la química de superfície i a la topografia pròpia del PMMA, fins i tot després de la funcionalització amb poli-L-lisina.

Placa de Petri (Poliestirè)

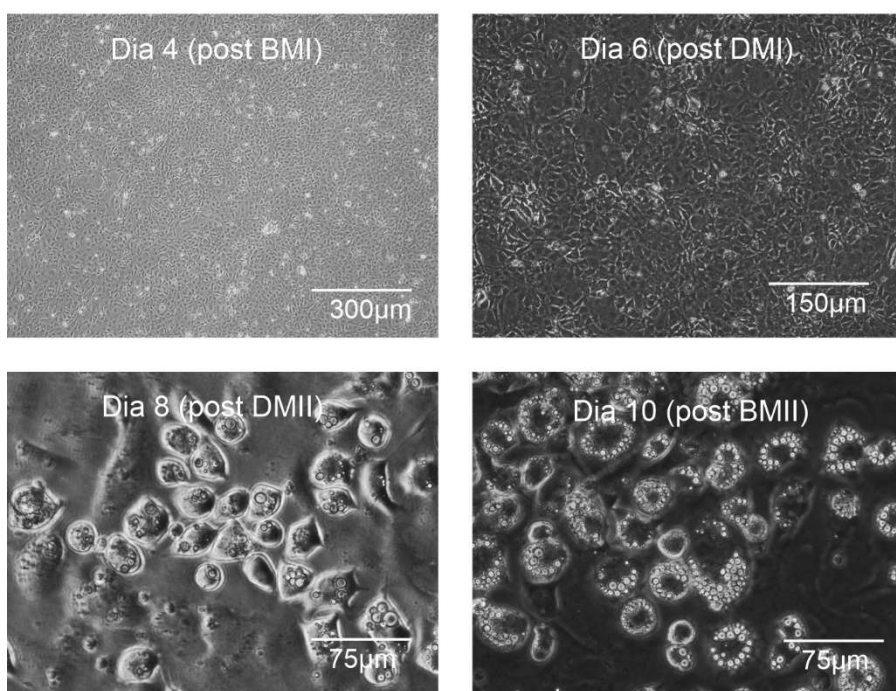


Figura 5.3.2: Evolució temporal de la diferenciació adipocitària en la cambra de PMMA. Imatges de microscòpia preses als dies 4, 6, 8 i 10.

S'observen cotícules lipídiques, però la confluència cel·lular es manté subòptima.

Cultiu en substrat de poliestirè

En contrast, les cèl·lules sembrades en la cambra amb substrat de poliestirè (feta a partir d'una placa de Petri) es van adherir de manera uniforme i van assolir la confluència en un termini de dos dies (Figura 5.3.3). La superfície de poliestirè de la placa de Petri, optimitzada per al cultiu cel·lular, va proporcionar un entorn favorable per a l'adhesió i la proliferació cel·lular. Tal com es mostra en les imatges de la seqüència temporal, la diferenciació va progressar de manera robusta, amb una acumulació clara de gotes lipídiques a partir del dia 6. Al dia 10, les cèl·lules presentaven la morfologia característica dels adipòcits blancs madurs.

Placa de polimetilmetacrilat

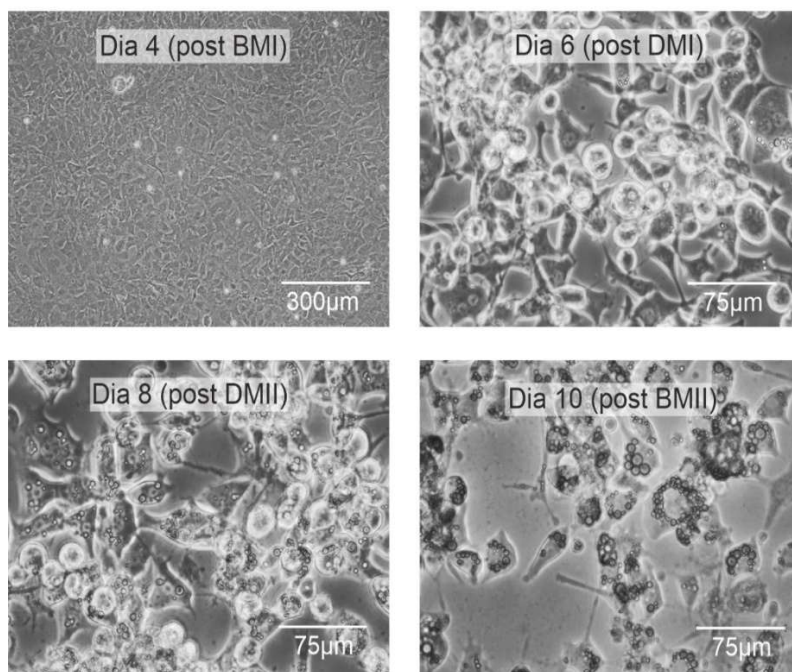


Figura 5.3.3: Evolució temporal de la diferenciació adipocitària en substrat de poliestirè.

Comparació quantitativa de la confluència

A la Figura 5.3.4 es presenta una comparació directa entre les dues plataformes al dia 4. Tot i haver estat sembrades amb densitats cel·lulars equivalents (ajustades segons l'àrea), el cultiu en el substrat de poliestirè va mostrar de manera consistent una confluència significativament superior. Aquests resultats posen de manifest la importància de les propietats de superfície per donar suport al cultiu d'adipòcits, on una monocapa cel·lular densa i uniforme és essencial per garantir la consistència del senyal.

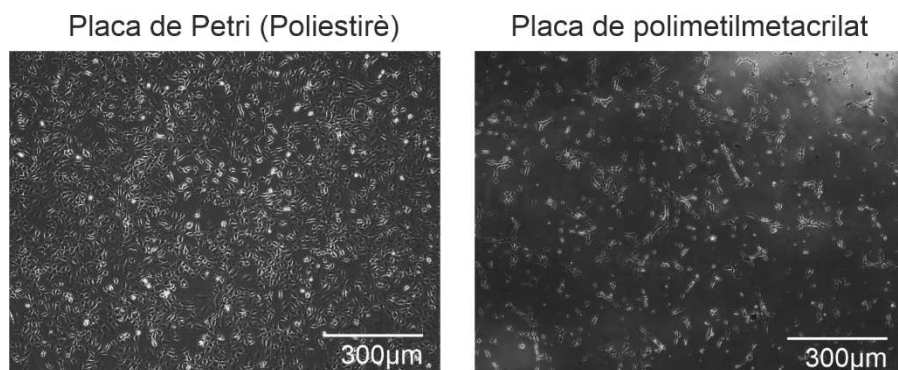


Figura 5.3.4: Comparació de la confluència al Dia 4 entre la placa de Petri de poliestirè (esquerra) i el dispositiu de PMMA (dreta). Tots dos sembrats a 50.000 cèl·lules/cm². La densitat cel·lular al dispositiu de PMMA es va veure significativament reduïda.

5.3.2. Avaluació del rendiment del connector òptic

Un cop triat el substrat òptim, per tal d'integrar el sensor òptic amb fonts de llum i sistemes de detecció externs, es va dissenyar un connector personalitzat de PMMA per a la connexió de les fibres òptiques amb connexió SMA (Detallat a la secció 4.2.3.3). Es va

avaluar l'eficiència de transmissió del senyal i si el connector introduïa pèrdues òptiques significatives.

Per fer-ho, es va mesurar la intensitat espectral del dispositiu amb i sense el connector utilitzant la mateixa configuració òptica del dispositiu de la Figura 4.2.19. Els espectres resultants es mostren a la Figura 5.3.5. La traça negra representa el senyal recollit directament des de la fibra sense connector, mentre que la traça vermella correspon a les mesures realitzades a través de la interfície del connector.

Es va observar una reducció notable en la intensitat transmesa a través de l'espectre visible i infraroig proper. La intensitat del senyal es reduïa fins aproximadament un 8% del senyal sense el connector (temps d'integració de 60 ms), indicant una pèrdua òptica substancial atribuïble a la interfície. Aquesta pèrdua probablement es deu a un mal alineament entre la fibra i el connector SMA.

Atesa aquesta atenuació significativa, es va considerar que el connector no era adequat per a experiments que requereixen alta sensibilitat de la senyal on el soroll pot ser crític. Per aquest motiu, es van seleccionar suports de fibra sense connectors SMA per a la configuració final del dispositiu.

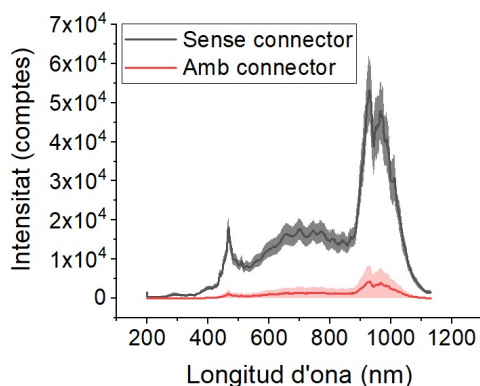


Figura 5.3.5: Intensitat espectral del sensor òptic amb i sense el connector PMMA-SMA. Les mesures es van realitzar amb un temps d'integració de 60 ms.

5.3.3. Calibratge del sensor

Per validar el rendiment del dispositiu de sensor òptic integrat amb fibra òptica, es van dur a terme experiments de calibratge emprant colorants sensibles al pH ben caracteritzats. Aquests experiments tenien una doble finalitat: primer, confirmar que el sistema seguia la llei de Beer-Lambert dins del rang de concentració assajat, i segon, determinar la longitud de pas òptic efectiva de la configuració personalitzada del sensor.

Els colorants utilitzats per al calibratge van ser taronja de metil i blau de timol (timolsulfoneftaleïna), escollits per presentar pics d'absorció ben definits sota condicions específiques de pH. El taronja de metil es va provar tant en condicions àcides (pH 2) i bàsiques (pH 9), amb un pic d'absorció a 460 nm i 508 nm, respectivament. El blau de timol es va preparar a pH 6 i mostrava un pic d'absorció a 598 nm. Cada colorant es va diluir en un rang de concentracions, i es van recollir els espectres d'absorció tant amb una cubeta de quars estàndard

de 1 cm com amb la placa de Petri modificada (substrat de poliestirè).

Per a les mesures de referència amb cubeta, les corbes de calibratge a la longitud d'ona de màxima absorció de cada colorant es van fer servir per extreure el coeficient d'extinció molar (ϵ) aplicant la llei de Beer-Lambert (Figura 5.3.6). Els coeficients d'extinció obtinguts van ser: $17,4 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ per al taronja de metil a pH 2, $14,5 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ a pH 9, i $7,3 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ per al blau de timol a pH 6.

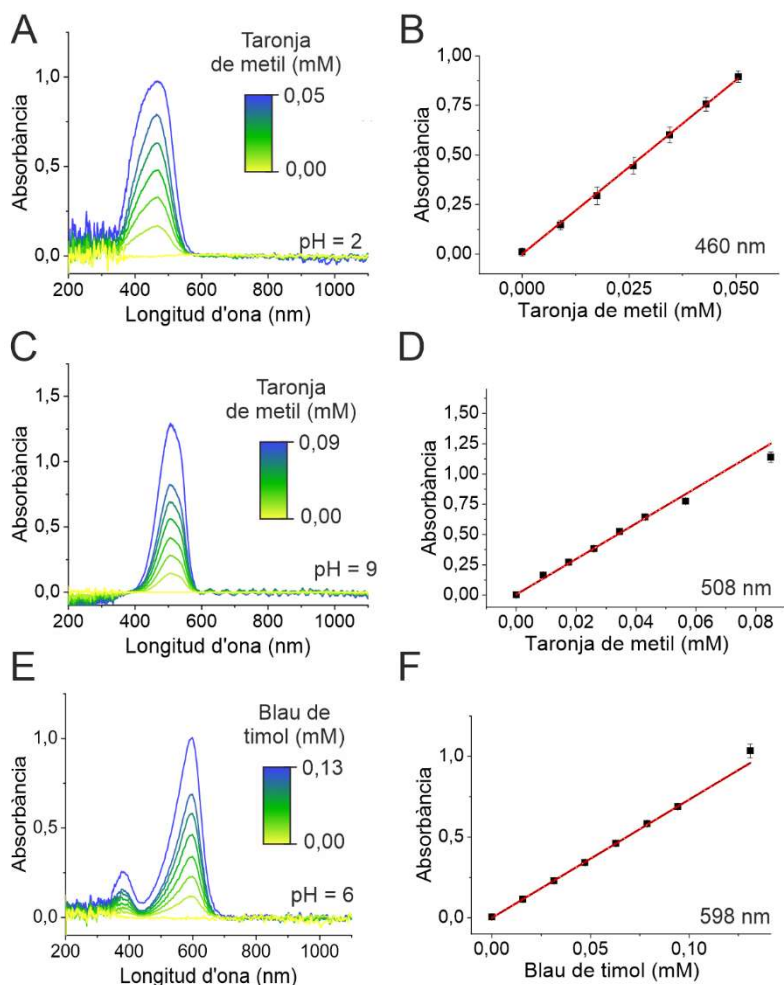


Figura 5.3.6: Calibratge de l'absorció de colorants en una cubeta de quars de 1 cm. A, C i E mostren els espectres d'absorció del taronja de metil a pH 2, taronja de metil a pH 9, i blau de timol a pH 6, respectivament. B, D i F corresponen a les corbes de calibratge als seus màxims d'absorció.

Es va repetir el mateix procés de calibratge amb el sensor òptic en substrat de poliestirè (Figura 5.3.7). El sistema va produir corbes de

calibratge lineals per a cada colorant, seguint la llei de Beer-Lambert. Els pendents obtinguts de les corbes d'absorció vs. concentració van ser de $7,3 \text{ mM}^{-1}$ per al taronja de metil a pH 2, $6,5 \text{ mM}^{-1}$ a pH 9 i $3,7 \text{ mM}^{-1}$ per al blau de timol a pH 6. Comparant aquests pendents amb els de la cubeta i aplicant l'equació de Beer-Lambert, es va calcular la longitud de pas òptic efectiva del dispositiu. Els valors resultants van ser 0,42 cm (pH 2), 0,45 cm (pH 9) i 0,51 cm (pH 6), amb una mitjana de $0,46 \pm 0,04$ cm, molt propera al valor teòric de 0,5 cm.

Aquest procés de calibratge va confirmar que el sensor conserva la linealitat de la detecció per absorció i proporciona una estimació fiable de les respostes òptiques dependents de la concentració.

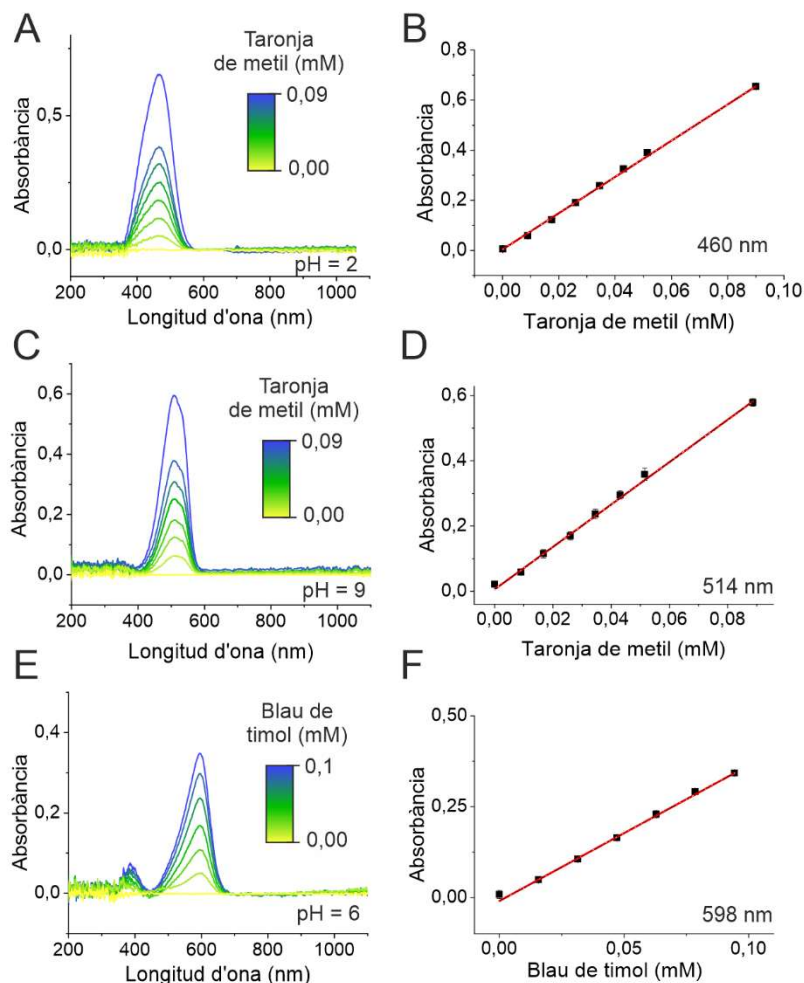


Figura 5.3.7: Calibratge utilitzant el sensor òptic amb fibra òptica integrada a la placa de Petri modificada. Els gràfics A, C i E mostren els espectres d'absorció obtinguts amb el sistema del sensor per al taronja de metil a pH 2, pH 9 i per al blau de timol, respectivament. Els gràfics B, D i F mostren les corbes de calibratge lineals corresponents.

5.3.4. Monitoratge òptic en temps real de la diferenciació adipocitària

Es van recollir espectres d'absorció de forma contínua durant totes les etapes mitjançant les fibres òptiques integrades.

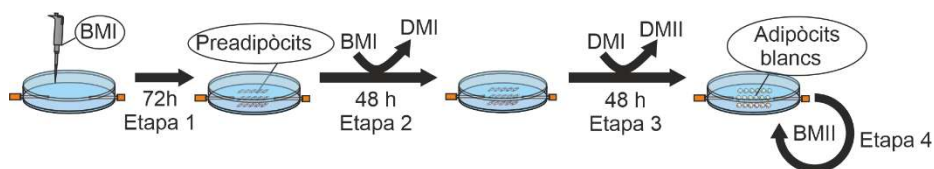


Figura 5.3.8: Esquema del protocol de monitoratge òptic en temps real. La diferenciació es va dividir en quatre etapes seqüencials: cultiu de preadipòcits (Etapa 1), inducció amb DMI (Etapa 2), manteniment amb DMII (Etapa 3) i estabilització amb BMII (Etapa 4).

Etapa 1: Els espectres van romandre estables i amb una absorbància baixa al llarg del temps, d'acord amb la monocapa densa però morfològicament uniforme dels preadipòcits confluents (Figura 5.3.9A). No es van detectar canvis òptics significatius, fet coherent amb el comportament esperat d'aquestes cèl·lules de morfologia semblant a fibroblasts, que no provoquen una dispersió ni un pic d'absorció notable.

Etapa 2: Un cop iniciada la diferenciació amb el medi DMI, l'absorbància va començar a augmentar, especialment en l'interval comprès entre els 600 i els 700 nm, arribant aproximadament a 0,1 unitats d'absorbància. Aquest augment coincidia amb l'aparició de gotes lipídiques intracel·lulars observades per microscòpia (Figura 5.3.9B), confirmant l'inici del procés de diferenciació. Cal destacar que el perfil espectral no va mostrar un increment pronunciat en les longituds d'ona més baixes, on habitualment s'espera una major dispersió associada a les gotes lipídiques. En lloc d'això, l'augment d'absorbància es va distribuir de manera homogènia per tot l'espectre.

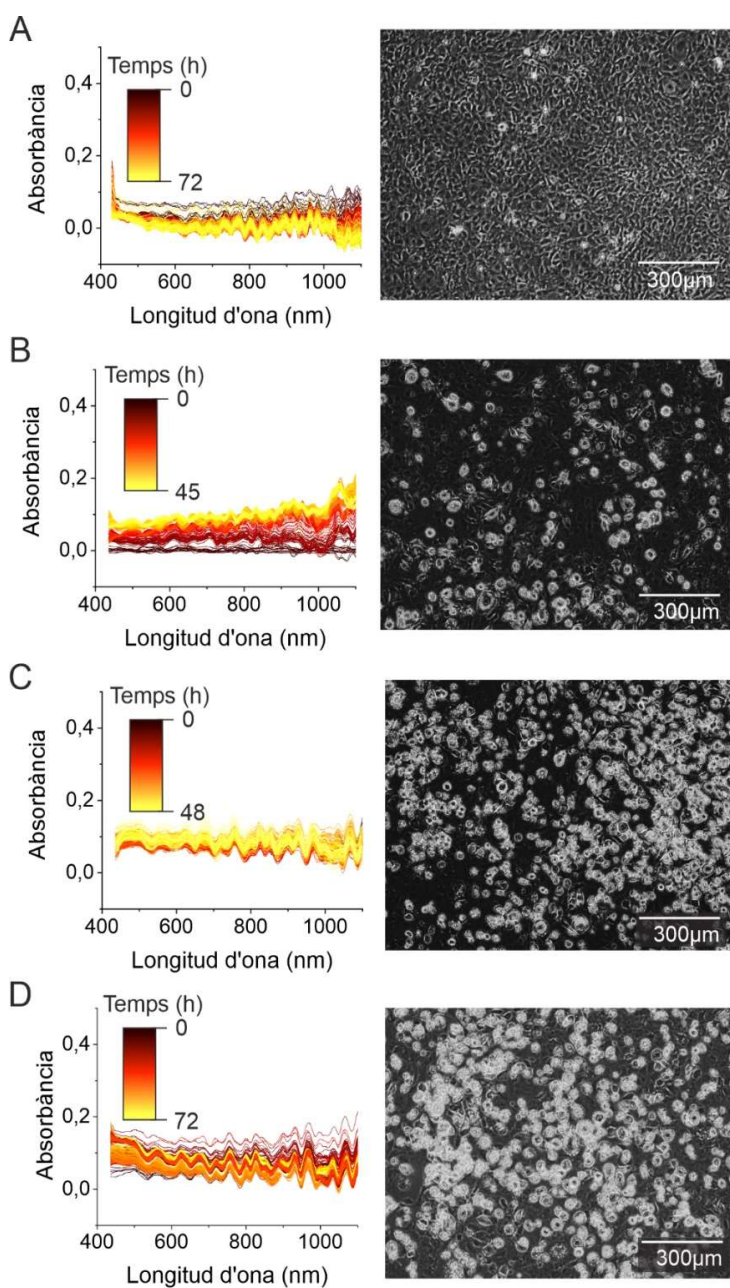


Figura 5.3.9: Espectres d'absorció i imatges de microscòpia durant la diferenciació adipocitària. Cada panell (A–D) mostra, a l'esquerra,

l'espectre d'absorció recollit al llarg del temps, i a la dreta, una imatge de les cèl·lules al final de cada etapa.

Aquesta tendència es mostra amb més claredat a la Figura 5.3.10, que presenta l'evolució temporal de l'absorbància mitjana entre 600 i 700 nm durant tot el procés de diferenciació. L'augment brusc durant l'Etapa 2 és evident i confirma la resposta inicial del sistema als primers canvis adipogènics. No obstant això, a l'Etapa 3, quan la majoria de les cèl·lules ja s'havien diferenciat completament en adipòcits madurs, l'absorbància només va augmentar lleugerament i va tendir a estabilitzar-se, en lloc de continuar incrementant-se, malgrat els clars canvis morfològics observats (Figura 5.3.9C). Aquesta observació podria indicar un efecte de saturació, en què els canvis òptics arriben a un llindar a partir del qual l'acumulació addicional de lípids ja no es tradueix en augments detectables amb la configuració actual del sistema.

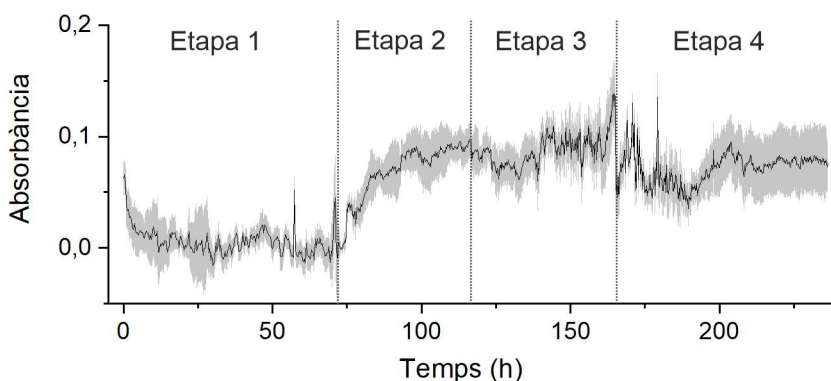


Figura 5.3.10: Evolució temporal de l'absorbància mitjana entre 600 i 700 nm durant la diferenciació d'adipòcits.

Durant l'etapa 4, els valors d'absorbància van fluctuar lleugerament però sense seguir una tendència clara (Figura 5.3.9D), fet que

suggereix que la resposta del sensor s'havia estabilitzat. El senyal va continuar sent sensible a petites variacions ambientals o morfològiques, però no va captar canvis addicionals associats al procés de diferenciació.

En resum, el sistema va aconseguir detectar les etapes inicials de la diferenciació d'adipòcits mitjançant una resposta òptica mesurable, especialment durant l'etapa 2. No obstant això, l'evolució posterior només va donar lloc a canvis lleus en l'absorbància, tot i les evidents transformacions morfològiques. Aquest resultat indica que, tot i que el sistema actual és prometedor per identificar l'inici de l'adipogènesi, encara que no es detectés un pic d'absorbància corresponent a les gotes lipídiques.

5.3.5. Tenyit *post-hoc* amb Oil Red O

Per validar de manera addicional la diferenciació de les cèl·lules 3T3-L1 en adipòcits madurs i per avaluar la resposta òptica del sensor respecte al contingut lipídic, es va realitzar un tenyit *post-hoc* amb Oil Red O. L'Oil Red O és un colorant lipofílic que tenyeix selectivament els lípids neutres, permetent una visualització clara de les gotes lipídiques intracel·lulars mitjançant microscòpia de camp clar. Aquesta tècnica és un assaig estàndard per confirmar la diferenciació adipocitària.

Després de retirar el medi de cultiu, les cèl·lules es van rentar dues vegades amb PBS i es van fixar amb formaldehid al 4% en PBS durant 30 minuts a temperatura ambient. Un cop fixades, es van exposar breument a isopropanol per millorar la permeabilitat i posteriorment es van deixar assecar a l'aire. La solució de tenyit es va preparar diluint Oil Red O comercial en una proporció 3:2 amb

aigua destil·lada. Les cèl·lules es van incubar amb aquesta solució durant una hora abans de fer diversos rentats per eliminar l'excés de colorant. Com es mostra a la Figura 5.3.11A, els adipòcits madurs van mostrar un tenyit vermell intens, confirmant la presència de gotes lipídiques intracel·lulars.

Després del tenyit, es van realitzar mesures òptiques per avaluar la resposta del sensor al colorant, especialment en longituds d'ona associades a l'absorbància de l'Oil Red O. Es van provar dues configuracions de mesura. En la primera, anomenada integrada, la llum passava horitzontalment a través del cultiu utilitzant la placa de Petri modificada amb fibres òptiques integrades. En la segona, s'utilitzava una configuració perpendicular, on el plat Petri es col·locava verticalment en un suport i la llum es dirigia perpendicularment a la superfície del cultiu mitjançant dues fibres òptiques oposades alineades verticalment.

Els espectres d'absorbància obtinguts amb ambdues configuracions es mostren a la Figura 5.3.11B. En tots dos casos es va observar un pic clar al voltant de 530 nm, corresponent a l'absorbància de l'Oil Red O. No obstant això, la intensitat del senyal era diferent; en la configuració horitzontal, l'absorbància va assolir 0,2 unitats (amb correcció de la dispersió), mentre que en la configuració perpendicular l'absorbància va ser de 0,056 unitats. Aquest resultat indica que la configuració de fibra integrada va oferir una sensibilitat superior al contingut lipídic tenyit, probablement degut a un camí òptic més llarg a través de la capa cel·lular.

Aquests resultats confirmen l'acumulació de lípids tant per mitjà de tècniques visuals com òptiques, i posen en relleu el potencial del

sistema de fibres òptiques per detectar canvis en el cultiu que afectin l'absorbància.

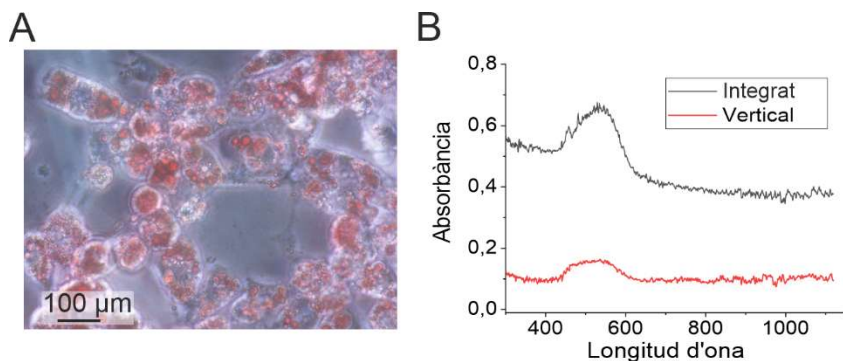


Figura 5.3.11: Tenyit *post-hoc* amb Oil Red O. (A) Imatge microscòpica dels adipòcits 3T3-L1 tenyits, mostrant l'acumulació característica de gotes lipídiques. Barra d'escala = 100 μm . (B) Espectres d'absorbància obtinguts després del tenyit amb Oil Red O utilitzant dues configuracions de mesura: horitzontal (negre) i perpendicular (vermell).

6. Discussió general

Aquest capítol presenta una anàlisi crítica dels sensors desenvolupats (ISFETs funcionalitzats amb fibroïna i amperomètric enzimàtic, òptic), destacant les seves prestacions en monitoratge cel·lular continu.

En aquesta tesi s'ha abordat el desenvolupament i caracterització de tres plataformes sensorials destinades a la monitorització cel·lular *in vitro*: un sensor òptic basat en guies òptiques cel·lulars, un sensor potenciomètric tipus ISFET funcionalitzat amb fibroïna de seda, i un sensor amperomètric enzimàtic per a la detecció de glucosa, també funcionalitzat amb fibroïna. Aquests sensors han estat dissenyats amb l'objectiu d'augmentar la durabilitat, la sensibilitat i la capacitat de monitorització en temps real, responnent a les limitacions observades en sistemes comercials i acadèmics, tal com s'ha exposat al capítol 2.5 de la introducció. Addicionalment, s'ha treballat en el desenvolupament preliminar d'una plataforma tipus MEA i un sensor ChemFET, que es presenten a l'annex a causa de la seva rellevància, tot i que no formen part del nucli d'aquesta tesi.

Sensor ISFET funcionalitzat amb fibroïna

Els sensors potenciomètrics ISFET recoberts amb una membrana de fibroïna de seda han mostrat una millora substancial pel que fa a la seva estabilitat operativa, especialment respecte a la deriva i al *biofouling*. Aquest recobriment, cristal·litzat en forma de làmines β , actua com una barrera semipermeable que impedeix la deposició de proteïnes i altres molècules interferents, mantenint l'accessibilitat als ions H^+ necessaris per a la detecció de pH.

Els sensors van ser provats en medis de cultiu cel·lular complexes (neurones, Neuro-2a i HEK293T), on van mantenir una resposta estable durant més de 70 hores sense recalibratge, en comparació amb les 8-10 hores típiques dels ISFETs no modificats. A més, la variabilitat entre sensors es va veure reduïda, millorant la reproductibilitat. Aquests resultats superen significativament la funcionalitat descrita en la

literatura [184], on molts sensors potenciomètrics no mantenen estabilitat en medis biològics més enllà de les 20-30 hores [187], [205].

Sensor amperomètric enzimàtic per a glucosa

El sensor amperomètric funcionalitzat amb fibroïna i dopat amb glucosa oxidasa (GOx) i tetrametilbenzidina (TMB) ha mostrat una elevada sensibilitat (0,16 $\mu\text{A}/\text{mM}$), un baix límit de detecció (0,5 mM), i una bona estabilitat operativa durant 60 hores de monitorització contínua. Es va mantenir una resposta estable durant gairebé 90 hores. El sensor va mostrar robustesa enfront d'interferències químiques (oxigen, pH, àcid ascòrbic), i la cristal·lització del GOx va ser confirmada mitjançant estudis d'estabilitat estructural (FTIR, XRD).

En aplicacions cel·lulars, el sensor va ser capaç de detectar en temps real el consum de glucosa per part de cèl·lules Neuro-2a, correlant-se amb resultats d'assajos comercials. L'aplicació d'AICAR va evidenciar una disminució ràpida en la concentració de glucosa, que el sensor va capturar en temps real. Aquest nivell de resolució temporal no es pot assolir amb mètodes comercials que requereixen mostreig.

Els resultats obtinguts amb aquest sensor superen les limitacions descrites en sensors amperomètrics de la literatura, on la durabilitat rarament supera els 4 dies [190], [205] o no hi ha un mètode estàndard de referència [195], [198], [200]. A més, el sensor ofereix una resposta més lineal i amb menor desviació respecte sensors que mostren un drift important o necessiten calibratge constant [74], [175], [181]. La integració de la fibroïna com a matriu d'immobilització ha demostrat una clara millora en la retenció de l'enzim i en la protecció contra el *biofouling*.

Sensor òptic de fibra per a monitorització d'adipòcits

El sensor òptic desenvolupat ha estat pensat com una plataforma no invasiva per detectar canvis morfològics associats a la diferenciació

d'adipòcits 3T3-L1. El sistema, integrat en una placa de Petri modificada amb fibres òptiques, ha permès realitzar mesures d'absorció basades en la llei de Beer-Lambert i en la dispersió de la llum. El sensor es va calibrar amb colorants de referència i va mostrar una longitud de trajecte òptic efectiva de $0,46 \pm 0,04$ cm, molt propera al valor teòric de 0,5 cm. Els resultats indiquen que el sistema és capaç de detectar canvis en l'espectre, sobretot per la dispersió de la llum, associats a la formació inicial de gotes lipídiques durant les primeres etapes de diferenciació. No obstant això, els canvis espectrals esdevinguts durant les fases més madures van ser mínims i mancaven de pics d'absorció ben definits. L'estabilitat general del sistema, tant mecànica com òptica, va ser satisfactòria, i les mesures posteriors a la tinció amb Oil Red O van confirmar la capacitat del sensor per detectar pics d'absorció dins de la guia òptica cel·lular, mostrant un pic marcat a 530 nm.

Quan es compara aquest sensor amb altres solucions publicades, com els sistemes descrits per Zhang et al. o altres estudis de sensors òptics integrats en LoC, el nostre sistema mostra una operativitat realment contínua i amb alta compatibilitat amb els entorns cel·lulars.

Discussió General

La principal aportació d'aquest treball és el desenvolupament de sensors integrats per a cultius cel·lulars amb capacitat de monitorització contínua, elevada sensibilitat i durabilitat superior, amb mètodes de fabricació amb processos de baix cost. La fabricació en massa dels xips pot abaratir la seva fabricació, i els processos de funcionalització a temperatura ambient i sense passos addicionals permeten una manufacturació assequible. Els sensors presentats superen les principals limitacions dels sistemes revisats en el capítol 2.6: vulnerabilitat al *biofouling*, deriva, poca durabilitat (inferior a 3 dies), i manca de correlació amb estàndards comercials.

En comparació amb sensors revisats com el sistema BIONAS o xCELLigence, els nostres sensors mostren funcionalitats complementàries: mentre que aquells sistemes se centren en impedància, els sensors desenvolupats cobreixen pH, glucosa i morfologia cel·lular, abastant un ventall més ampli de paràmetres fisiològics rellevants.

A més, el present treball demostra que és factible fabricar sensors integrats dins de formats estàndard de cultiu cel·lular (plaques de Petri, microxips), mantenint compatibilitat amb protocols estàndard i possibilitant la seva integració en sistemes lab-on-a-chip.

Aquest treball valida l'estratègia d'integrar materials funcionals naturals, com la fibroïna, en sistemes electrònics i òptics per millorar-ne la funcionalitat en entorns biològics complexos. Tant a nivell d'estabilitat operativa com de sensibilitat analítica, els sensors desenvolupats demostren que es pot assolir una monitorització contínua, robusta i d'alt rendiment durant múltiples dies, fet que representa una millora significativa respecte a l'estat de l'art.

Aquestes plataformes obren la porta a aplicacions futures en bioenginyeria, medicina personalitzada i cribratge farmacològic, on la capacitat de fer un seguiment continu, no invasiu i fiable de paràmetres cel·lulars clau és essencial. Les millores introduïdes podrien ser traslladades a altres sistemes sensorials per abordar reptes similars en altres tipus de cultius o sistemes organ-on-a-chip.

7. Conclusions

Aquesta tesi ha abordat el repte de desenvolupar sensors robustos, integrats i funcionals per a la monitorització contínua de paràmetres químics i metabòlics en cultius cel·lulars en entorns *lab-on-a-chip*. A través de l'aplicació de tecnologies òptiques, potenciomètriques i electroquímiques, s'ha buscat superar limitacions crítiques de les plataformes actuals, com la curta durabilitat operativa, el *biofouling*, la deriva de senyal i la manca de sistemes realment integrats.

D'acord amb els objectius establerts:

- Els sensors potenciomètrics del tipus ISFET funcionalitzats amb fibroïna de seda han mostrat una millora substancial en la seva estabilitat i resistència al *biofouling* en medis complexos com els de cultiu neuronal. La capa de fibroïna cristal·litzada ha actuat com a filtre selectiu, permetent la difusió d'ions d'hidrogen mentre bloquejava proteïnes i altres compostos interferents. Aquesta funcionalització ha estès l'operativitat dels sensors fins a 70 hores sense recalibratge, millorant significativament la seva viabilitat en monitoratge real.
- Els sensors amperomètrics funcionalitzats amb fibroïna, amb GOx i TMB integrats, han mostrat una alta estabilitat i fiabilitat en condicions de cultiu cel·lular, incloent monitoratges de més de 90 hores en medis Neuro-2a i la detecció en temps real de respostes metabòliques induïdes farmacològicament.
- Pel que fa al sensor òptic, s'ha desenvolupat una plataforma basada en fibra òptica integrada a una placa de cultiu, orientada a monitoritzar en temps real la diferenciació de preadipòcits 3T3-L1. El sistema ha estat capaç de detectar variacions en

l'espectre d'absorbància durant les fases inicials de diferenciació i, després de la tinció amb Oil Red O, ha mostrat una clara resposta associada a l'acumulació lipídica. Malgrat la sensibilitat limitada durant l'etapa final de diferenciació, aquest sensor representa una aportació rellevant per a la monitorització cel·lular.

8. Perspectives de futur

Els resultats obtinguts en aquesta tesi doctoral obren múltiples línies de recerca futures orientades a l'optimització i ampliació dels sistemes de monitoratge desenvolupats.

Pel que fa al sensor òptic, una de les millores més immediates seria la implementació de *scaffolds* tridimensionals per al cultiu cel·lular i representaria un avanç notable: en comptes de treballar amb monocapes 2D, els cultius 3D proporcionarien un model més fisiològicament rellevant, amb un nombre major de cèl·lules que podrien interactuar amb la llum, augmentant la resposta òptica i, per tant, la sensibilitat del sistema. A més, la fabricació dels dispositius a nivell de oblies permetria aconseguir un alineament més precís de les fibres òptiques, reduint així les pèrdues de llum i millorant significativament la sensibilitat del sensor.

Respecte als ISFETs funcionalitzats amb fibroïna, un futur desenvolupament clau seria la integració d'un elèctrode de referència durador o la implementació d'un REFET directament en el xip. Aquesta millora proporcionaria una referència més estable, amb una mínima deriva, permetent una integració més compacta del sensor dins de plataformes lab-on-a-chip, essencial per a aplicacions miniaturitzades. En relació als ChemFETs discutits a l'Annex C, una estratègia prometedora seria modificar la matriu de fibroïna per augmentar-ne la impermeabilitat i, així, millorar la selectivitat i especificitat cap als ions d'interès. Aquesta modificació podria aconseguir-se mitjançant la cristal·lització de la fibroïna utilitzant etanol o altres dissolvents orgànics, processos que s'ha vist que incrementen la hidrofobicitat del material. Paral·lelament, seria interessant explorar nous ionòfors per detectar altres ions d'interès metabòlic, com el calci o el potassi,

paràmetres de gran importància en el seguiment de l'activitat i viabilitat cel·lular.

Pel que fa als MEA (Microelectrode Arrays) discutits a l'Annex B, una futura millora seria la fabricació del substrat sobre vidre, permetent la visualització de les cèl·lules amb tècniques de microscòpia òptica. A més, el desenvolupament d'elèctrodes tridimensionals facilitaria el contacte amb estructures biològiques complexes, com organoides, millorant el registre d'activitat en sistemes 3D.

Quant al sensor amperomètric enzimàtic, s'hauria d'explorar la integració d'un elèctrode de referència directament al xip per potenciar la miniaturització i robustesa del sistema. També seria rellevant buscar formulacions que amplïïn el rang lineal de detecció, per adaptar el sensor a cultius amb concentracions de glucosa superiors a les fisiològiques habituals. D'altra banda, la immobilització d'altres enzims permetria desenvolupar sensors per a nous paràmetres d'interès, com ara lactat [269] o oxigen [270], fonamentals en l'estudi del metabolisme cel·lular.

De forma general, una direcció estratègica futura seria el desenvolupament d'un lab-on-a-chip multidetector, on s'integressin tots els sensors desenvolupats en aquesta tesi en una única plataforma de co-cultiu, evolucionant cap a un sistema d'organ-on-a-chip. Un exemple especialment prometedori seria el co-cultiu de neurones i adipòcits, atès que estudis recents suggereixen que les neurones poden modular la diferenciació dels adipòcits [271]. La integració d'un sistema d'aquest tipus proporcionaria una eina potent per a l'estudi de la interacció cel·lular i la fisiologia multicel·lular en condicions controlades.

9. Referències

- [1] M. W. Glacken, R. J. Fleischaker, i A. J. Sinskey, «Reduction of waste product excretion via nutrient control: Possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells», *Biotechnol Bioeng*, vol. 28, núm. 9, p. 1376-1389, 1986, doi: 10.1002/bit.260280912.
- [2] Y. Fan *et al.*, «A Multi-Pronged Investigation Into the Effect of Glucose Starvation and Culture Duration on Fed-Batch CHO Cell Culture», *Biotechnol. Bioeng*, vol. 112, p. 2172-2184, 2015, doi: 10.1002/bit.2562.
- [3] M. Tozzi, J. B. Hansen, i I. Novak, «Pannexin-1 mediated ATP release in adipocytes is sensitive to glucose and insulin and modulates lipolysis and macrophage migration», *Acta Physiologica*, vol. 228, núm. 2, feb. 2020, doi: 10.1111/apha.13360.
- [4] D. Hertig *et al.*, «Live monitoring of cellular metabolism and mitochondrial respiration in 3D cell culture system using NMR spectroscopy», *Analyst*, vol. 146, núm. 13, p. 4326-4339, jul. 2021, doi: 10.1039/d1an00041a.
- [5] M. G. V. Heiden, L. C. Cantley, i C. B. Thompson, «Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation», *Science (1979)*, vol. 324, núm. 5930, p. 1029-1033, maig 2009, doi: 10.1126/science.1160809.
- [6] Nature portfolio, «lab-on-a-chip». Consulta: 29 juny 2025. [En línia]. Disponible a: <https://www.nature.com/subjects/lab-on-a-chip>
- [7] G. M. Whitesides, «The origins and the future of microfluidics», *Nature*, vol. 442, núm. 7101, p. 368-373, jul. 2006, doi: 10.1038/nature05058.
- [8] L. Hood i L. Rowen, «The human genome project: big science transforms biology and medicine», *Genome Med*, vol. 5, núm. 9, p. 79, 2013, doi: 10.1186/gm483.
- [9] S. Ambardar, R. Gupta, D. Trakroo, R. Lal, i J. Vakhlu, «High Throughput Sequencing: An Overview of Sequencing Chemistry»,

- Indian J Microbiol*, vol. 56, núm. 4, p. 394-404, des. 2016, doi: 10.1007/s12088-016-0606-4.
- [10] D. Mijatovic, J. C. T. Eijkel, i A. van den Berg, «Technologies for nanofluidic systems: top-down vs. bottom-up—a review», *Lab Chip*, vol. 5, núm. 5, p. 492, 2005, doi: 10.1039/b416951d.
- [11] S. C. Terry, J. H. Herman, i J. B. Angell, «A Gas Chromatographic Air Analyzer Fabricated on a Silicon Wafer», *IEEE Trans Electron Devices*, vol. 26, núm. 12, p. 1880-1886, 1979, doi: 10.1109/T-ED.1979.19791.
- [12] A. Manz, N. Graber, i H. M. Widmer, «Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing», *Sens Actuators B Chem*, vol. 1, núm. 1-6, p. 244-248, gen. 1990, doi: 10.1016/0925-4005(90)80209-I.
- [13] D. Zicha, G. A. Dunn, i A. F. Brown, «A new direct-viewing chemotaxis chamber», *J Cell Sci*, vol. 99, núm. 4, p. 769-775, ago. 1991, doi: 10.1242/jcs.99.4.769.
- [14] A. Liga, J. A. S. Morton, i M. Kersaudy-Kerhoas, «Safe and cost-effective rapid-prototyping of multilayer PMMA microfluidic devices», *Microfluid Nanofluidics*, vol. 20, núm. 12, p. 164, des. 2016, doi: 10.1007/s10404-016-1823-1.
- [15] Y. Xia i G. M. Whitesides, «Soft Lithography», *Angew Chem Int Ed Engl*, vol. 37, p. 550-575, març 1998, doi: 10.1002/(SICI)1521-3773(19980316)37:5<550::AID-ANIE550>3.0.CO;2-G.
- [16] J. C. McDonald *et al.*, «Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)», *Electrophoresis*, vol. 21, núm. 1, p. 27-40, gen. 2000, doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(20000101)21:1<27::AID-ELPS27>3.0.CO;2-C.
- [17] S. K. Sia i G. M. Whitesides, «Microfluidic devices fabricated in Poly(dimethylsiloxane) for biological studies», *Electrophoresis*, vol. 24, núm. 21, p. 3563-3576, nov. 2003, doi: 10.1002/elps.200305584.
- [18] M. A. Unger, H.-P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer, i S. R. Quake, «Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft

- Lithography», *Science* (1979), vol. 288, núm. 5463, p. 113-116, abr. 2000, doi: 10.1126/science.288.5463.113.
- [19] D. C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. A. Schueller, i G. M. Whitesides, «Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane)», *Anal Chem*, vol. 70, núm. 23, p. 4974-4984, des. 1998, doi: 10.1021/ac980656z.
- [20] J. C. McDonald i G. M. Whitesides, «Poly(dimethylsiloxane) as a Material for Fabricating Microfluidic Devices», *Acc Chem Res*, vol. 35, núm. 7, p. 491-499, jul. 2002, doi: 10.1021/ar010110q.
- [21] S.-S. D. Carter *et al.*, «PDMS leaching and its implications for on-chip studies focusing on bone regeneration applications», *Organs-on-a-Chip*, vol. 2, p. 100004, des. 2020, doi: 10.1016/j.ooc.2020.100004.
- [22] M. W. Toepke i D. J. Beebe, «PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications», *Lab Chip*, vol. 6, núm. 12, p. 1484, 2006, doi: 10.1039/b612140c.
- [23] K. J. Regehr *et al.*, «Biological implications of polydimethylsiloxane-based microfluidic cell culture», *Lab Chip*, vol. 9, núm. 15, p. 2132, 2009, doi: 10.1039/b903043c.
- [24] J. Liu, C.-F. Chen, C.-W. Tsao, C.-C. Chang, C.-C. Chu, i D. L. DeVoe, «Polymer Microchips Integrating Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography Using Reversed-Phase Polymethacrylate Monoliths», *Anal Chem*, vol. 81, núm. 7, p. 2545-2554, abr. 2009, doi: 10.1021/ac802359e.
- [25] H. Becker i U. Heim, «Hot embossing as a method for the fabrication of polymer high aspect ratio structures», *Sens Actuators A Phys*, vol. 83, núm. 1-3, p. 130-135, maig 2000, doi: 10.1016/S0924-4247(00)00296-X.
- [26] A. W. Martinez, S. T. Phillips, i G. M. Whitesides, «Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, núm. 50, p. 19606-19611, des. 2008, doi: 10.1073/pnas.0810903105.

- [27] Z. Zheng *et al.*, «3D Bioprinting of Self-Standing Silk-Based Bioink», *Adv Healthc Mater*, vol. 7, núm. 6, març 2018, doi: 10.1002/adhm.201701026.
- [28] T. M. Squires i S. R. Quake, «Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale», *Rev Mod Phys*, vol. 77, núm. 3, p. 977-1026, oct. 2005, doi: 10.1103/RevModPhys.77.977.
- [29] Marc D. Wittenberg i Edward T. Gilbert-Kawai, «Reynold's number (and turbulent flow)», en *Essential Equations for Anaesthesia*, Cambridge University Press, 2014, p. 21-23. doi: 10.1017/CBO9781139565387.013.
- [30] D. Mark, S. Haeberle, G. Roth, F. von Stetten, i R. Zengerle, «Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications», *Chem Soc Rev*, vol. 39, núm. 3, p. 1153, 2010, doi: 10.1039/b820557b.
- [31] M. Zimmermann, H. Schmid, P. Hunziker, i E. Delamarche, «Capillary pumps for autonomous capillary systems», *Lab Chip*, vol. 7, núm. 1, p. 119-125, 2007, doi: 10.1039/b609813d.
- [32] A. P. Iakovlev, A. S. Erofeev, i P. V. Gorelkin, «Novel Pumping Methods for Microfluidic Devices: A Comprehensive Review», *Biosensors (Basel)*, vol. 12, núm. 11, p. 956, nov. 2022, doi: 10.3390/bios12110956.
- [33] T. E. de Groot, K. S. Veserat, E. Berthier, D. J. Beebe, i A. B. Theberge, «Surface-tension driven open microfluidic platform for hanging droplet culture», *Lab Chip*, vol. 16, núm. 2, p. 334-344, 2016, doi: 10.1039/C5LC01353D.
- [34] C. K. Byun, K. Abi-Samra, Y. Cho, i S. Takayama, «Pumps for microfluidic cell culture», *Electrophoresis*, vol. 35, núm. 2-3, p. 245-257, feb. 2014, doi: 10.1002/elps.201300205.
- [35] X. Wang, C. Cheng, S. Wang, i S. Liu, «Electroosmotic pumps and their applications in microfluidic systems», *Microfluid Nanofluidics*, vol. 6, núm. 2, p. 145-162, feb. 2009, doi: 10.1007/s10404-008-0399-9.
- [36] A. K. Jahromi, M. Saadatmand, M. Eghbal, i L. P. Yeganeh, «Development of simple and efficient Lab-on-a-Disc platforms for

- automated chemical cell lysis», *Sci Rep*, vol. 10, núm. 1, p. 11039, jul. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-67995-3.
- [37] E. K. Sackmann, A. L. Fulton, i D. J. Beebe, «The present and future role of microfluidics in biomedical research», *Nature*, vol. 507, núm. 7491, p. 181-189, 2014, doi: 10.1038/nature13118.
- [38] U. A. Gurkan *et al.*, «Next generation microfluidics: fulfilling the promise of lab-on-a-chip technologies», *Lab Chip*, vol. 24, núm. 7, p. 1867-1874, 2024, doi: 10.1039/D3LC00796K.
- [39] B. Zhang i M. Radisic, «Organ-on-A-chip devices advance to market», *Lab Chip*, vol. 17, núm. 14, p. 2395-2420, jul. 2017, doi: 10.1039/c6lc01554a.
- [40] S. S. Ozturk, M. R. Riley, i B. O. Palsson, «Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production», *Biotechnol Bioeng*, vol. 39, núm. 4, p. 418-431, 1992, doi: 10.1002/bit.260390408.
- [41] J. Su *et al.*, «Cell–cell communication: new insights and clinical implications», 1 desembre 2024, *Springer Nature*. doi: 10.1038/s41392-024-01888-z.
- [42] T. Qian, T. M. Heaster, A. R. Houghtaling, K. Sun, K. Samimi, i M. C. Skala, «Label-free imaging for quality control of cardiomyocyte differentiation», *Nat Commun*, vol. 12, núm. 1, p. 4580, jul. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-24868-1.
- [43] J. Bobacka, «Conducting polymer-based solid-state ion-selective electrodes», 2006, *Wiley-VCH Verlag*. doi: 10.1002/elan.200503384.
- [44] X. Muñoz-Berbel *et al.*, «Monolithically integrated biophotonic lab-on-a-chip for cell culture and simultaneous pH monitoring», *Lab Chip*, vol. 13, núm. 21, p. 4239, 2013, doi: 10.1039/c3lc50746g.
- [45] A. M. Kemas i V. M. Lauschke, «Measuring Glucose Consumption and Gluconeogenesis in 3D Human Tissue Cultures with Nanoliter Input Volumes», en *Methods in Molecular Biology*, vol. 2445, Humana Press Inc., 2022, p. 337-349. doi: 10.1007/978-1-0716-2071-7_21.

- [46] M. E. J. Obien, K. Deligkaris, T. Bullmann, D. J. Bakkum, i U. Frey, «Revealing neuronal function through microelectrode array recordings», *Front Neurosci*, vol. 8, gen. 2015, doi: 10.3389/fnins.2014.00423.
- [47] A. Moore *et al.*, «Effects of temperature shift on cell cycle, apoptosis and nucleotide pools in CHO cell batch cultures», Kluwer Academic Publishers, 1997.
- [48] M. G. Kang *et al.*, «Nanogels Derived from Fish Gelatin: Application to Drug Delivery System», *Mar Drugs*, vol. 17, núm. 4, p. 246, abr. 2019, doi: 10.3390/md17040246.
- [49] B. A. Webb, M. Chimenti, M. P. Jacobson, i D. L. Barber, «Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression», *Nat Rev Cancer*, vol. 11, núm. 9, p. 671-677, set. 2011, doi: 10.1038/nrc3110.
- [50] S. Burgstaller *et al.*, «Monitoring extracellular ion and metabolite dynamics with recombinant nanobody-fused biosensors», *iScience*, vol. 25, núm. 9, p. 104907, set. 2022, doi: 10.1016/j.isci.2022.104907.
- [51] M. D. Bootman *et al.*, «Calcium signalling—an overview», *Semin Cell Dev Biol*, vol. 12, núm. 1, p. 3-10, feb. 2001, doi: 10.1006/scdb.2000.0211.
- [52] H. Chen, Z. Luo, X. Lin, Y. Zhu, i Y. Zhao, «Sensors-integrated organ-on-a-chip for biomedical applications», *Nano Res*, vol. 16, núm. 7, p. 10072-10099, jul. 2023, doi: 10.1007/s12274-023-5651-9.
- [53] B. Nagel, H. Dellweg, i L. M. Gierasch, «Glossary for chemists of terms used in biotechnology (IUPAC Recommendations 1992)», *Pure and Applied Chemistry*, vol. 64, núm. 1, p. 143-168, gen. 1992, doi: 10.1351/pac199264010143.
- [54] R. Paschotta, «Optical Sensors - an encyclopedia article», en *RP Photonics Encyclopedia*, RP Photonics AG, 2019. doi: 10.61835/hwa.
- [55] Nature Portfolio, «Optical sensors». Consulta: 29 juny 2025. [En línia]. Disponible a: <https://www.nature.com/subjects/optical-sensors>
- [56] M. Luo *et al.*, «High-Sensitivity Optical Sensors Empowered by Quasi-Bound States in the Continuum in a Hybrid Metal–Dielectric

- Metasurface», *ACS Nano*, vol. 18, núm. 8, p. 6477-6486, feb. 2024, doi: 10.1021/acsnano.3c11994.
- [57] M. A. Butt, «Topic Editorial on Fiber-Optic Sensors», *Micromachines (Basel)*, vol. 15, núm. 12, p. 1452, nov. 2024, doi: 10.3390/mi15121452.
- [58] P. Martin i T. Bianchi, «Organic Carbon Cycling and Transformation», *Treatise on Estuarine and Coastal Science*, vol. 3, p. 164-224, feb. 2024, doi: 10.1016/B978-0-323-90798-9.00061-5.
- [59] L. Rodriguez-Saona, D. P. Aykas, K. R. Borba, i A. Urtubia, «Miniaturization of optical sensors and their potential for high-throughput screening of foods», *Curr Opin Food Sci*, vol. 31, p. 136-150, feb. 2020, doi: 10.1016/j.cofs.2020.04.008.
- [60] S. Jain *et al.*, «Incubating advances in integrated photonics with emerging sensing and computational capabilities», *Appl Phys Rev*, vol. 12, núm. 1, p. 1-29, març 2025, doi: 10.1063/5.0218564.
- [61] G. Grasso *et al.*, «Fluorescent nano- and microparticles for sensing cellular microenvironment: past, present and future applications», *Nanoscale Adv*, vol. 5, núm. 17, p. 4311-4336, 2023, doi: 10.1039/D3NA00218G.
- [62] P. Li i J. Hur, «Utilization of UV-Vis spectroscopy and related data analyses for dissolved organic matter (DOM) studies: A review», *Crit Rev Environ Sci Technol*, vol. 47, núm. 3, p. 131-154, feb. 2017, doi: 10.1080/10643389.2017.1309186.
- [63] F. Cavedo, P. Esmaili, i M. Norgia, «Remote Reflectivity Sensor for Industrial Applications», *Sensors*, vol. 21, núm. 4, p. 1301, feb. 2021, doi: 10.3390/s21041301.
- [64] N. De Acha, C. Elosua, I. Matias, i F. Arregui, «Luminescence-Based Optical Sensors Fabricated by Means of the Layer-by-Layer Nano-Assembly Technique», *Sensors*, vol. 17, núm. 12, p. 2826, des. 2017, doi: 10.3390/s17122826.
- [65] G. Huang *et al.*, «A Review of Optical Interferometry for High-Precision Length Measurement», *Micromachines (Basel)*, vol. 16, núm. 1, p. 6, des. 2024, doi: 10.3390/mi16010006.
-

- [66] R. R. Jones, D. C. Hooper, L. Zhang, D. Wolverson, i V. K. Valev, «Raman Techniques: Fundamentals and Frontiers», 1 desembre 2019, *Springer New York LLC*. doi: 10.1186/s11671-019-3039-2.
- [67] C. Peng *et al.*, «Optical Waveguide Refractive Index Sensor for Biochemical Sensing», *Applied Sciences (Switzerland)*, vol. 13, núm. 6, p. 3829, març 2023, doi: 10.3390/app13063829.
- [68] K. R. Kim i W. Yeo, «Advances in sensor developments for cell culture monitoring», *BMEMat*, vol. 1, núm. 4, des. 2023, doi: 10.1002/bmm2.12047.
- [69] A. Sigaeva, Y. Ong, V. G. Damle, A. Morita, K. J. van der Laan, i R. Schirhagl, «Optical Detection of Intracellular Quantities Using Nanoscale Technologies», *Acc Chem Res*, vol. 52, núm. 7, p. 1739-1749, jul. 2019, doi: 10.1021/acs.accounts.9b00102.
- [70] E. J. Fratz-Berilla, C. Kohnhorst, N. Trunfio, X. Bush, A. Gyorgypal, i C. Agarabi, «Evaluation of single-use optical and electrochemical pH sensors in upstream bioprocessing», *Heliyon*, vol. 10, núm. 3, p. e25512, feb. 2024, doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e25512.
- [71] S. Kumar, A. Iadicicco, S. Kim, D. Tosi, i C. Marques, «Introduction to the feature issue: Advances in Optical Biosensors for Biomedical Applications», *Biomed Opt Express*, vol. 15, núm. 5, p. 3183, maig 2024, doi: 10.1364/BOE.527613.
- [72] N. Pavillon i N. I. Smith, «Non-invasive monitoring of T cell differentiation through Raman spectroscopy», *Sci Rep*, vol. 13, núm. 1, p. 3129, feb. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-29259-8.
- [73] D. G. Smith, «The Beer-Lambert Law», en *Field Guide to Physical Optics*, Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, 2013, p. 7-8. doi: 10.1117/3.883971.ch7.
- [74] X. Wang *et al.*, «Large-scale pathway reconstruction and colorimetric screening accelerate cellular metabolism engineering», *Metab Eng*, vol. 80, p. 107-118, nov. 2023, doi: 10.1016/j.ymben.2023.09.009.
- [75] T. N. Ackermann, «Living Photonics: Lab-on-a-chip technologies for light coupling into biological cells», UAB, 2017.

- [76] M. Schürmann, J. Scholze, P. Müller, J. Guck, i C. J. Chan, «Cell nuclei have lower refractive index and mass density than cytoplasm», *J Biophotonics*, vol. 9, núm. 10, p. 1068-1076, oct. 2016, doi: 10.1002/jbio.201500273.
- [77] S. Kedenburg, M. Vieweg, T. Gissibl, i H. Giessen, «Linear refractive index and absorption measurements of nonlinear optical liquids in the visible and near-infrared spectral region», *Opt Mater Express*, vol. 2, núm. 11, p. 1588, nov. 2012, doi: 10.1364/OME.2.001588.
- [78] D. King *et al.*, «Living photonics: monitoring light propagation through cells (LiPhos)», S. van den Driesche, Ed., juny 2015, p. 95180M. doi: 10.1117/12.2181306.
- [79] A. Richard, U. White, C. Elks, i M. Stephens, «Adipose Tissue: Physiology to Metabolic Dysfunction». Consulta: 29 juny 2025. [En línia]. Disponible a: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555602/>
- [80] L. Scheja i J. Heeren, «Metabolic interplay between white, beige, brown adipocytes and the liver», *J Hepatol*, vol. 64, núm. 5, p. 1176-1186, maig 2016, doi: 10.1016/j.jhep.2016.01.025.
- [81] Anna Whitehead *et al.*, «Brown Adipose Tissue—A Translational Perspective», *Endocr Rev*, vol. 44, núm. 2, p. 354-354, març 2023, doi: 10.1210/endrev/bnac027.
- [82] A. Whitehead *et al.*, «Brown and beige adipose tissue regulate systemic metabolism through a metabolite interorgan signaling axis», *Nat Commun*, vol. 12, núm. 1, p. 1905, març 2021, doi: 10.1038/s41467-021-22272-3.
- [83] H. J. Swatland, «Autofluorescence of adipose tissue measured with fibre optics», *Meat Sci*, vol. 19, núm. 4, p. 277-284, gen. 1987, doi: 10.1016/0309-1740(87)90074-X.
- [84] W. Zhu, A. Wilks, i I. Stojiljkovic, «Degradation of Heme in Gram-Negative Bacteria: the Product of the hemO Gene of Neisseriae Is a Heme Oxygenase», *J Bacteriol*, vol. 182, núm. 23, p. 6783-6790, des. 2000, doi: 10.1128/JB.182.23.6783-6790.2000.

- [85] M. Charconnet i J. Plou, «Seeing beyond Labels: Optical Technologies Reshaping Cell Culture Monitoring in Biomedicine», *ACS Applied Engineering Materials*, vol. 2, núm. 12, p. 2790-2814, des. 2024, doi: 10.1021/acsaenm.4c00613.
- [86] B. M. Spiegelman i J. S. Flier, «Adipogenesis and Obesity: Rounding Out the Big Picture», *Cell*, vol. 87, núm. 3, p. 377-389, nov. 1996, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81359-8.
- [87] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*. Wiley, 2006. doi: 10.1002/0471790303.
- [88] A. P. F. Turner, «Biosensors: sense and sensibility», *Chem Soc Rev*, vol. 42, núm. 8, p. 3184, 2013, doi: 10.1039/c3cs35528d.
- [89] E. Bakker i M. Telting-Diaz, «Electrochemical sensors», *Anal Chem*, vol. 74, núm. 12, p. 2781-2800, juny 2002, doi: 10.1021/ac0202278.
- [90] A. J. . Bard i L. R. . Faulkner, *Electrochemical methods : fundamentals and applications*. John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- [91] P. Bühlmann, E. Pretsch, i E. Bakker, «Carrier-Based Ion-Selective Electrodes and Bulk Optodes. 2. Ionophores for Potentiometric and Optical Sensors», *Chem Rev*, vol. 4, núm. 98, p. 1593-1688, juny 1998, doi: 10.1021/cr970113+.
- [92] F. Beck, «Cyclic voltammetry—simulation and analysis of reaction mechanisms. By David K. Gosser, Jr., VCH, New York 1993, xi, 154 pp., hardcover, DM 124.00, ISBN 3-527-28226-2, disks included (5 1/4" and 3 1/2")», *Electroanalysis*, vol. 7, núm. 3, p. 298-298, març 1995, doi: 10.1002/elan.1140070324.
- [93] B. Haghighi, H. Hamidi, i L. Gorton, «Electrochemical behavior and application of Prussian blue nanoparticle modified graphite electrode», *Sens Actuators B Chem*, vol. 147, núm. 1, p. 270-276, maig 2010, doi: 10.1016/j.snb.2010.03.020.
- [94] N. Jaffrezic-Renault i S. V. Dzyadevych, «Conductometric Microbiosensors for Environmental Monitoring», *Sensors*, vol. 8, núm. 4, p. 2569-2588, abr. 2008, doi: 10.3390/s8042569.

- [95] K. N. Mikhelson, «Ion-selective electrodes in PVC matrix», *Sens Actuators B Chem*, vol. 18, núm. 1-3, p. 31-37, març 1994, doi: 10.1016/0925-4005(94)87051-9.
- [96] A. Attiyat, «A comparative study of the effect of o-nitrophenyl octyl ether and o-nitrophenyl pentyl ether as plasticizers on the response and selectivity of carrier-based liquid membrane ion-selective electrodes», *Talanta*, vol. 35, núm. 10, p. 789-794, oct. 1988, doi: 10.1016/0039-9140(88)80184-X.
- [97] Y. Soda, W. Gao, J. Bosset, i E. Bakker, «Emulsion Doping of Ionophores and Ion-Exchangers into Ion-Selective Electrode Membranes», *Anal Chem*, vol. 92, núm. 21, p. 14319-14324, nov. 2020, doi: 10.1021/acs.analchem.0c02920.
- [98] S. V Kharitonov, «Ion-selective electrodes in medicinal drug determination», *Russian Chemical Reviews*, vol. 76, núm. 4, p. 361-395, abr. 2007, doi: 10.1070/RC2007v076n04ABEH003670.
- [99] U. Oesch, D. Ammann, i W. Simon, «Ion-selective membrane electrodes for clinical use», *Clin Chem*, vol. 32, núm. 8, p. 1448-59, ago. 1986, doi: 1986Aug;32(8):1448-59.
- [100] A. Atwe, A. Gupta, R. Kant, M. Das, I. Sharma, i S. Bhattacharya, «A novel microfluidic switch for pH control using Chitosan based hydrogels», *Microsystem Technologies*, vol. 20, núm. 7, p. 1373-1381, 2014, doi: 10.1007/s00542-014-2112-0.
- [101] Y.-H. Lin, A. Das, M.-H. Wu, T.-M. Pan, i C.-S. Lai, «Microfluidic Chip Integrated with an Electrolyte-Insulator-Semiconductor Sensor for pH and Glucose Level Measurement», *Int. J. Electrochem. Sci*, vol. 8, p. 5886-5901, abr. 2013, doi: 10.1016/S1452-3981(23)14729-8.
- [102] D. Welch i J. B. Christen, «Real-time feedback control of pH within microfluidics using integrated sensing and actuation», 21 març 2014, *Royal Society of Chemistry*. doi: 10.1039/c3lc51205c.
- [103] M. Castellarnau *et al.*, «Integrated cell positioning and cell-based ISFET biosensors», *Sens Actuators B Chem*, vol. 120, núm. 2, p. 615-620, gen. 2007, doi: 10.1016/j.snb.2006.01.057.

- [104] S. Mohri *et al.*, «Measurements of CO₂, lactic acid and sodium bicarbonate secreted by cultured cells using a flow-through type pH/CO₂ sensor system based on ISFET», *Sens Actuators B Chem*, vol. 115, núm. 1, p. 519-525, maig 2006, doi: 10.1016/j.snb.2005.10.029.
- [105] I. Burdallo i C. Jiménez-Jorquera, «Microelectrodes for the measurement of cellular metabolism», en *Procedia Chemistry*, set. 2009, p. 289-292. doi: 10.1016/j.proche.2009.07.072.
- [106] P. Bergveld, «Development, Operation, and Application of the Ion-Sensitive Field-Effect Transistor as a Tool for Electrophysiology», *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. BME-19, núm. 5, p. 342-351, set. 1972, doi: 10.1109/TBME.1972.324137.
- [107] M.-N. Niu, X.-F. Ding, i Q.-Y. Tong, «Effect of two types of surface sites on the characteristics of Si₃N₄-gate pH-ISFETs», *Sens Actuators B Chem*, vol. 37, núm. 1-2, p. 13-17, nov. 1996, doi: 10.1016/S0925-4005(97)80067-6.
- [108] M. Skowronska-Ptasinska, P. D. van der Wal, A. van den Berg, P. Bergveld, E. J. R. Sudhölter, i D. N. Reinhoudt, «Reference field effect transistors based on chemically modified ISFETs», *Anal Chim Acta*, vol. 230, p. 67-73, 1990, doi: 10.1016/S0003-2670(00)82762-2.
- [109] C. Jimenez, A. Bratov, N. Abramova, i A. Baldi, «ISFET Based Sensors: Fundamentals and Applications», en *Encyclopedia of Sensors*, vol. 5, 2006, p. 151-197.
- [110] A. Adami, C. Ress, C. Collini, S. Pedrotti, i L. Lorenzelli, «Development of an integrated electrochemical system for in vitro yeast viability testing», *Biosens Bioelectron*, vol. 40, núm. 1, p. 315-322, feb. 2013, doi: 10.1016/j.bios.2012.07.070.
- [111] K. McLaughlin *et al.*, «An evaluation of ISFET sensors for coastal pH monitoring applications», *Reg Stud Mar Sci*, vol. 12, p. 11-18, abr. 2017, doi: 10.1016/j.rsma.2017.02.008.
- [112] E. Bakker, E. Pretsch, i P. Bühlmann, «Selectivity of potentiometric ion sensors», *Anal Chem*, vol. 72, núm. 6, p. 1127-1133, març 2000, doi: 10.1021/ac991146n.
-

- [113] M. Lehmann *et al.*, «Simultaneous measurement of cellular respiration and acidification with a single CMOS ISFET», *Biosens Bioelectron*, vol. 16, p. 195-203, 2001, doi: 10.1016/S0956-5663(01)00123-3.
 - [114] E. Tomšík *et al.*, «Development of Smart Sensing Film with Nonbiofouling Properties for Potentiometric Detection of Local pH Changes Caused by Bacterial and Yeast Infections Around Orthopedic Implants», *Adv Mater Interfaces*, vol. 10, núm. 5, feb. 2023, doi: 10.1002/admi.202201878.
 - [115] S. Martinoia, N. Rosso, M. Grattarola, L. Lorenzelli, B. Margesin, i M. Zen, «Development of ISFET array-based microsystems for bioelectrochemical measurements of cell populations», *Biosens Bioelectron*, vol. 16, p. 1043-1050, des. 2001, doi: 10.1016/S0956-5663(01)00202-0.
 - [116] X. Chen, H. Zhang, R. H. Tunuguntla, i A. Noy, «Silicon Nanoribbon pH Sensors Protected by a Barrier Membrane with Carbon Nanotube Porins», *Nano Lett*, vol. 19, núm. 2, p. 629-634, feb. 2019, doi: 10.1021/acs.nanolett.8b02898.
 - [117] C. A. Galán-Vidal, «Monoenzymatic Lipase Potentiometric Biosensor for the Food Analysis Based on a pH Sensitive Graphite-epoxy Composite as Transducer», *J Mex Chem Soc*, vol. 59, núm. 1, oct. 2017, doi: 10.29356/jmcs.v59i1.9.
 - [118] S. Srinivas, K. Ashokkumar, K. Sriraghavan, i A. Senthil Kumar, «A prototype device of microliter volume voltammetric pH sensor based on carbazole–quinone redox-probe tethered MWCNT modified three-in-one screen-printed electrode», *Sci Rep*, vol. 11, núm. 1, p. 13905, jul. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-93368-5.
 - [119] T. Liu, R. Liang, i W. Qin, «Anti-fouling TiO₂-Coated Polymeric Membrane Ion-Selective Electrodes with Photocatalytic Self-Cleaning Properties», *Anal Chem*, vol. 95, núm. 16, p. 6577-6585, abr. 2023, doi: 10.1021/acs.analchem.2c05514.
 - [120] S. F. Gonski *et al.*, «Assessment of the suitability of Durafet-based sensors for pH measurement in dynamic estuarine environments»,
-

- Estuar Coast Shelf Sci*, vol. 200, p. 152-168, gen. 2018, doi: 10.1016/j.ecss.2017.10.020.
- [121] R. Sakamoto i H. Nishihara, «Electrochemistry», en *Instrumental Analysis of Coordination Compounds*, Royal Society of Chemistry, 2024, p. 92-120. doi: 10.1039/9781837674978-00092.
- [122] G. Jerkiewicz, «Applicability of Platinum as a Counter-Electrode Material in Electrocatalysis Research», *ACS Catal*, vol. 12, núm. 4, p. 2661-2670, feb. 2022, doi: 10.1021/acscatal.1c06040.
- [123] Y. Li *et al.*, «Amperometric Highly Sensitive Phosphate Ion Sensor Based on the Electrochemically Modified Ni Electrode», *Langmuir*, vol. 40, núm. 36, p. 19187-19194, set. 2024, doi: 10.1021/acs.langmuir.4c02342.
- [124] V. Privman, O. Zavalov, i A. Simonian, «Extended Linear Response for Bioanalytical Applications Using Multiple Enzymes», *Anal Chem*, vol. 85, núm. 4, p. 2027-2031, feb. 2013, doi: 10.1021/ac302998y.
- [125] B. Alhalaili, I. N. Popescu, C. O. Rusanescu, i R. Vidu, «Microfluidic Devices and Microfluidics-Integrated Electrochemical and Optical (Bio)Sensors for Pollution Analysis: A Review», *Sustainability*, vol. 14, núm. 19, p. 12844, oct. 2022, doi: 10.3390/su141912844.
- [126] G. Song, H. Han, i Z. Ma, «Anti-Fouling Strategies of Electrochemical Sensors for Tumor Markers», *Sensors*, vol. 23, núm. 11, p. 5202, maig 2023, doi: 10.3390/s23115202.
- [127] J. Cui, K. Mathwig, D. Mampallil, i S. G. Lemay, «Potential-Controlled Adsorption, Separation, and Detection of Redox Species in Nanofluidic Devices», *Anal Chem*, vol. 90, núm. 12, p. 7127-7130, juny 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.8b01719.
- [128] O. Amor-Gutiérrez, E. Costa-Rama, i M. T. Fernández-Abedul, «Paper-Based Enzymatic Electrochemical Sensors for Glucose Determination», *Sensors*, vol. 22, núm. 16, p. 6232, ago. 2022, doi: 10.3390/s22166232.
- [129] F. Martínez-Rojas, E. Castañeda, i F. Armijo, «Conducting polymer applied in a label-free electrochemical immunosensor for the detection prostate-specific antigen using its redox response as an analytical
-

- signal», *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 880, p. 114877, gen. 2021, doi: 10.1016/j.jelechem.2020.114877.
- [130] I. Palchetti i M. Mascini, «Nucleic acid biosensors for environmental pollution monitoring», *Analyst*, vol. 133, núm. 7, p. 846, 2008, doi: 10.1039/b802920m.
- [131] C. K. O'Sullivan, «Aptasensors – the future of biosensing?», *Anal Bioanal Chem*, vol. 372, núm. 1, p. 44-48, gen. 2002, doi: 10.1007/s00216-001-1189-3.
- [132] Q. Liu, C. Wu, H. Cai, N. Hu, J. Zhou, i P. Wang, «Cell-Based Biosensors and Their Application in Biomedicine», *Chem Rev*, vol. 114, núm. 12, p. 6423-6461, juny 2014, doi: 10.1021/cr2003129.
- [133] K. Haupt i K. Mosbach, «Molecularly Imprinted Polymers and Their Use in Biomimetic Sensors», *Chem Rev*, vol. 100, núm. 7, p. 2495-2504, jul. 2000, doi: 10.1021/cr990099w.
- [134] M. S. Belluzo, M. E. Ribone, i C. M. Lagier, «Assembling Amperometric Biosensors for Clinical Diagnostics», *Sensors*, vol. 8, núm. 3, p. 1366-1399, feb. 2008, doi: 10.3390/s8031366.
- [135] S. Rodriguez, M. Alda, M. Marco, i D. BARCELO, «Biosensors for environmental monitoring A global perspective», *Talanta*, vol. 65, núm. 2, p. 291-297, gen. 2005, doi: 10.1016/j.talanta.2004.07.006.
- [136] A. M. Vaidya i U. S. Annapure, «Enzymes in Biosensors for Food Quality Assessment», en *Enzymes in Food Biotechnology*, Elsevier, 2019, p. 659-674. doi: 10.1016/B978-0-12-813280-7.00038-4.
- [137] L. C. Clark i C. Lyons, «Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery», *Ann N Y Acad Sci*, vol. 102, núm. 1, p. 29-45, oct. 1962, doi: 10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x.
- [138] E. H. Yoo i S. Y. Lee, «Glucose biosensors: An overview of use in clinical practice», maig 2010. doi: 10.3390/s100504558.
- [139] A. Harper i M. R. Anderson, «Electrochemical glucose sensors-developments using electrostatic assembly and carbon nanotubes for biosensor construction», setembre 2010. doi: 10.3390/s100908248.

- [140] M. M. Rahman, A. J. S. Ahammad, J. H. Jin, S. J. Ahn, i J. J. Lee, «A comprehensive review of glucose biosensors based on nanostructured metal-oxides», *Sensors*, vol. 10, núm. 5, p. 4855-4886, maig 2010, doi: 10.3390/s100504855.
- [141] D. Lloyd. Williams, A. R. Doig, i Alexander. Korosi, «Electrochemical-enzymatic analysis of blood glucose and lactate», *Anal Chem*, vol. 42, núm. 1, p. 118-121, gen. 1970, doi: 10.1021/ac60283a032.
- [142] R. K. Nagarale, J. M. Lee, i W. Shin, «Electrochemical properties of ferrocene modified polysiloxane/chitosan nanocomposite and its application to glucose sensor», *Electrochim Acta*, vol. 54, núm. 26, p. 6508-6514, nov. 2009, doi: 10.1016/j.electacta.2009.06.027.
- [143] A. De Marcellis i G. Ferri, «Physical and Chemical Sensors», 2011, Ph. and Ch. Sensors, p. 1-35. doi: 10.1007/978-90-481-9828-3_1.
- [144] T. Pedersen, P. Fojan, A. K. N. Pedersen, N. E. Magnusson, i L. Gurevich, «Amperometric Biosensor for Quantitative Measurement Using Sandwich Immunoassays», *Biosensors (Basel)*, vol. 13, núm. 5, p. 519, maig 2023, doi: 10.3390/bios13050519.
- [145] H. Yang, C. Gong, L. Miao, i F. Xu, «A glucose biosensor based on horseradish peroxidase and glucose oxidase co-entrapped in carbon nanotubes modified electrode», *Int J Electrochem Sci*, vol. 12, núm. 6, p. 4958-4969, juny 2017, doi: 10.20964/2017.06.05.
- [146] Z. Zhu, L. Garcia-Gancedo, A. J. Flewitt, H. Xie, F. Moussy, i W. I. Milne, «A critical review of Glucose biosensors based on Carbon nanomaterials: Carbon nanotubes and graphene», maig 2012. doi: 10.3390/s120505996.
- [147] E. Sapountzi, M. Braiek, F. Vocanson, J. F. Chateaux, N. Jaffrezic-Renault, i F. Lagarde, «Gold nanoparticles assembly on electrospun poly(vinyl alcohol)/poly(ethyleneimine)/glucose oxidase nanofibers for ultrasensitive electrochemical glucose biosensing», *Sens Actuators B Chem*, vol. 238, p. 392-401, gen. 2017, doi: 10.1016/j.snb.2016.07.062.
- [148] V. Dudkaitė i G. Bagdžiūnas, «Functionalization of Glucose Oxidase in Organic Solvent: Towards Direct Electrical Communication across

- Enzyme-Electrode Interface», *Biosensors (Basel)*, vol. 12, núm. 5, maig 2022, doi: 10.3390/bios12050335.
- [149] R. Vanella, C. Küng, A. A. Schoepfer, V. Doffini, J. Ren, i M. A. Nash, «Understanding activity-stability tradeoffs in biocatalysts by enzyme proximity sequencing», *Nat Commun*, vol. 15, núm. 1, p. 1807, feb. 2024, doi: 10.1038/s41467-024-45630-3.
- [150] T. Bhardwaj, «A Review on Immobilization Techniques of Biosensors», *IJERT*, vol. 3, núm. 5, p. 294-298, maig 2014, [En línia]. Disponible a: www.ijert.org
- [151] W. Putzbach i N. Ronkainen, «Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review», *Sensors*, vol. 13, núm. 4, p. 4811-4840, abr. 2013, doi: 10.3390/s130404811.
- [152] S. A. Bhakta, E. Evans, T. E. Benavidez, i C. D. Garcia, «Protein adsorption onto nanomaterials for the development of biosensors and analytical devices: A review», *Anal Chim Acta*, vol. 872, p. 7-25, maig 2015, doi: 10.1016/j.aca.2014.10.031.
- [153] Z. Kadi, C. Slim, i S. Griveau, «Activation Methods of Carboxyl Functions for Enhanced Aptamer Immobilization on Glassy Carbon for Application to Electrochemical Biosensing», *Langmuir*, vol. 41, núm. 7, p. 4796-4805, feb. 2025, doi: 10.1021/acs.langmuir.4c04835.
- [154] F. López-Gallego, J. M. Guisán, i L. Betancor, «Glutaraldehyde-Mediated Protein Immobilization», 2013, p. 33-41. doi: 10.1007/978-1-62703-550-7_3.
- [155] M. Reháč, M. Šnejdárková, i M. Otto, «Application of biotin-streptavidin technology in developing a xanthine biosensor based on a self-assembled phospholipid membrane», *Biosens Bioelectron*, vol. 9, núm. 4-5, p. 337-341, gen. 1994, doi: 10.1016/0956-5663(94)80033-2.
- [156] N. K. Chaki i K. Vijayamohanan, «Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications», *Biosens Bioelectron*, vol. 17, núm. 1-2, p. 1-12, gen. 2002, doi: 10.1016/S0956-5663(01)00277-9.

- [157] S. Datta, L. R. Christena, i Y. R. S. Rajaram, «Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials», 3 *Biotech*, vol. 3, núm. 1, p. 1-9, feb. 2013, doi: 10.1007/s13205-012-0071-7.
- [158] A. Marquez Maqueda, «Alginate and silk fibroin technologies for biosensing», UAB, 2020.
- [159] S. Meredith, S. Xu, M. T. Meredith, i S. D. Minteer, «Hydrophobic Salt-modified Nafion for Enzyme Immobilization and Stabilization», *Journal of Visualized Experiments*, núm. 65, jul. 2012, doi: 10.3791/3949.
- [160] H. Jin i D. Kaplan, «Mechanism of silk processing in insects and spiders», núm. 424, p. 1057-1061, ago. 2003, doi: 10.1038/nature01809.
- [161] S. Inoue, K. Tanaka, F. Arisaka, S. Kimura, K. Ohtomo, i S. Mizuno, «Silk fibroin of Bombyx mori is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 molar ratio», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, núm. 51, p. 40517-40528, des. 2000, doi: 10.1074/jbc.M006897200.
- [162] C. Z. Zhou, F. Confalonieri, M. Jacquet, R. Perasso, Z. G. Li, i J. Janin, «Silk fibroin: Structural implications of a remarkable amino acid sequence», *Proteins: Structure, Function and Genetics*, vol. 44, núm. 2, p. 119-122, ago. 2001, doi: 10.1002/prot.1078.
- [163] T. Asakura, «Structure of Silk I (Bombyx mori Silk Fibroin before Spinning) -Type II β -Turn, Not α -Helix-», *Molecules*, vol. 26, núm. 12, p. 3706, juny 2021, doi: 10.3390/molecules26123706.
- [164] Z. Hu *et al.*, «Stability and biodegradation of silk fibroin/hyaluronic acid nerve conduits», *Compos B Eng*, vol. 200, nov. 2020, doi: 10.1016/j.compositesb.2020.108222.
- [165] A. Márquez *et al.*, «Reusable Colorimetric Biosensors on Sustainable Silk-Based Platforms», *ACS Appl Bio Mater*, vol. 7, núm. 2, p. 853-862, feb. 2024, doi: 10.1021/acsabm.3c00872.
- [166] S. Kim *et al.*, «All-water-based electron-beam lithography using silk as a resist», *Nat Nanotechnol*, vol. 9, núm. 4, p. 306-310, 2014, doi: 10.1038/nnano.2014.47.

- [167] S. Kaushik, P. D. Thungon, i P. Goswami, «Silk Fibroin: An Emerging Biocompatible Material for Application of Enzymes and Whole Cells in Bioelectronics and Bioanalytical Sciences», *ACS Biomater Sci Eng*, vol. 6, núm. 8, p. 4337-4355, ago. 2020, doi: 10.1021/acsbiomaterials.9b01971.
- [168] G. Yankov *et al.*, «Investigation of the Nonlinear Optical Properties of Silk Fibroin (SF) Using the Z-Scan Method», *Materials*, vol. 18, núm. 5, p. 1052, feb. 2025, doi: 10.3390/ma18051052.
- [169] A. B. Li, J. A. Kluge, N. A. Guziewicz, F. G. Omenetto, i D. L. Kaplan, «Silk-based stabilization of biomacromolecules», *Journal of Controlled Release*, vol. 219, p. 416-430, des. 2015, doi: 10.1016/j.jconrel.2015.09.037.
- [170] A. Márquez *et al.*, «Nanoporous silk films with capillary action and size-exclusion capacity for sensitive glucose determination in whole blood», *Lab Chip*, vol. 21, núm. 3, p. 608-615, feb. 2021, doi: 10.1039/d0lc00702a.
- [171] J. Kieninger, A. Weltin, H. Flamm, i G. A. Urban, «Microsensor systems for cell metabolism – from 2D culture to organ-on-chip», *Lab Chip*, vol. 18, núm. 9, p. 1274-1291, 2018, doi: 10.1039/C7LC00942A.
- [172] D. Nmagu, S. K. Singh, i K. H. Lee, «Creation of monoclonal antibody expressing CHO cell lines grown with sodium butyrate and characterization of resulting antibody glycosylation», en *Methods in Enzymology*, vol. 660, Academic Press Inc., 2021, p. 267-295. doi: 10.1016/bs.mie.2021.06.039.
- [173] J. Huang *et al.*, «Bacteriorhodopsin-Based pH Sensor for Cell Culture Condition Regulation», *Materials*, vol. 18, núm. 3, feb. 2025, doi: 10.3390/ma18030478.
- [174] N. Bhalla, S. Sathish, A. Sinha, i A. Q. Shen, «Large-Scale Nanophotonic Structures for Long-Term Monitoring of Cell Proliferation», *Adv Biosyst*, vol. 2, núm. 4, abr. 2018, doi: 10.1002/adbi.201700258.

- [175] S. Prill, M. S. Jaeger, i C. Duschl, «Long-term microfluidic glucose and lactate monitoring in hepatic cell culture», *Biomicrofluidics*, vol. 8, núm. 3, maig 2014, doi: 10.1063/1.4876639.
- [176] C. Wang *et al.*, «An enzyme-particle hybrid ink for one step screen-printing and long-term metabolism monitoring», *Anal Chim Acta*, vol. 1221, ago. 2022, doi: 10.1016/j.aca.2022.340168.
- [177] Y. Tang *et al.*, «Screen-Printed Glucose Sensors Modified with Cellulose Nanocrystals (CNCs) for Cell Culture Monitoring», *Biosensors (Basel)*, vol. 10, núm. 9, set. 2020, doi: 10.3390/bios10090125.
- [178] Y. S. Zhang *et al.*, «Multisensor-integrated organs-on-chips platform for automated and continual in situ monitoring of organoid behaviors», *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 114, núm. 12, p. E2293-E2302, març 2017, doi: 10.1073/pnas.1612906114.
- [179] I. Sergachev, A. Rusanov, E. Trushkin, D. Sakharov, U. Marx, i A. Tonevitsky, «Fluorescent optical fiber sensors for cell viability monitoring», *Analyst*, vol. 138, núm. 14, p. 4066-4069, jul. 2013, doi: 10.1039/c3an00248a.
- [180] A. Yermembetova, M. R. Oduncu, i A. Wei, «Radiation-Tolerant Thin-Film Electrodes for pH Monitoring in Sterile Media», *Anal Chem*, vol. 94, núm. 45, p. 15535-15540, nov. 2022, doi: 10.1021/acs.analchem.2c03308.
- [181] R. Renneberg *et al.*, «Enzyme sensor-FIA-system for on-line monitoring of glucose, lactate and glutamine in animal cell cultures», feb. 1991. doi: 10.1016/0168-1656(91)90269-2.
- [182] Z. Izadifar *et al.*, «Organ chips with integrated multifunctional sensors enable continuous metabolic monitoring at controlled oxygen levels», *Biosens Bioelectron*, vol. 265, des. 2024, doi: 10.1016/j.bios.2024.116683.
- [183] F. G. Gao, A. S. Jeevarajan, i M. M. Anderson, «Long-term continuous monitoring of dissolved oxygen in cell culture medium for perfused bioreactors using optical oxygen sensors», *Biotechnol Bioeng*, vol. 86, núm. 4, p. 425-433, maig 2004, doi: 10.1002/bit.20010.

- [184] T. Sakata, H. Sugimoto, i A. Saito, «Live Monitoring of Microenvironmental pH Based on Extracellular Acidosis around Cancer Cells with Cell-Coupled Gate Ion-Sensitive Field-Effect Transistor», *Anal Chem*, vol. 90, núm. 21, p. 12731-12736, nov. 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.8b03070.
- [185] W. Li *et al.*, «High-throughput optical sensing of peri-cellular oxygen in cardiac cells: system characterization, calibration, and testing», *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 11, 2023, doi: 10.3389/fbioe.2023.1214493.
- [186] S. M. Grist, J. C. Schmok, M. C. Andy Liu, L. Chrostowski, i K. C. Cheung, «Designing a microfluidic device with integrated ratiometric oxygen sensors for the long-term control and monitoring of chronic and cyclic hypoxia», *Sensors (Switzerland)*, vol. 15, núm. 8, p. 20030-20052, ago. 2015, doi: 10.3390/s150820030.
- [187] J. Lee, I. Soltis, S. A. Tillery, S. H. Lee, H. Kim, i W. H. Yeo, «Long-term stable pH sensor array with synergistic bilayer structure for 2D real-time mapping in cell culture monitoring», *Biosens Bioelectron*, vol. 254, juny 2024, doi: 10.1016/j.bios.2024.116223.
- [188] J. Kieninger, K. Aravindalochanan, J. A. Sandvik, E. O. Pettersen, i G. A. Urban, «Pericellular oxygen monitoring with integrated sensor chips for reproducible cell culture experiments», *Cell Prolif*, vol. 47, núm. 2, p. 180-188, 2014, doi: 10.1111/j.1365-2184.2013.12089.x.
- [189] J. Schlaugat *et al.*, «Development and characterization of a fiber optical fluorescence sensor for the online monitoring of biofilms and their microenvironment», *Eng Life Sci*, vol. 20, núm. 7, p. 252-264, jul. 2020, doi: 10.1002/elsc.201900140.
- [190] Z. Ma *et al.*, «In-situ monitoring of glucose metabolism in cancer cell microenvironments based on hollow fiber structure», *Biosens Bioelectron*, vol. 162, ago. 2020, doi: 10.1016/j.bios.2020.112261.
- [191] Z. Zhang, T. Zheng, i R. Zhu, «Long-term and label-free monitoring for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells using force sensor and impedance measurement», *J Mater Chem B*, vol. 8, núm. 43, p. 9913-9920, nov. 2020, doi: 10.1039/d0tb01968b.

- [192] R. Ehret, W. Baumann, M. Brischwein, A. Schwinde, K. Stegbauer, i B. Wolf, «Monitoring of cellular behaviour impedance measurements on interdigitated electrode structures», *Biosens Bioelectron*, vol. 12, núm. 1, p. 29-41, març 1997, doi: 10.1016/0956-5663(96)89087-7.
- [193] B. Srinivasan, A. R. Kolli, M. B. Esch, H. E. Abaci, M. L. Shuler, i J. J. Hickman, «TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems», *SLAS Technol*, vol. 20, núm. 2, p. 107-126, abr. 2015, doi: 10.1177/2211068214561025.
- [194] M. R. Pennington i G. R. Van de Walle, «Electric Cell-Substrate Impedance Sensing To Monitor Viral Growth and Study Cellular Responses to Infection with Alphaherpesviruses in Real Time», *mSphere*, vol. 2, núm. 2, abr. 2017, doi: 10.1128/mSphere.00039-17.
- [195] J. Li *et al.*, «Continuous glucose metabolism monitoring platform for long-term analysis of tumor cell proliferation and drug response», *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 948, nov. 2023, doi: 10.1016/j.jelechem.2023.117808.
- [196] M. Tric *et al.*, «Optical biosensor optimized for continuous in-line glucose monitoring in animal cell culture», *Anal Bioanal Chem*, vol. 409, núm. 24, p. 5711-5721, set. 2017, doi: 10.1007/s00216-017-0511-7.
- [197] S. B. Prakash *et al.*, «BioLabs-on-a-chip: Monitoring cells using CMOS biosensors», en *2006 IEEE/NLM Life Science Systems and Applications Workshop, LiSA 2006*, 2006. doi: 10.1109/LSSA.2006.250426.
- [198] R. Wu *et al.*, «Long-term cell culture and electrically: In situ monitoring of living cells based on a polyaniline hydrogel sensor», *J Mater Chem B*, vol. 9, núm. 46, p. 9514-9523, des. 2021, doi: 10.1039/d1tb01885j.
- [199] M. Rothbauer *et al.*, «Integration of glucose and lactate biosensors into human cartilage-on-a-chip models for long-term monitoring of metabolic shifts in osteoarthritis», *Sens Actuators B Chem*, vol. 427, març 2025, doi: 10.1016/j.snb.2024.137123.
- [200] F. Liebis, A. Weltin, J. Marzioch, G. A. Urban, i J. Kieninger, «Zero-consumption Clark-type microsensor for oxygen monitoring in cell

- culture and organ-on-chip systems», *Sens Actuators B Chem*, vol. 322, nov. 2020, doi: 10.1016/j.snb.2020.128652.
- [201] M. G. Sánchez-Salazar *et al.*, «Continuous inline monitoring of glucose in an organ-on-chip using FreeStyle™ libre glucometers», *Frontiers in Lab on a Chip Technologies*, vol. 3, feb. 2024, doi: 10.3389/frlct.2024.1289437.
- [202] K. Dahlmann *et al.*, «Online monitoring of the cell-specific oxygen uptake rate with an in situ combi-sensor», *Anal Bioanal Chem*, vol. 412, núm. 9, p. 2111-2121, abr. 2020, doi: 10.1007/s00216-019-02260-9.
- [203] M. Lederle, M. Tric, C. Packi, T. Werner, i P. Wiedemann, «An optical biosensor for continuous glucose monitoring in animal cell cultures», en *Methods in Molecular Biology*, vol. 2095, Humana Press Inc., 2020, p. 319-333. doi: 10.1007/978-1-0716-0191-4_19.
- [204] M. Lederle *et al.*, «Continuous optical in-line glucose monitoring and control in CHO cultures contributes to enhanced metabolic efficiency while maintaining darbepoetin alfa product quality», *Biotechnol J*, vol. 16, núm. 8, ago. 2021, doi: 10.1002/biot.202100088.
- [205] A. Weltin *et al.*, «Cell culture monitoring for drug screening and cancer research: A transparent, microfluidic, multi-sensor microsystem», *Lab Chip*, vol. 14, núm. 1, p. 138-146, gen. 2014, doi: 10.1039/c3lc50759a.
- [206] D. N. Rockwood, R. C. Preda, T. Yücel, X. Wang, M. L. Lovett, i D. L. Kaplan, «Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin», *Nat Protoc*, vol. 6, núm. 10, p. 1612-1631, oct. 2011, doi: 10.1038/nprot.2011.379.
- [207] C. Jimenez-Jorquera, J. Orozco, i A. Baldi, «ISFET based microsensors for environmental monitoring», *Sensors*, vol. 10, núm. 1, p. 61-83, gen. 2010, doi: 10.3390/s100100061.
- [208] C. Jiménez-Jorquera, A. Bratov, N. Abramova, i A. Baldi, «SFET Based Sensors: Fundamentals and Applications», *Encyclopedia of Sensors*, vol. 10, p. 1-46., 2006.
- [209] J. Muñoz, C. Jimenez, A. Bratov, J. Bartroli, S. Alegret, i C. Dominguez, «Photosensitive polyurethanes applied to the development of

- CHEMFET and ENFET devices for biomedical sensing», *Biosens Bioelectron*, vol. 12, núm. 7, p. 577-585, juny 1997, doi: 10.1016/S0956-5663(96)00081-4.
- [210] J. R. Siqueira, E. G. R. Fernandes, O. N. de Oliveira, i V. Zucolotto, «Biosensors Based on Field-Effect Devices», en *Nanobioelectrochemistry*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, p. 67-86. doi: 10.1007/978-3-642-29250-7_4.
- [211] S. Sinha i T. Pal, «A comprehensive review of FET-based pH sensors: materials, fabrication technologies, and modeling», 1 octubre 2022, *John Wiley and Sons Inc.* doi: 10.1002/elsa.202100147.
- [212] A. Alves-Sampaio, J. A. Troca-Marín, i M. L. Montesinos, «NMDA-Mediated Regulation of *DSCAM* Dendritic Local Translation Is Lost in a Mouse Model of Down's Syndrome», *The Journal of Neuroscience*, vol. 30, núm. 40, p. 13537-13548, oct. 2010, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3457-10.2010.
- [213] P. Giménez-Gómez, M. Gutiérrez-Capitán, F. Capdevila, A. Puig-Pujol, C. Jiménez-Jorquera, i C. Fernández-Sánchez, «Compact analytical flow system for the simultaneous determination of L-lactic and L-malic in red wines», *Sci Rep*, vol. 10, núm. 1, des. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-76502-7.
- [214] B. Amsden, «Solute Diffusion within Hydrogels. Mechanisms and Models», *Macromolecules*, vol. 31, núm. 23, p. 8382-8395, nov. 1998, doi: 10.1021/ma980765f.
- [215] K. Zebisch, V. Voigt, M. Wabitsch, i M. Brandsch, «Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes», *Anal Biochem*, vol. 425, núm. 1, p. 88-90, juny 2012, doi: 10.1016/j.ab.2012.03.005.
- [216] P. J. Price, «Best practices for media selection for mammalian cells», 1 setembre 2017, *Springer New York LLC*. doi: 10.1007/s11626-017-0186-6.
- [217] R. I. Freshney, *Culture of Animal Cells*. Wiley, 2010. doi: 10.1002/9780470649367.

- [218] M. Arora, «Cell Culture Media: A Review», *Materials and Methods*, vol. 3, març 2013, doi: 10.13070/mm.en.3.175.
- [219] W. Yao i R. H. Byrne, «Spectrophotometric Determination of Freshwater pH Using Bromocresol Purple and Phenol Red», *Environ Sci Technol*, vol. 35, núm. 6, p. 1197-1201, març 2001, doi: 10.1021/es001573e.
- [220] Y. Berthois, J. A. Katzenellenbogen, i B. S. Katzenellenbogen, «Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture.», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 83, núm. 8, p. 2496-2500, abr. 1986, doi: 10.1073/pnas.83.8.2496.
- [221] R. Rizzo *et al.*, «pH-sensing hybrid hydrogels for non-invasive metabolism monitoring in tumor spheroids», *Mater Today Bio*, vol. 20, p. 100655, juny 2023, doi: 10.1016/j.mtbio.2023.100655.
- [222] E. Voitechovič *et al.*, «Development of label-free impedimetric platform based on new conductive polyaniline polymer and three-dimensional interdigitated electrode array for biosensor applications», *Electrochim Acta*, vol. 173, p. 59-66, ago. 2015, doi: 10.1016/j.electacta.2015.05.011.
- [223] S. Osaki, T. Kintoki, T. Moriuchi-Kawakami, K. Kitamura, i S. Wakida, «Investigation of Polyurethane Matrix Membranes for Salivary Nitrate ISFETs to Prevent the Drift», *Sensors*, vol. 19, núm. 12, p. 2713, juny 2019, doi: 10.3390/s19122713.
- [224] T. Urbánek, I. Ivanko, J. Svoboda, E. Tomšík, i M. Hrubý, «Selective potentiometric detection of reactive oxygen species (ROS) in biologically relevant concentrations by a modified metalized polyporphyrine sensing layer coated with nonbiofouling poly(2-alkyl-2oxazoline)s», *Sens Actuators B Chem*, vol. 363, jul. 2022, doi: 10.1016/j.snb.2022.131827.
- [225] M. Lazouskaya, O. Scheler, V. Mikli, K. Uppuluri, K. Zaraska, i M. Tamm, «Nafion Protective Membrane Enables Using Ruthenium Oxide Electrodes for pH Measurement in Milk», *J Electrochem Soc*, vol. 168, núm. 10, p. 107511, oct. 2021, doi: 10.1149/1945-7111/ac2d3c.
-

- [226] B. A. Gray, S. M. Gollin, J. M. Opitz, i J. F. Reynolds, «Rapid cell culture procedure for tissue samples», *Am J Med Genet*, vol. 28, núm. 2, p. 521-526, oct. 1987, doi: 10.1002/ajmg.1320280236.
- [227] J. Michl, K. C. Park, i P. Swietach, «Evidence-based guidelines for controlling pH in mammalian live-cell culture systems», *Commun Biol*, vol. 2, núm. 1, p. 144, abr. 2019, doi: 10.1038/s42003-019-0393-7.
- [228] S. Bell i S. Wolff, «Studies on the mechanism of the effect of fluorodeoxyuridine on chromosomes», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 51, núm. 2, p. 195-202, feb. 1964, doi: 10.1073/pnas.51.2.195.
- [229] R. Borchardt, «The Application of Cell Culture Systems in Drug Discovery and Development», *J Drug Target*, vol. 3, núm. 3, p. 179-182, gen. 1995, doi: 10.3109/10611869509015942.
- [230] A. Ghanemi, «Cell cultures in drug development: Applications, challenges and limitations», *Saudi Pharmaceutical Journal*, vol. 23, núm. 4, p. 453-454, set. 2015, doi: 10.1016/j.jsps.2014.04.002.
- [231] T. Hartung, «Toxicology for the twenty-first century», *Nature*, vol. 460, núm. 7252, p. 208-212, jul. 2009, doi: 10.1038/460208a.
- [232] K. H. Benam *et al.*, «Engineered In Vitro Disease Models», *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, vol. 10, núm. 1, p. 195-262, gen. 2015, doi: 10.1146/annurev-pathol-012414-040418.
- [233] M. M. Adeva-Andany, N. Pérez-Felpete, C. Fernández-Fernández, C. Donapetry-García, i C. Pazos-García, «Liver glucose metabolism in humans», 1 desembre 2016, *Portland Press Ltd.* doi: 10.1042/BSR20160385.
- [234] T. Yu, S. S. Sheu, J. L. Robotham, i Y. Yoon, «Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species», *Cardiovasc Res*, vol. 79, núm. 2, p. 341-351, jul. 2008, doi: 10.1093/cvr/cvn104.
- [235] B. L. Wajchenberg, «Cell Failure in Diabetes and Preservation by Clinical Treatment», 2007, doi: 10.1210/er.2006-0038.
-

- [236] W. El-Assaad *et al.*, «Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic β -cell death», *Endocrinology*, vol. 144, núm. 9, p. 4154-4163, set. 2003, doi: 10.1210/en.2003-0410.
- [237] B. Oleszczak, L. Szablewski, i M. Pliszka, «The effect of hyperglycemia and hypoglycemia on glucose transport and expression of glucose transporters in human lymphocytes B and T: An in vitro study», *Diabetes Res Clin Pract*, vol. 96, núm. 2, p. 170-178, maig 2012, doi: 10.1016/j.diabres.2011.12.012.
- [238] Y. C. Chen *et al.*, «Exopolysaccharides of *Bacillus amyloliquefaciens* modulate glycemic level in mice and promote glucose uptake of cells through the activation of Akt», *Int J Biol Macromol*, vol. 146, p. 202-211, març 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.217.
- [239] L. Yan, X. He, Y. Tang, X. Zhao, G. Luo, i X. Wang, «HGF can reduce accumulation of inflammation and regulate glucose homeostasis in T2D mice», doi: 10.1007/s13105-021-00828-7/Published.
- [240] S. Schwamb, R. Puskeiler, i P. Wiedemann, «Monitoring of Cell Culture», 2015, p. 185-221. doi: 10.1007/978-3-319-10320-4_7.
- [241] R. Wilson i A. P. F. Turner, «Glucose oxidase: an ideal enzyme», *Biosens Bioelectron*, vol. 7, núm. 3, p. 165-185, gen. 1992, doi: 10.1016/0956-5663(92)87013-F.
- [242] X. Li, L. Gao, i Z. Chen, «Highly sensitive colorimetric detection of glucose through glucose oxidase and Cu^{2+} -catalyzed 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine oxidation», *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 213, p. 37-41, abr. 2019, doi: 10.1016/j.saa.2019.01.050.
- [243] A. Heller i B. Feldman, «Electrochemical Glucose Sensors and Their Applications in Diabetes Management», *Chem Rev*, vol. 108, núm. 7, p. 2482-2505, jul. 2008, doi: 10.1021/cr068069y.
- [244] M. D. Gouda, M. A. Kumar, M. S. Thakur, i N. G. Karanth, «Enhancement of operational stability of an enzyme biosensor for glucose and sucrose using protein based stabilizing agents», *Biosens*
-

- Bioelectron*, vol. 17, núm. 6-7, p. 503-507, juny 2002, doi: 10.1016/S0956-5663(02)00021-0.
- [245] G. Sun, X. Wei, D. Zhang, L. Huang, H. Liu, i H. Fang, «Immobilization of Enzyme Electrochemical Biosensors and Their Application to Food Bioprocess Monitoring», *Biosensors (Basel)*, vol. 13, núm. 9, p. 886, set. 2023, doi: 10.3390/bios13090886.
- [246] N. Liu, Z. Xu, A. Morrin, i X. Luo, «Low fouling strategies for electrochemical biosensors targeting disease biomarkers», *Analytical Methods*, vol. 11, núm. 6, p. 702-711, 2019, doi: 10.1039/C8AY02674B.
- [247] «Dexcom G7». Consulta: 30 juny 2025. [En línia]. Disponible a: <https://www.dexcom.com/en-GB/dexcom-shop/g7>
- [248] «Freestyle Libre». Consulta: 30 juny 2025. [En línia]. Disponible a: <https://www.freestyle.abbott/es-es/comprar-productos-freestyle-libre.html>
- [249] «Senseonics Eversense ». Consulta: 30 juny 2025. [En línia]. Disponible a: <https://www.diabetes.ascensia.es/eversense-healthcare-provider/>
- [250] J. Kropff *et al.*, «Accuracy and Longevity of an Implantable Continuous Glucose Sensor in the PRECISE Study: A 180-Day, Prospective, Multicenter, Pivotal Trial», *Diabetes Care*, vol. 40, núm. 1, p. 63-68, gen. 2017, doi: 10.2337/dc16-1525.
- [251] Jeremy Feffer, «Eversense 365 Receives FDA Clearance: The World's First One Year CGM». Consulta: 30 juny 2025. [En línia]. Disponible a: <https://www.senseonics.com/investor-relations/news-releases/2024/09-17-2024-120118174>
- [252] M. Fokkert *et al.*, «Performance of the Eversense versus the Free Style Libre Flash glucose monitor during exercise and normal daily activities in subjects with type 1 diabetes mellitus», *BMJ Open Diabetes Res Care*, vol. 8, núm. 1, p. e001193, ago. 2020, doi: 10.1136/bmjdr-2020-001193.
- [253] J. Dornhof, J. Kieninger, H. Muralidharan, J. Maurer, G. A. Urban, i A. Weltin, «Microfluidic organ-on-chip system for multi-analyte monitoring
-

- of metabolites in 3D cell cultures», *Lab Chip*, vol. 22, núm. 2, p. 225-239, 2022, doi: 10.1039/D1LC00689D.
- [254] P. Giménez-Gómez *et al.*, «A self-calibrating and multiplexed electrochemical lab-on-a-chip for cell culture analysis and high-resolution imaging», *Lab Chip*, vol. 20, núm. 4, p. 823-833, 2020, doi: 10.1039/C9LC01051C.
- [255] A. Moreno *et al.*, «Silk Fibroin Functionalised Isfets with Enhanced Stability for Long-Term Ph Monitoring of Cell Cultures», *ACA*, 2023, doi: 10.2139/ssrn.4483988.
- [256] M. Li, W. Tao, S. Kuga, i Y. Nishiyama, «Controlling molecular conformation of regenerated wild silk fibroin by aqueous ethanol treatment», *Polym Adv Technol*, vol. 14, núm. 10, p. 694-698, 2003, doi: 10.1002/pat.409.
- [257] G. N. Hounsfield, «Computerized transverse axial scanning (tomography): Part 1. Description of system», *Br J Radiol*, vol. 46, núm. 552, p. 1016-1022, des. 1973, doi: 10.1259/0007-1285-46-552-1016.
- [258] P. C. LAUTERBUR, «Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance», *Nature*, vol. 242, núm. 5394, p. 190-191, març 1973, doi: 10.1038/242190a0.
- [259] D. Kesztyüs, S. Brucher, C. Wilson, i T. Kesztyüs, «Use of Infrared Thermography in Medical Diagnosis, Screening, and Disease Monitoring: A Scoping Review», *Medicina (B Aires)*, vol. 59, núm. 12, p. 2139, des. 2023, doi: 10.3390/medicina59122139.
- [260] S. L. Jacques, «Optical properties of biological tissues: a review», *Phys Med Biol*, vol. 58, núm. 11, p. R37-R61, juny 2013, doi: 10.1088/0031-9155/58/11/R37.
- [261] Y. Arai, T. Yamamoto, T. Minamikawa, T. Takamatsu, i T. Nagai, «Spectral Fingerprinting of Individual Cells Visualized by Cavity-Reflection-Enhanced Light-Absorption Microscopy», *PLoS One*, vol. 10, núm. 5, p. e0125733, maig 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0125733.

- [262] K. Franze *et al.*, «Müller cells are living optical fibers in the vertebrate retina», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, núm. 20, p. 8287-8292, maig 2007, doi: 10.1073/pnas.0611180104.
- [263] N. A. Kraus, F. Ehebauer, B. Zapp, B. Rudolphi, B. J. Kraus, i D. Kraus, «Quantitative assessment of adipocyte differentiation in cell culture», *Adipocyte*, vol. 5, núm. 4, p. 351-358, oct. 2016, doi: 10.1080/21623945.2016.1240137.
- [264] R. Bharadwaj *et al.*, «Evanescent wave absorbance based fiber optic biosensor for label-free detection of E. coli at 280nm wavelength», *Biosens Bioelectron*, vol. 26, núm. 7, p. 3367-3370, març 2011, doi: 10.1016/j.bios.2010.12.014.
- [265] G. Kim *et al.*, «Measurements of three-dimensional refractive index tomography and membrane deformability of live erythrocytes from *Pelophylax nigromaculatus*», *Sci Rep*, vol. 8, núm. 1, p. 9192, juny 2018, doi: 10.1038/s41598-018-25886-8.
- [266] F. Musumeci *et al.*, «Discrimination between normal and cancer cells by using spectral analysis of delayed luminescence.», *Appl Phys Lett*, vol. 86, núm. 15, abr. 2005, doi: 10.1063/1.1900317.
- [267] V. Yashunsky, V. Lirtsman, M. Golosovsky, D. Davidov, i B. Aroeti, «Real-Time Monitoring of Epithelial Cell-Cell and Cell-Substrate Interactions by Infrared Surface Plasmon Spectroscopy», *Biophys J*, vol. 99, núm. 12, p. 4028-4036, des. 2010, doi: 10.1016/j.bpj.2010.10.017.
- [268] R. Nazempour, Q. Zhang, R. Fu, i X. Sheng, «Biocompatible and Implantable Optical Fibers and Waveguides for Biomedicine», *Materials*, vol. 11, núm. 8, p. 1283, jul. 2018, doi: 10.3390/ma11081283.
- [269] J. Madden *et al.*, «Electrochemical sensor for enzymatic lactate detection based on laser-scribed graphitic carbon modified with platinum, chitosan and lactate oxidase», *Talanta*, vol. 246, ago. 2022, doi: 10.1016/j.talanta.2022.123492.

- [270] P. Bollella, «Enzyme-based amperometric biosensors: 60 years later ... Quo Vadis?», 22 novembre 2022, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.aca.2022.340517.
- [271] L. C. Turtzo, R. Marx, i M. Daniel Lane, «Cross-talk between sympathetic neurons and adipocytes in coculture», *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, núm. 22, p. 12385-12390, oct. 2001, doi: 10.1073/pnas.231478898.
- [272] M. E. Spira i A. Hai, «Multi-electrode array technologies for neuroscience and cardiology», *Nat Nanotechnol*, vol. 8, núm. 2, p. 83-94, feb. 2013, doi: 10.1038/nnano.2012.265.
- [273] C. N. Takembo i H. P. E. Fouda, «Effect of temperature fluctuation on the localized pattern of action potential in cardiac tissue», *Sci Rep*, vol. 10, núm. 1, p. 15087, set. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-72188-z.
- [274] D. Ahl *et al.*, «Turning Up the Heat: Local Temperature Control During in vivo Imaging of Immune Cells», *Front Immunol*, vol. 10, ago. 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.02036.
- [275] Y. Marunaka, «Physiological roles of chloride ions in bodily and cellular functions», 15 novembre 2023. doi: 10.1186/s12576-023-00889-x.
- [276] J. Koryta i K. Stulík, *Ion-Selective Electrodes*. Cambridge University Press, 1983. doi: 10.1017/CBO9780511897610.
- [277] P. Ciosek i W. Wróblewski, «Sensor arrays for liquid sensing - Electronic tongue systems», 2007, *Royal Society of Chemistry*. doi: 10.1039/b705107g.
- [278] M. Parrilla, M. Cuartero, i G. A. Crespo, «Wearable potentiometric ion sensors», 1 gener 2019, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.trac.2018.11.024.
- [279] J. Janata i M. Josowicz, «Nernstian and non-nernstian potentiometry», *Solid State Ion*, vol. 94, núm. 5, p. 209-230, feb. 1997, doi: 10.1016/S0167-2738(96)00503-6.

10. Annexos

Annex A: Dissenys dels prototips

Cambra per espectrometria

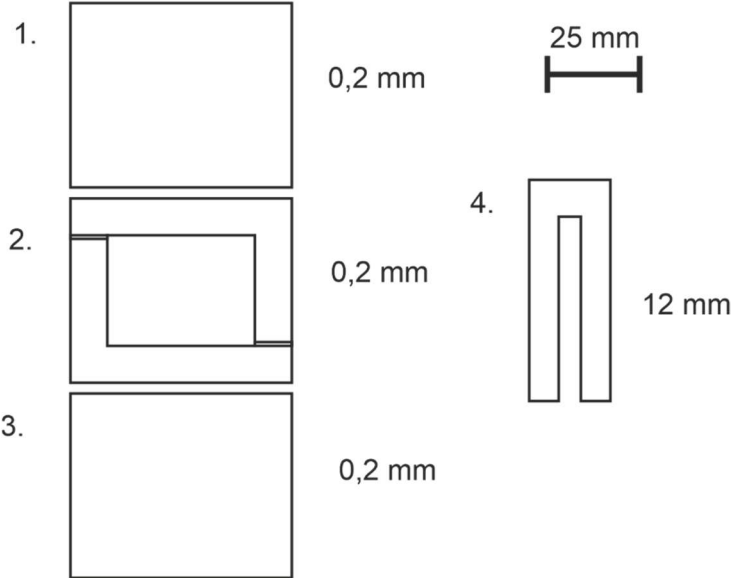


Figura A.1: Disseny de la cambra per espectrofotometria.

Cambra de cultiu

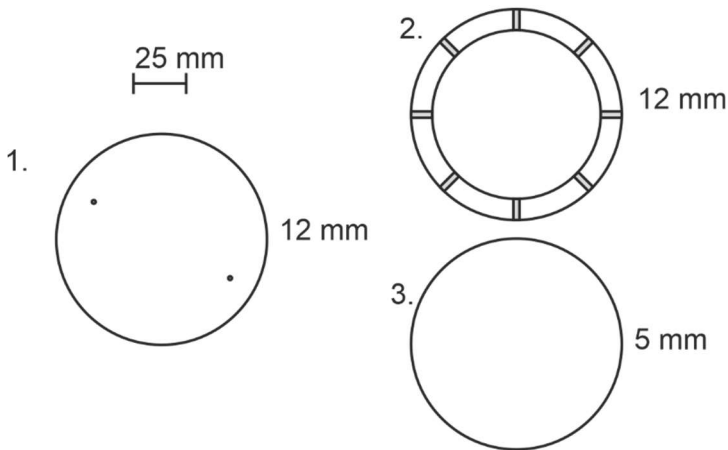


Figura A.2: Disseny de la cambra fluídica per cultiu.

Cambra estàtica per amperomètrics

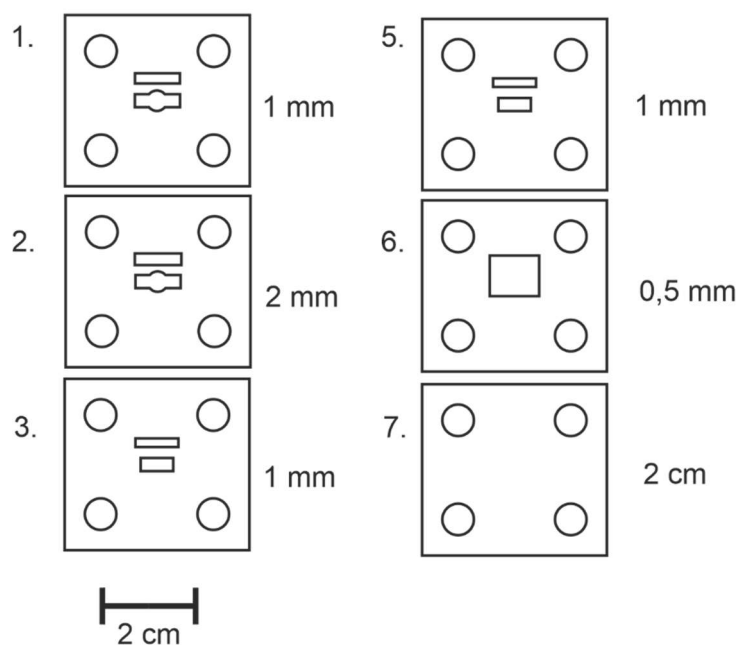


Figura A.3: Disseny de la cambra estàtica per amperomètrics.

Cambra fluídica per amperomètrics

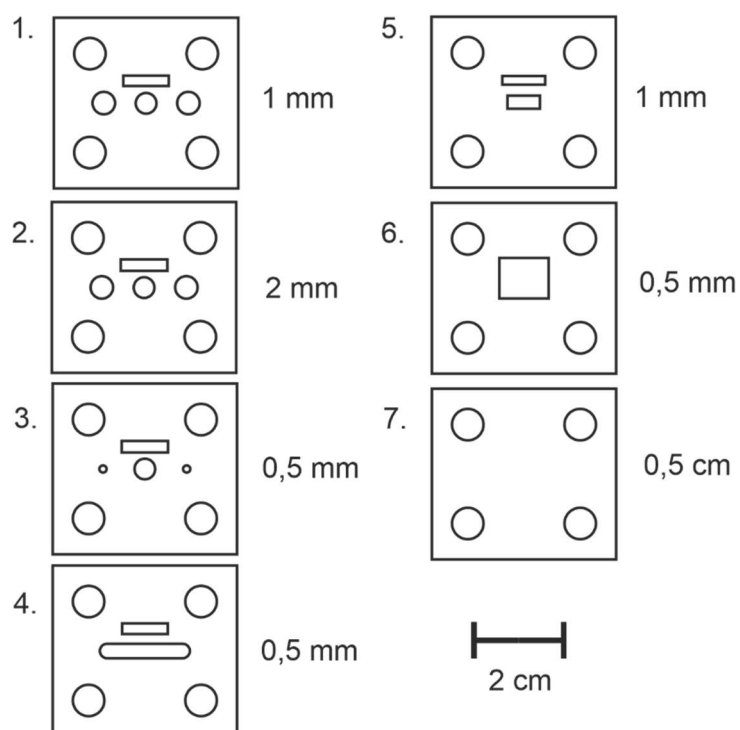


Figura A.4: Disseny de la cambra fluídica per amperomètrics.

Annex B: Matriu de microelèctrodes amb sensor de temperatura

Introducció

Les matrius de microelèctrodes (MEAs, per les seves sigles en anglès) s'han convertit en eines essencials per a la recerca, especialment en l'estudi de xarxes neuronals, ja que permeten el registre i l'estimulació simultània de l'activitat elèctrica en múltiples punts cel·lulars. La seva naturalesa mínimament invasiva i la seva idoneïtat per a la monitorització a llarg termini les fan ideals per a estudis *in vitro* de la transmissió sinàptica, la dinàmica de la xarxa i l'avaluació farmacològica en neurones i cardiomiòcits [46], [272].

Les fluctuacions de temperatura durant experiments *in vitro* poden introduir variabilitat en els senyals registrats i afectar la reproductibilitat de les respostes biològiques. Per exemple, el cicle de vesícules sinàptiques, la conductància dels canals iònics i l'estat metabòlic de les cèl·lules són processos altament dependents de la temperatura [273]. Per això, la integració de sensors i control de temperatura és una funcionalitat útil en el desenvolupament de MEAs, ja que permet un seguiment ambiental en temps real i protocols d'estimulació estables. Això és especialment rellevant en registres de llarga durada o estudis que impliquen rutes termossensibles [274].

Amb l'objectiu de donar resposta a aquestes necessitats, aquest capítol presenta la fabricació i caracterització exhaustiva de MEAs basades en silici que incorporen sensors de temperatura i microresistències calefactores integrades. Els resultats inclouen la inspecció elèctrica i morfològica dels elèctrodes i pistes de connexió, així com la validació electrotermal del sensor de temperatura i de l'escalfador.

Disseny i fabricació de les MEAs

La matriu de microelèctrodes (MEA) desenvolupada en aquest treball va ser dissenyada per integrar múltiples funcions electrofisiològiques en un únic substrat de silici amb una mida total de 49 mm × 49 mm. Aquesta va permetre la inclusió d'elèctrodes de registre i estimulació, infraestructures de connexió, estructures integrades de monitoratge tèrmic i elèctric, i elements de diagnòstic de fabricació. La MEA inclou un total de 48 microelèctrodes, distribuïts en 10 finestres passivades: vuit finestres amb cinc elèctrodes cadascuna i dues finestres amb quatre elèctrodes.

El disseny de la MEA es va realitzar en col·laboració amb la US, utilitzant el programari KLayout i una estructura jeràrquica en format GDSII. Es van fabricar dues màscares de crom, a escala 1:1.

El disseny es defineix en dos nivells litogràfics (Figura B.1). El primer nivell correspon a la capa de metal·lització, on es dibuixen tots els elements conductors. L'or i el platí van ser seleccionats com a materials per als elèctrodes i les pistes de connexió a causa de la seva alta conductivitat i excel·lent biocompatibilitat. Les pistes de senyal s'estenen des de les regions centrals d'elèctrodes cap a la perifèria del xip, on es troben les grans pastilles de contacte que faciliten la connexió elèctrica externa. Les pistes es van dissenyar amb una amplada uniforme de 50 µm.

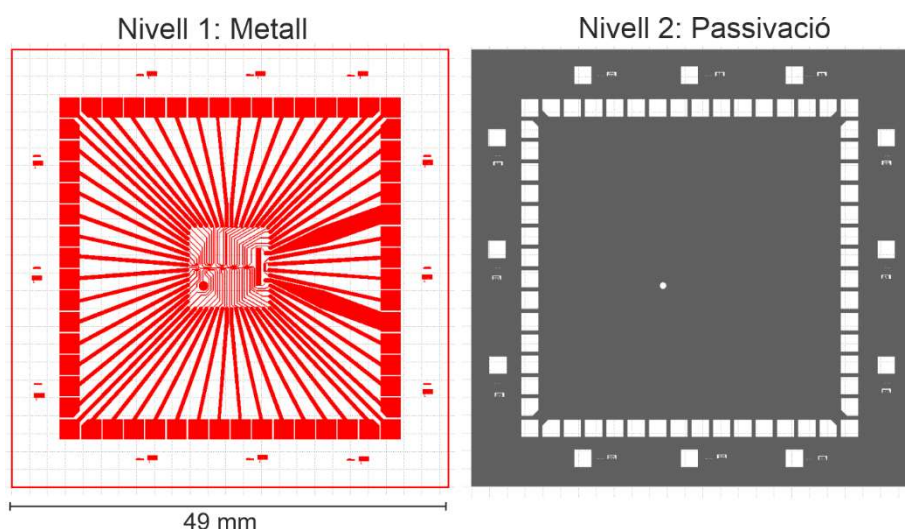
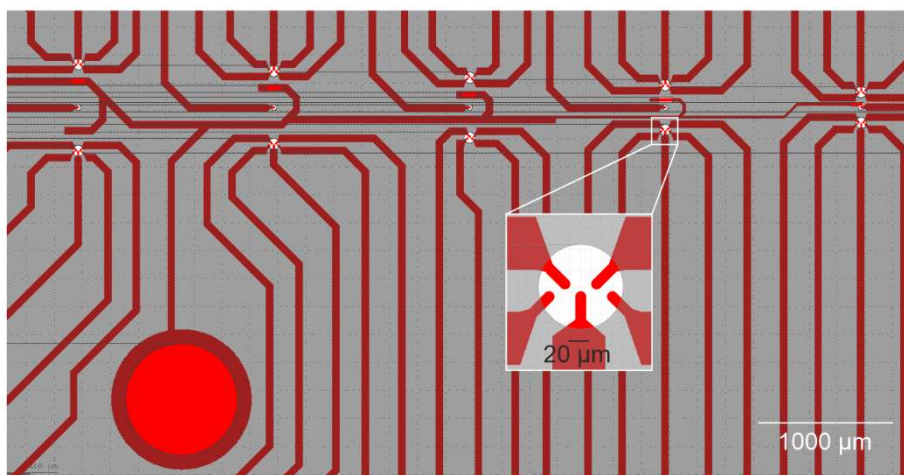


Figura B.1: Disseny general de la MEA. (esquerra) Nivell de metal·lització.
(dreta) Capa de passivació.

El segon nivell litogràfic defineix la capa de passivació, que consisteix en una bicapa de 400 nm de diòxid de silici i 700 nm de nitrur de silici, ambdues dipositades mitjançant PECVD. Es van obrir finestres en aquesta capa sobre les puntes dels elèctrodes i les pastilles de contacte, permetent així el contacte elèctric amb el medi circumdant i amb els equips de mesura (Figura B. 2A). Les finestres de passivació estan centrades sobre cada grup d'elèctrodes, i les àrees exposades sota d'aquestes es van calcular amb precisió: 1310 μm^2 per a les finestres de cinc elèctrodes i 1206 μm^2 per a les de quatre. Aquests valors es van seleccionar per mantenir superfícies efectives similars entre tots els grups d'elèctrodes. Cada elèctrode és circular i es distribueix simètricament dins la seva finestra corresponent.

L'elèctrode de referència, dissenyat per a l'estimulació global o el control del potencial de referència, consisteix en una única pastilla metàl·lica circular amb un diàmetre de 800 μm .

A



B

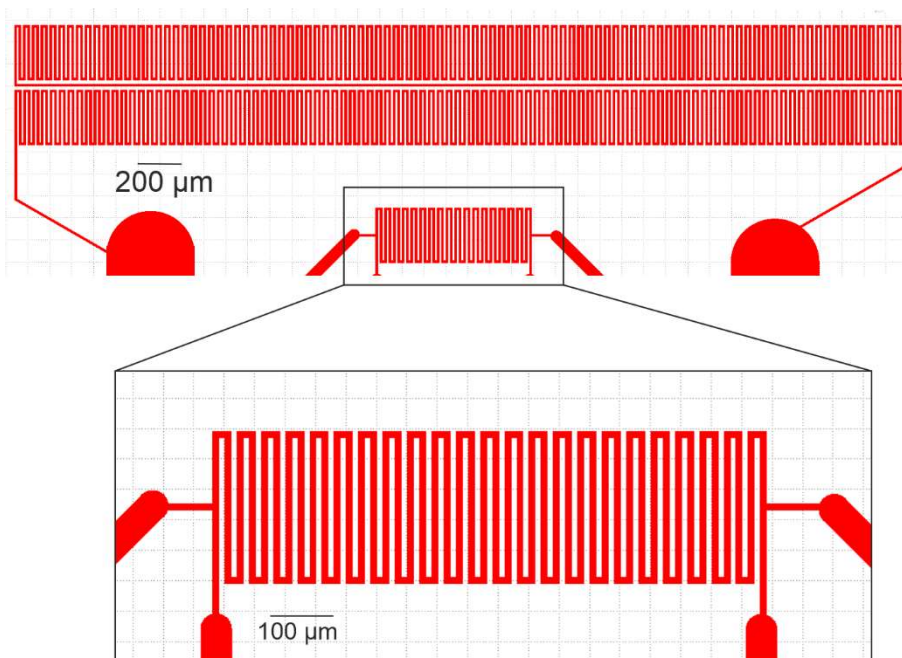


Figura B. 2: Estructures per a la detecció de temperatura, escalfament localitzat i proves de polsos.

A més de la regió del MEA, es van incorporar diverses estructures auxiliars per monitorar i controlar la temperatura. Aquestes inclouen un sensor de temperatura i un microescalfador (Figura B. 2B), ambdós dissenyats com a resistències serpentine d'or fabricades dins la mateixa capa de metal·lització.

Per donar suport a la verificació del procés i al control de qualitat de la fabricació, el disseny del xip inclou diverses estructures de test i alineament (Figura B.3). Es va implementar una estructura de Van der Pauw (Figura B.3A) per permetre l'extracció de la resistència per quadre de la capa d'or, proporcionant un mètode no destructiu per avaluar la uniformitat al llarg de l'oblia. Addicionalment, es va incloure un gran requadre de test de 10 mm × 10 mm per a la prova elèctrica directa i l'avaluació de la superfície. També es van col·locar marques d'alineament fotolitogràfiques (Figura B.3B i C) en posicions estratègiques per facilitar l'alineament de les màscares durant processos de múltiples etapes i per avaluar l'exactitud de la superposició litogràfica.

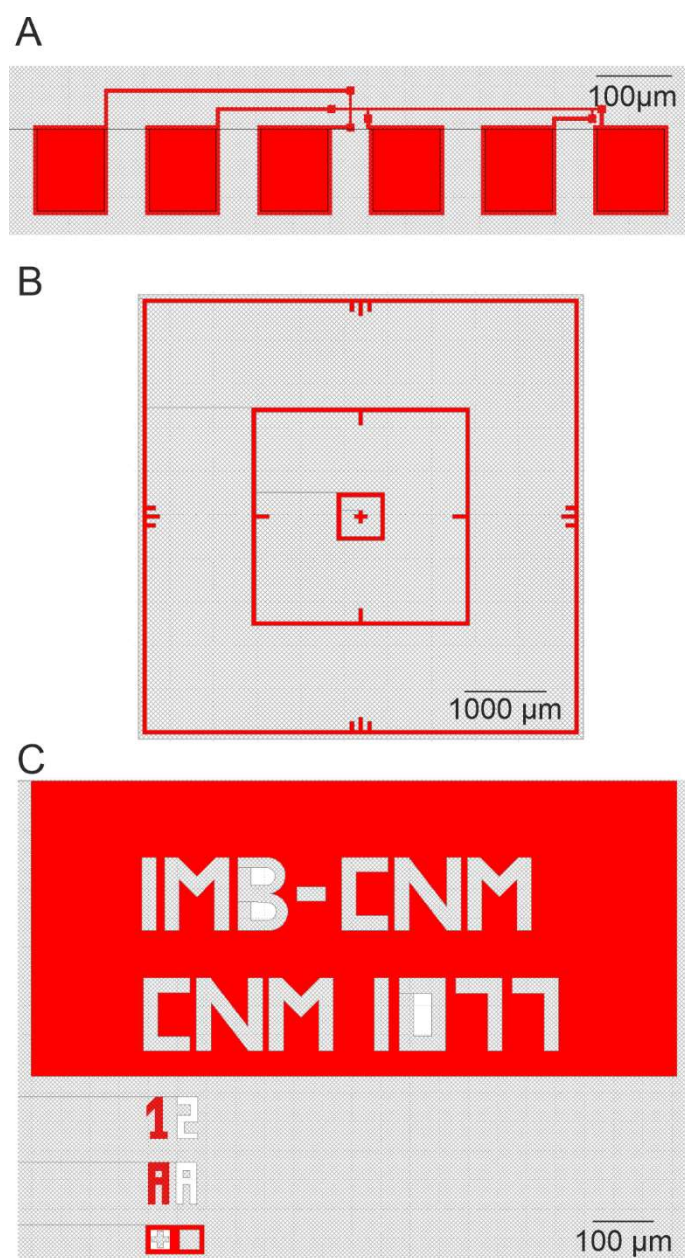


Figura B.3: Estructures de test i alineament. A) Van der Pauw. B) estructura d'alineament de precisió. C) estructura de pre-alineament.

Fabricació del dispositiu MEA

La fabricació dels dispositius MEA es va dur a terme a les sales blanques del CNM per part del personal tècnic i d'enginyeria. El procediment s'inicià amb la selecció d'oblies de silici de tipus p amb una resistivitat compresa entre 4–40 $\Omega \cdot \text{cm}$ i un gruix estàndard de 500 μm , polides per una cara (Figura B.4a).

Les oblies van ser sotmeses a un pas inicial de neteja general per eliminar contaminants superficials. A continuació, es realitzà una oxidació tèrmica en sec per fer créixer una capa uniforme de diòxid de silici d'un gruix aproximat de 1,5 μm (15.000 Å) (b). Aquesta capa d'òxid servia tant d'aïllant elèctric com de base per a processos posteriors. Immediatament després de l'oxidació, es va depositar una capa de nitrur de silici (Si_3N_4) de 1800 Å mitjançant deposició química en fase vapor a baixa pressió (LPCVD) (c).

Seguidament, es va efectuar un primer pas de fotolitografia mitjançant un procés de *lift-off*. Es va aplicar i definir una bicapa de resina fotosensible positiva de 2 μm de gruix (d), delimitant les àrees on es gravaria el nitrur subjacent i es dipositaria el metall. L'atac sec per plasma (RIE) es va utilitzar per eliminar selectivament aproximadament 150 nm de la capa de Si_3N_4 (e). Després del patró sobre el nitrur, les oblies es van transferir a un sistema d'evaporació metàl·lica. Segons el subgrup de oblies, es van dipositar dues configuracions metàl·liques diferents mitjançant evaporació tèrmica. Per a les oblies 1 i 2, es va dipositar una bicapa de crom (20 nm) com a capa d'adhesió i or (120 nm) com a material dels elèctrodes. Per a les oblies 3 i 4, es va utilitzar platí (120 nm) en lloc d'or, mantenint el mateix substrat de crom (f).

Tot seguit, la resina fotosensible es va eliminar mitjançant *lift-off* amb acetona (g). Cal destacar que una de les oblies processades amb platí

va presentar delaminació parcial de la capa metàl·lica, probablement a causa de defectes durant el procés d'evaporació.

Un cop completat el patró metàl·lic, les oblies es van esbandir i netejar amb aigua desionitzada per eliminar qualsevol contaminant residual. Posteriorment, es va dipositar una capa de passivació mitjançant deposició química en fase vapor assistida per plasma (PECVD). Aquesta capa consistia en 400 nm de diòxid de silici seguits de 700 nm de nitrur de silici, proporcionant protecció química i durabilitat mecànica (h). Es va realitzar un segon pas de fotolitografia per obrir finestres de contacte a través de la capa de passivació (i). Utilitzant tècniques fotolitogràfiques estàndard i una resina positiva de 2 µm, es van atacar les zones exposades. Aquesta etapa d'atac sec va eliminar els 700 nm de nitrur de silici, seguits d'un atac complementari sobre la capa subjacent d'òxid de 400 nm (j).

Finalment, es va dur a terme un procés de decapat per plasma, mitjançant plasma d'oxigen a baixa potència, per eliminar la resina fotosensible restant i assegurar un acabat net de la superfície (k). Les oblies es van tallar per obtenir els MEAs de 49×49 mm.

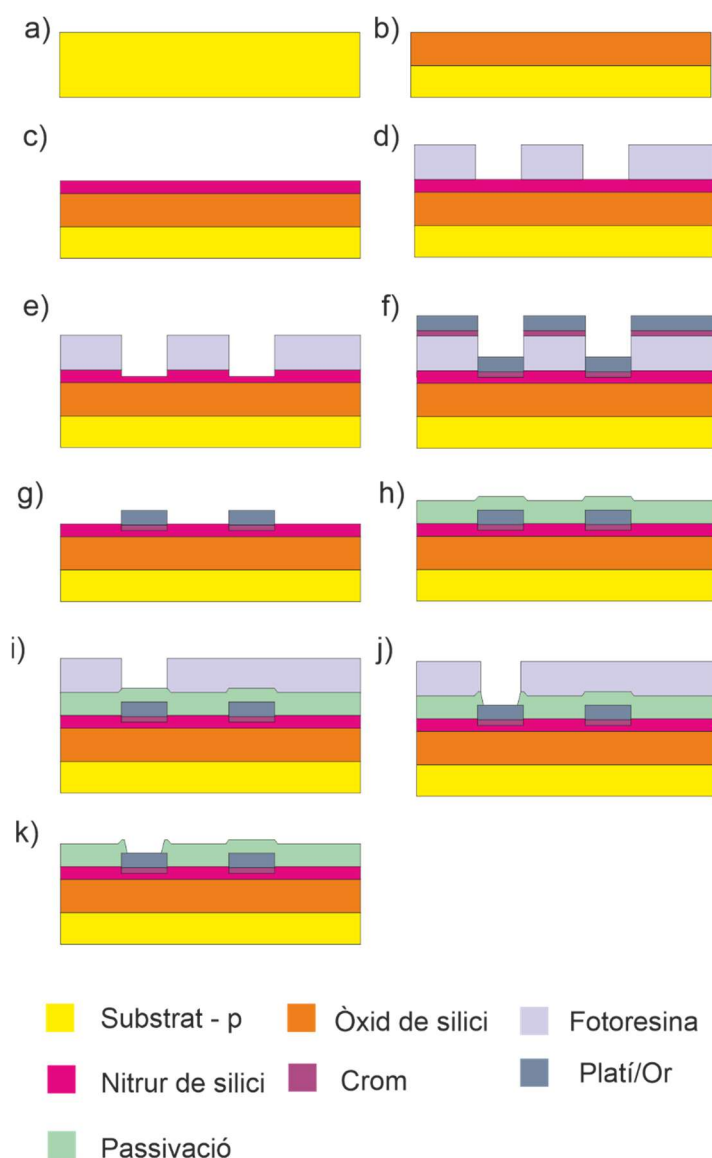


Figura B.4: Procés de fabricació dels dispositius MEA. (a) oblea de silici de partida; (b) oxidació tèrmica per generar una capa d'òxid; (c) deposició de nitrur de silici per LPCVD; (d) fotolitografia per *lift-off*; (e) atac per plasma del nitrur; (f) evaporació metàl·lica (Cr/Au o Cr/Pt); (g) eliminació de la resina amb acetona; (h) dipòsit de capa de passivació per PECVD; (i) segona fotolitografia; (j) obertura de finestres per atac sec; (k) decapat per plasma i acabat.

Resultats i discussió

Els MEAs fabricats es van caracteritzar per avaluar-ne la integritat estructural, el comportament elèctric i la funcionalitat electrotèrmica. Es van emprar dos tipus d'apilaments metàl·lics: Cr/Au per a les oblies 1 i 2, i Cr/Pt per a les oblies 3 i 4. Al llarg de la caracterització, l'oblia 3 es va descartar de l'anàlisi posterior a causa d'una delaminació significativa de la capa metàl·lica.

Caracterització elèctrica

Es van realitzar mesures de resistivitat inicials sobre els *pads* de prova de 10 mm × 10 mm dissenyats específicament per a aquest propòsit. Les mesures es van dur a terme amb un sistema CMT-SR1000N en configuració de quatre puntes, obtenint-se resistències de oblia de $1,996 \pm 0,087$ i $3,606 \pm 0,174 \Omega/\square$ per a les oblies d'or i platí, respectivament. Les oblies 1 i 2 (Cr/Au) van mostrar valors de resistivitat inferiors comparats amb les oblies 3 i 4 (Cr/Pt), fet coherent amb les propietats inherents del platí.

Per corroborar les mesures de resistivitat obtingudes a nivell de oblia, es van mesurar estructures de Van der Pauw integrades en xip, injectant corrents d'entre 200 i 500 μA . Els valors de resistència de oblia obtinguts van ser de $1,484 \pm 0,081 \Omega/\square$ per a l'oblia 1 i de $1,503 \pm 0,046 \Omega/\square$ per a l'oblia 2. L'oblia 4 també va mostrar una concordança raonable ($1,615 \pm 0,045 \Omega/\square$).

Inspecció morfològica

Es va dur a terme una caracterització morfològica de tres MEAs (Figura B.5A) mitjançant microscòpia òptica i microscòpia electrònica d'escombratge (SEM). La inspecció òptica de les oblies 1 i 2 va confirmar una excel·lent definició de les pistes i finestres dels elèctrodes (Figura B.5B). Per contra, l'oblia 4 presentava una cobertura irregular i

delaminació local (Figura B.5C), cosa que no sorprèn si es té en compte que la capa metàl·lica de l'oblia 3 es va desprendre.

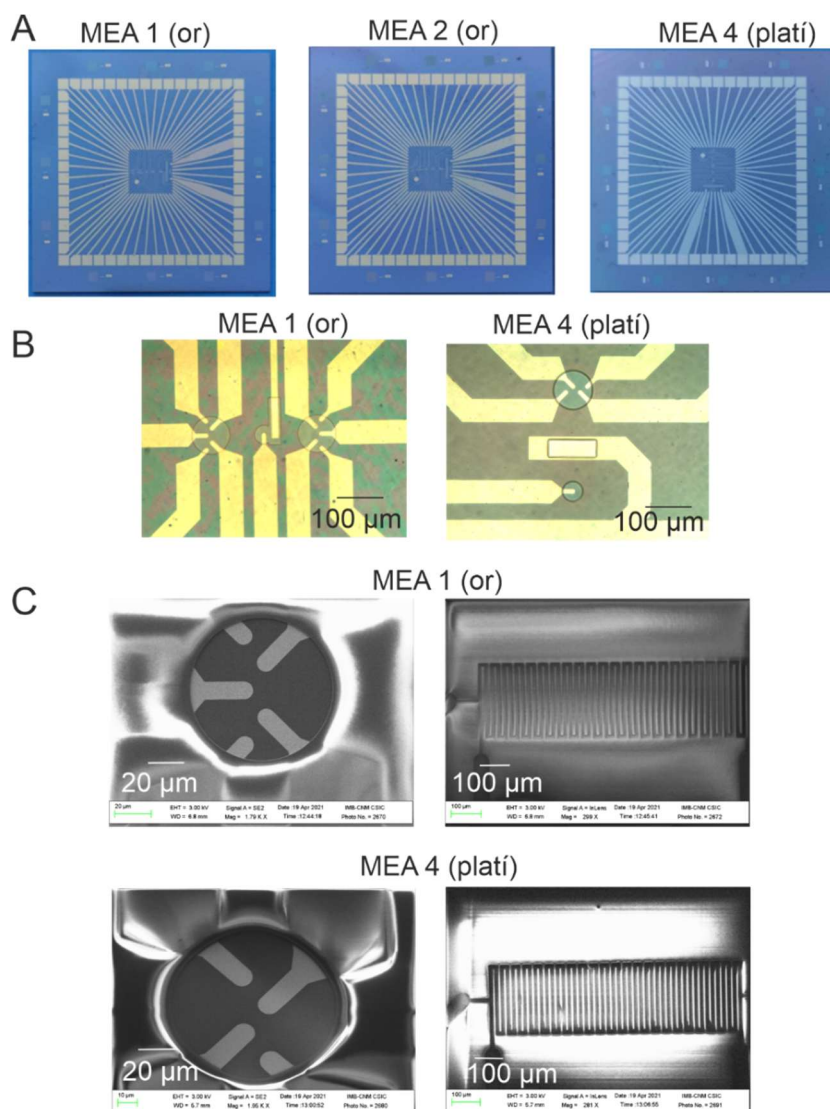


Figura B.5 Inspecció estructural dels MEAs. (A) Vista general dels MEAs 1, 2 i 4. (B) Imatges al microscopi òptic de la zona d'elèctrodes dels MEAs 1 i 4. (C) Imatges SEM de les regions d'elèctrodes i sensors de temperatura en els MEAs 1 i 4.

Caracterització electro tèrmica del sensor de temperatura

El sensor de temperatura integrat es va testar dins d'una cambra de temperatura controlada a la US. Es va utilitzar un circuit de pont de Wheatstone per monitorar la tensió de sortida i la resistència del sensor (Figura B.6), mentre es variava la temperatura ambiental (per al MEA 1), que alhora es mesurava amb un termopar de precisió. El sensor va mostrar una resposta lineal de la tensió amb la temperatura, amb una relació donada per: $V = 0,0371 \cdot T (^{\circ}\text{C}) - 0,47 \text{ V}$.

Aquesta tendència lineal es va confirmar dins el rang de 23–36 °C. La resistència també va augmentar lleugerament amb la temperatura, com es mostra a la Figura B.6A, en concordança amb el comportament típic de les resistències de capa fina metàl·lica.

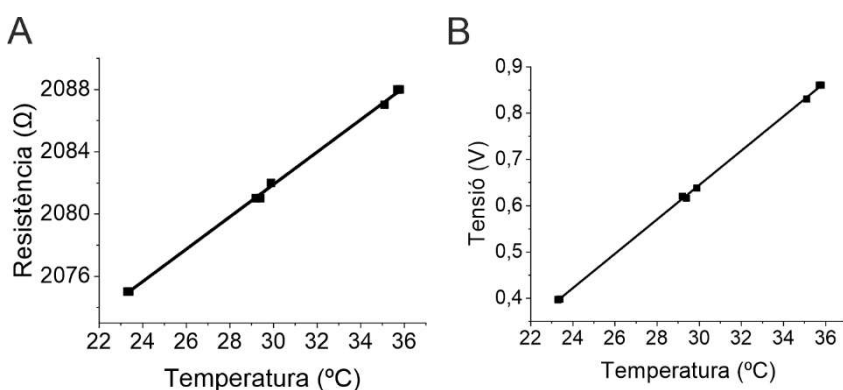


Figura B.6: Valors experimentals de resistència i tensió durant les variacions de temperatura.

Caracterització electrotermal del microescalfador

Es va avaluar el rendiment del microescalfador aplicant una tensió constant de 30 V durant 60 minuts, mentre el dispositiu es trobava submergit en 35 ml d'aigua ultrapura a una temperatura inicial de 21,9 °C. Es va observar un increment de temperatura aproximadament d'1 °C després dels 60 minuts, confirmant l'escalfament per efecte Joule.

L'estat estacionari es va assolir al cap de 20 minuts, i la potència dissipada es va estimar en 45,7 mW. L'evolució temporal de la tensió de sortida es mostra a la Figura B.7, indicant un augment estable i gradual durant la fase d'escalfament.

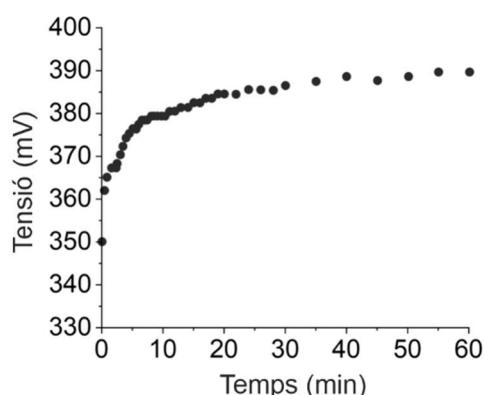


Figura B.7: Evolució temporal de la tensió de sortida durant el funcionament del microescalfador sota 30 V constants en aigua ultrapura.

Conclusions

Els resultats confirmen que els MEAs fabricats presenten un bon rendiment elèctric i estructural, especialment aquells fabricats amb la configuració metàl·lica Cr/Au (oblia 1 i 2). La inspecció amb microscòpia òptica i SEM ha permès confirmar la qualitat dels elèctrodes d'or, alhora que ha posat de manifest limitacions en la deposició de platí a l'oblia 4. El sensor de temperatura integrat ha demostrat una resposta estable i lineal en tensió davant canvis de temperatura, així com un comportament resistiu coherent. El microescalfador també ha funcionat com s'esperava, permetent una modulació tèrmica localitzada amb un consum de potència moderat. Aquests elements electrotèrmics aporten un valor afegit important a la plataforma MEA, permetent estudis futurs que requereixin un control ambiental precís.

Com a proper pas, es recomana validar els MEAs en condicions biològiques, utilitzant cultius de cèl·lules neuronals. Per permetre la monitorització òptica durant experiments electrofisiològics, les futures iteracions de fabricació haurien d'utilitzar substrats transparents de vidre en lloc de silici.

Annex C: Sensors de clorur ChemFETs

Introducció

La monitorització contínua de la concentració d'ions en cultius cel·lulars és essencial per a l'estudi del metabolisme, la viabilitat cel·lular i la producció de biomolècules d'interès, com proteïnes terapèutiques o metabòlits específics. Els ions regulen processos fisiològics clau com l'equilibri osmòtic, el potencial de membrana i la senyalització intracel·lular, afectant directament la funció i el destí de les cèl·lules. En particular, el clorur (Cl^-) participa en la regulació del pH, el control del volum cel·lular i processos d'apoptosi entre d'altres [275], fet que el converteix en un bon marcador de l'estat metabòlic i de situacions d'estrès cel·lular.

Per detectar ions en entorns tan complexos com els medis de cultiu, sovint s'utilitzen sensors potenciomètrics com els ISEs o ISFETs. Aquests sensors mesuren el potencial generat a través d'una membrana selectiva, que interacciona amb l'ió d'interès. Els ISFETs, a més, ofereixen avantatges addicionals com la seva mida reduïda, integrabilitat en sistemes miniaturitzats i baix consum energètic. Quan aquests dispositius són funcionalitzats amb membranes que contenen ionòfors, molècules capaces de reconèixer ions específics, es coneixen com a ChemFETs.

Els ChemFETs basen el seu funcionament en l'equació de Nernst i permeten una detecció selectiva d'ions. No obstant això, l'elecció del material de membrana és crítica per garantir-ne la selectivitat, estabilitat i compatibilitat amb l'entorn biològic. Encara que el policlorur de vinil (PVC) ha estat àmpliament utilitzat, presenta certes limitacions, com una menor biocompatibilitat. Davant d'això, la fibroïna de seda emergeix com una alternativa prometedora: és biocompatible, estable en entorns

aquosos i pot reduir el *biofouling*, tal com s'ha demostrat en altres capítols d'aquesta tesi.

En aquest annex es presenta el desenvolupament de ChemFETs sensibles a clorur utilitzant membranes de fibroïna amb l'ionòfor TDDMACl. Els sensors van presentar una elevada interferència amb altres anions, com el nitrat, limitant-ne l'aplicació directa en medis de cultiu cel·lular. Per aquest motiu, aquest estudi s'inclou com un annex separat del cos principal de la tesi, centrat en sensors amb major especificitat i aplicabilitat directa en entorns biològics.

Fabricació d'ISFETs d'òxid

La fabricació dels ISFETs d'òxid va seguir una seqüència similar a la del procés estàndard d'ISFET, amb modificacions específiques per excloure la deposició i el patró de la capa de nitrur de silici.

El procés de fabricació va començar amb oblies de silici de tipus p, i es van seguir els passos (a) fins a (f) de la Figura 4.2.2 tal com es descriu en la fabricació dels ISFETs de nitrur. Això inclou el creixement de l'òxid de camp, la fotolitografia per a la difusió de font i drenador, la implantació de fòsfor, la definició de la porta i els contactes, i la formació de l'òxid de porta. No obstant això, la deposició de la capa de nitrur de silici (pas g) i el seu patró mitjançant fotolitografia i gravat per plasma reactiu (pas h) van ser suprimits. El procés es va reprendre amb la formació dels contactes d'alumini (passos i i j) i la deposició i patró de la capa final de passivació (passos k i l).

Els xips es van dividir en xips de 3 mm x 3 mm amb el disseny de la Figura C.8, per després cablejar i encapsular de la mateixa manera que els ISFETs de nitrur.

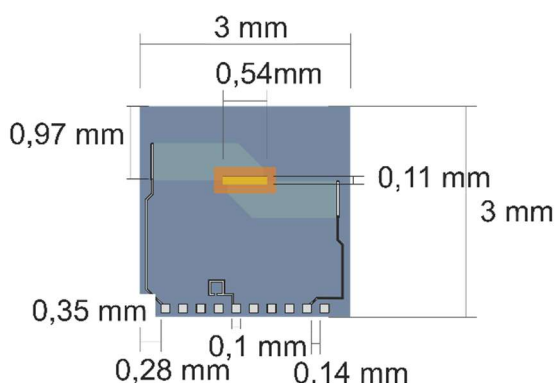


Figura C.8: Esquema i mesures dels xips ISFET d'òxid.

Un cop els xips van ser encapsulats, es va procedir a la seva funcionalització amb fibroïna. Les portes dels ISFETs es van netejar prèviament amb etanol (96%) i aigua desionitzada, i posteriorment es van assecar amb nitrogen.

Per preparar la solució funcional, es va barrejar fibroïna al 21% (p/p) amb l'ionòfor específic per clorur, el clorur de tridodecilmetilamoni (TDDMACl), en tres proporcions diferents: 33%, 50% i 75% d'ionòfor respecte al pes de la fibroïna. La mescla es va homogeneïtzar mitjançant agitació vigorosa amb una vareta fins a obtenir una solució uniforme.

La solució resultant es va dipositar sobre la zona activa dels ISFETs, assegurant que la finestra de detecció quedés completament coberta i que el pou es trobés degudament omplert. Els dispositius es van deixar assecar a temperatura ambient durant 16 hores, seguides d'un tractament en condicions de buit controlat (-900 mbar) i atmosfera humida durant 24 hores, per afavorir la cristal·lització de la fibroïna i estabilitzar la membrana.

Finalitzat aquest procés, els ISFETs funcionalitzats (a partir d'ara anomenats ChemFETs) es van condicionar per immersió en una solució 1 M de l'ió objectiu (clorur) durant tota la nit. Un cop condicionats, es

van emmagatzemar en una solució aquosa de KCl 10^{-3} M, protegits de la llum per preservar la integritat i funcionalitat dels ionòfors.

Les mesures electroquímiques es van dur a terme de la mateixa manera que per als ISFETs descrits a la secció 5.3.4.

Resultats i discussió

S'ha dut a terme l'optimització de la concentració d'ionòfor en membranes de ChemFET basades en fibroïna de seda per determinar el seu impacte en el rendiment del sensor per a la detecció d'ions clorur. Es van preparar tres composicions de membrana diferents variant les proporcions de fibroïna (F) i ionòfor (I): 50% F – 50% I, 67% F – 33% I i 33% F – 67% I. La mescla obtinguda presentava una consistència molt viscosa, similar a una crema o gel. Aquest gel es va dipositar sobre la finestra del sensor fins a omplir-la completament. Tot seguit, es va deixar assecar a temperatura ambient durant tota la nit i es va sotmetre al tractament de cristal·lització en condicions de buit humit durant 24 hores. La matriu resultant no va reduir el seu volum i presentava un aspecte translúcid. Per a cada composició es van fabricar $N = 4$ sensors.

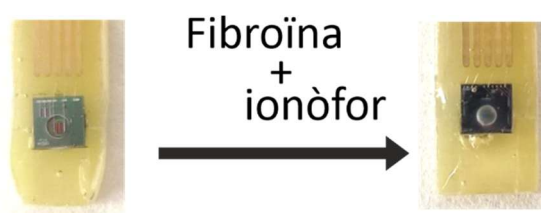


Figura C.9: Fabricació de ChemFET a partir d'un ISFET d'òxid.

La resposta potencial de cada sensor es va mesurar enfront d'un rang de concentracions d'ions clorur. A partir d'això es van determinar la sensibilitat (mV per dècada de pCl) i el límit de detecció (LOD), per a $n = 8$ de cada formulació. L'objectiu era identificar la proporció òptima de

fibroïna respecte a l'ionòfor que proporcionés la màxima sensibilitat amb el mínim límit de detecció possible. Les corbes de calibratge obtingudes per a cada composició de membrana es mostren a la Figura C.10. Els resultats més rellevants es poden resumir de la manera següent; La composició 33% F – 67% I va presentar una sensibilitat de $53,7 \pm 4,4$ mV/pCl i un LOD de $3,4 \pm 0,8$ pCl. La composició 50% F – 50% I va mostrar una sensibilitat de $-53,3 \pm 4,0$ mV/pCl i un LOD de $4,8 \pm 0,3$ pCl. La composició 67% F – 33% I va assolir una sensibilitat de $54,3 \pm 4,2$ mV/pCl i un LOD de $4,0 \pm 0,3$ pCl.

Tot i que les tres formulacions presenten sensibilitats similars, s'observen diferències notables en el límit de detecció. Els resultats suggereixen que la composició 50% F – 50% I proporciona el millor rendiment pel que fa al límit de detecció, fet que la fa la formulació més adequada per a la detecció d'ions clorur.

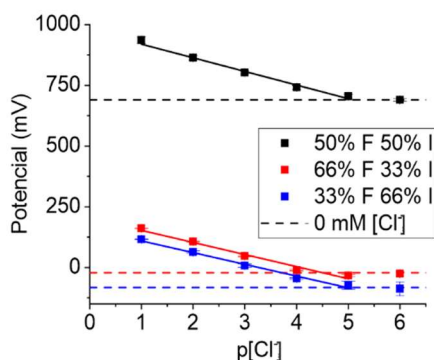


Figura C.10: Calibratges de diferents concentracions de la membrana fibroïna-ionòfor.

La presència d'histeresi en els ChemFETs amb diferents proporcions de fibroïna i ionòfor es va avaluar per estudiar-ne l'estabilitat i la repetibilitat. L'histeresi, definida com la diferència en la resposta del sensor quan es mesura la concentració d'ions en un ordre creixent o

decreixent, és un factor important que afecta la fiabilitat dels sensors potenciomètrics. Es va mesurar la resposta de potencial en ambdós sentits (creixent i decreixent) de concentració d'ions clorur, fins al límit de detecció (LOD) de cada sensor. Les respostes potencials enregistrades per a cada composició de membrana es mostren a la Figura C.11A–C, amb les respostes individuals de cada ChemFET representades per grups: les mesures de potencial a baixes concentracions de clorur mostren una resposta pràcticament plana, indicant el baix LOD en les composicions 33% F – 67% I i 67% F – 33% I, tal com s'havia observat anteriorment.

La Figura C.11D mostra la sensibilitat de cada formulació en les mesures de concentració de clorur tant creixents com decreixents. Els resultats indiquen que no hi ha una histèresi substancial en cap de les formulacions, ja que la sensibilitat es manté relativament constant en ambdós sentits de mesura. L'absència d'histèresi significativa en totes les composicions assajades suggereix que els ChemFETs presenten una bona reversibilitat i una elevada repetibilitat en la detecció d'ions clorur.

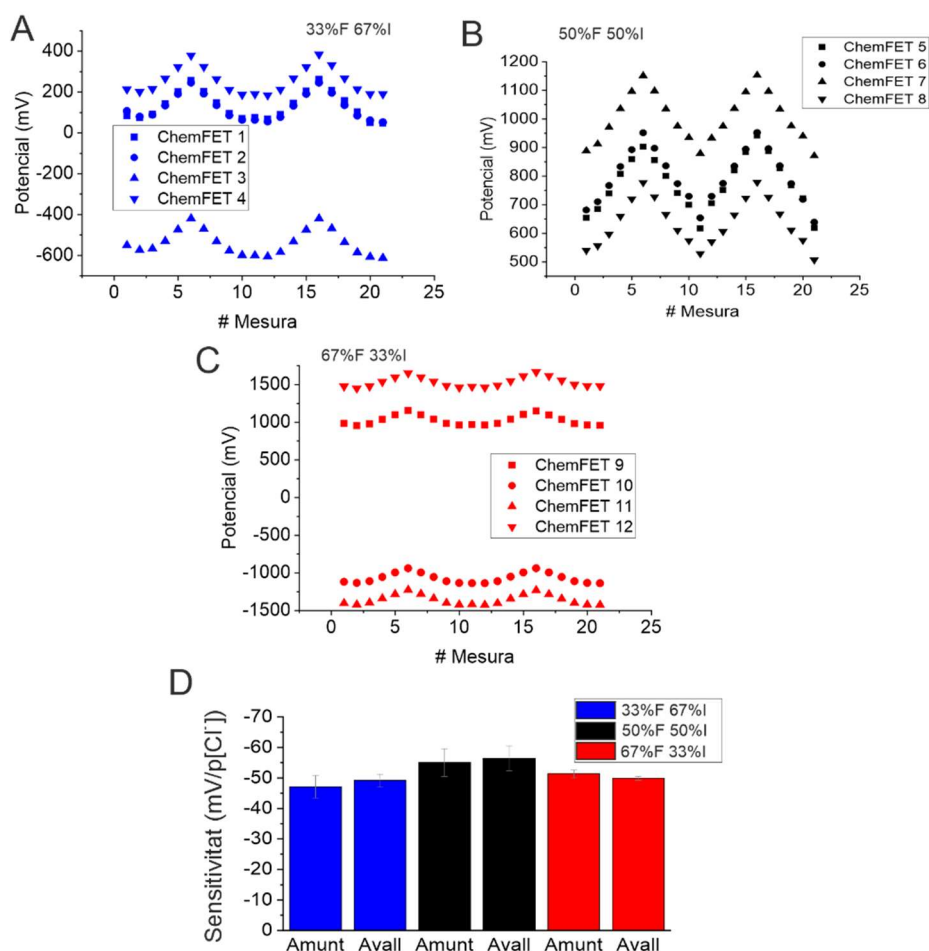


Figura C.11: Estudi de la histèresi en ChemFETs. (A) Calibratge creixent i decreixent per a la composició 33% F – 67% I. (B) Calibratge creixent i decreixent per a la composició 50% F – 50% I. (C) Calibratge creixent i decreixent per a la composició 67% F – 33% I. (D) Sensibilitats mitjanes per als calibratges creixents i decreixents de cada composició.

Per estudiar la compatibilitat estructural entre la fibroïna de seda i l'ionòfor de clorur, es va dur a terme espectroscòpia FTIR (Figura C.12) en quatre mostres: ionòfor pur, fibroïna amorfa, fibroïna cristal·litzada i fibroïna amb ionòfor (proporció 50:50).

L'espectre de l'ionòfor va presentar pics característics a 2953, 2914, 2846, 1467 i 718 cm^{-1} , corresponents a vibracions d'estirament i flexió dels enllaços C–H. Quan es va integrar dins de la matriu de fibroïna, el pic a 1467 cm^{-1} va esdevenir notablement menys visible, probablement a causa d'interaccions moleculars dins de l'estructura proteica més densa.

En la membrana de fibroïna amb ionòfor, la banda amida I a 1621 cm^{-1} , associada a la formació d'estructures *β -sheet*, va mostrar-se més intensa que en la fibroïna amorfa, indicant que l'ionòfor afavoreix la cristal·lització de la fibroïna. A més, es va observar una espatlla a 1264 cm^{-1} , una característica típica de la fibroïna cristal·litzada, fet que reforça aquesta conclusió. Aquests resultats suggereixen que l'ionòfor no només és compatible amb la matriu de fibroïna, sinó que també incrementa la cristal·lització. Aquesta cristal·linitat augmentada pot contribuir a una millor estabilitat de la membrana i a un rendiment superior en aplicacions de detecció.

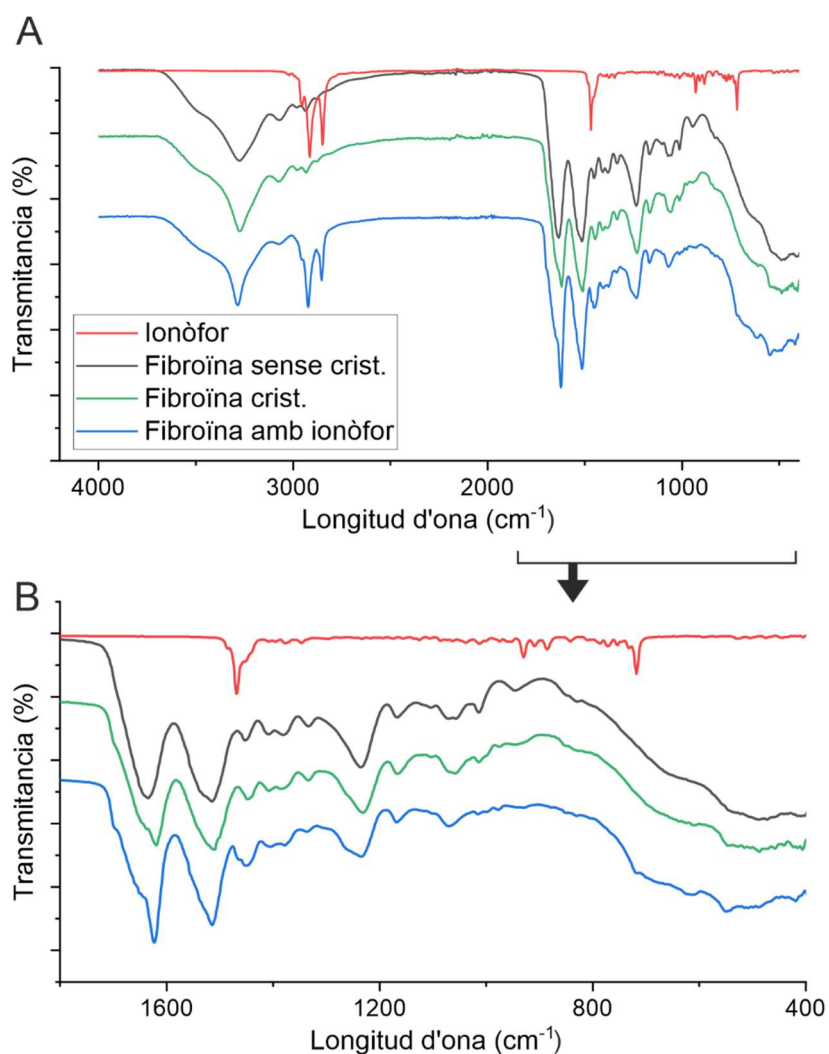


Figura C.12: Estudi FTIR de l'ionòfor TDDMACI i la fibroïna. Espectres FTIR de l'ionòfor pur, fibroïna de seda amorfa, fibroïna cristal·litzada i membrana de fibroïna amb l'ionòfor.

Per avaluar la selectivitat dels ChemFETs sensibles al clorur, es van provar possibles interferències d'ions comuns en medis biològics (Figura C.13): pH (Panell A), fosfat (Panell B) i nitrat (Panell C).

L'objectiu era analitzar si aquestes espècies influeixen en la resposta del sensor dins del rang de concentracions fisiològiques.

La calibració amb pH va mostrar una resposta pràcticament plana, amb el potencial mantenint-se estable en un ampli rang (pH 4–9). Això indica que el pH no interfereix amb el funcionament del sensor, cosa coherent amb l'ús d'ISFETs basats en òxid amb baixa sensibilitat als protons.

El fosfat (PO_4^{3-}) va provocar una lleugera caiguda de potencial per valors de pPO_4 inferiors a 3. Tot i que no es va observar una tendència lineal clara, aquest comportament suggereix una interacció considerable a altes concentracions.

En canvi, el nitrat (NO_3^-) va mostrar una resposta de potencial forta i lineal, amb una sensibilitat de -53 mV/pNO_3 , propera al valor teòric de Nernst per a anions monovalents. Això indica que l'ionòfor emprat a la membrana no és altament selectiu pel clorur i respon també de manera significativa al nitrat. Aquest fet s'explica per la naturalesa química de l'ionòfor, ja que els ionòfors de nitrat poden ser també amines quaternàries, com el TDDMACl.

En conjunt, aquests resultats demostren que el ChemFET sensible al clorur és estable respecte al pH, moderadament afectat pel fosfat a altes concentracions, però molt sensible al nitrat, fet que posa en evidència una manca de selectivitat. Aquesta forta interferència del NO_3^- indica que el sensor no és adequat per a l'ús directe en medis biològics complexos com els cultius cel·lulars, on coexisteixen múltiples anions.

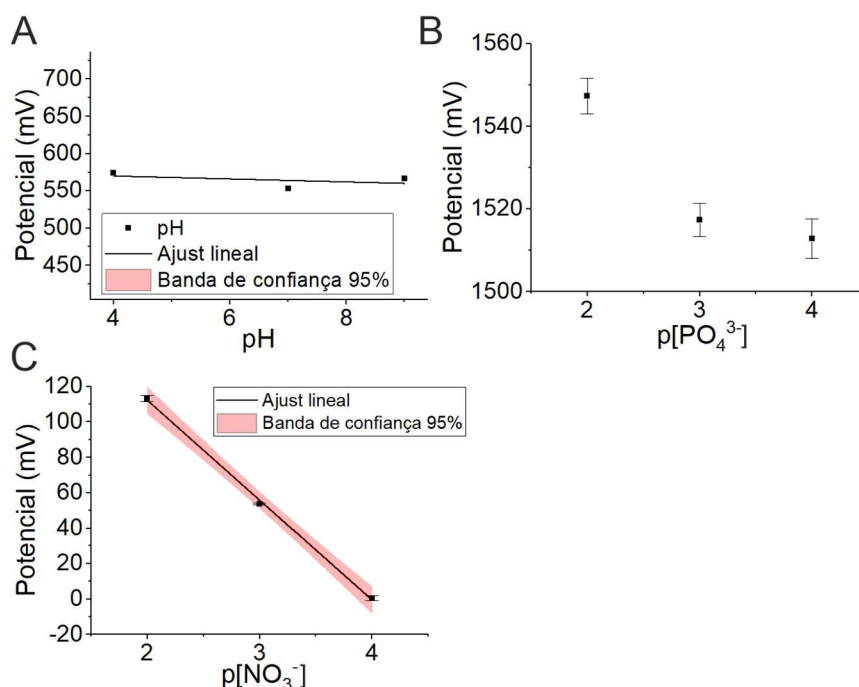


Figura C.13: Estudi d'interferències del ChemFET sensible al clorur. (A) Resposta del sensor a variacions de pH. (B) Resposta al fosfat (PO_4^{3-}). (C) Resposta al nitrat (NO_3^-).

Conclusions

En aquest estudi, s'ha desenvolupat un ChemFET sensible al clorur mitjançant la incorporació de tridodecilmetilamoni clorur (TDDMACl) com a ionòfor en una membrana de fibroïna de seda sobre ISFETs d'òxid. Aquest biosensor pretén combinar la capacitat de reconeixement iònic del TDDMACl amb la biocompatibilitat i la versatilitat estructural de la fibroïna de seda, per a un possible ús en medis biològics.

La formulació amb millor comportament (33% de fibroïna, 67% d'ionòfor) va mostrar una sensibilitat propera al valor de Nernst (~ 54 mV/pCl) i un límit de detecció (LOD) de $3,2 \pm 0,8$ pCl. Les caracteritzacions posteriors van confirmar una baixa histèresi i una

bona integració de la membrana segons els espectres FTIR (amb presència de β -sheet i incorporació del ionòfor).

Tanmateix, els estudis d'interferències van revelar limitacions importants. Malgrat que el pH no va influir en el senyal, el nitrat (NO_3^-) va generar una resposta forta ($\sim 53 \text{ mV/pNO}_3$) i el fosfat (PO_4^{3-}) també va afectar el potencial a concentracions elevades. Aquestes interferències s'atribueixen a la baixa selectivitat del TDDMACl i a l'absència de propietats d'exclusió iònica a la matriu de fibroïna, que no disposa de repulsió de càrrega com es troba en altres membranes (per exemple, a base de PVC o poliuretà) [112], [276].

Així doncs, el disseny actual del ChemFET no és adequat com a sensor autònom per a la detecció de clorur en medis complexos com els cultius cel·lulars. Per millorar-ne la selectivitat i la robustesa, futures línies de desenvolupament podrien explorar la modificació de la matriu de fibroïna amb additius impermeables (com ara polisiloxans o polímers hidrofòbics), o bé integrar sistemes multisensorials —coneguts com a llengües electròniques— en què un conjunt de sensors semi-selectius amb sensibilitats solapades pugui proporcionar una resposta global [277], [278], [279].

Annex D: Currículum abreujat

Beques i subvencions:

- FPI, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MICIU), (AEI) amb la referència PRE2019-088338.
- PROYECTOS DE GENERACIÓN DE CONOCIMIENTO, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MICIU), (AEI) amb la referència PID2021-127653NB-C21.

Projectes participats:

- **LAB4CELL:** Sistemas lab-on-chip basados en tecnología microelectronica y fotónica para el control de cultivos celulares y comportamiento neuronal. Referència: RTI2018-100773-B-C31.
- **CHIP4CELL:** Integración de biosensores, matrices de microelectrodos 3D y circuitos fotónicos con tecnología compatible CMOS. Referència: PID2021-127653NB-C21.
- **BIO-C-CHIP:** Valorización de Biotintas basadas en celulosa conteniendo células mediante la producción de demostradores-prueba de conceptos para la regeneración epitelial y sensores fotónicos. Referència: PDC2023-145826-I00.

Congressos derivats dels resultats de la tesi:

Fibroin functionalization of ISFETs for the production of long-life (bio)sensors. A. Moreno, A. Cadarso, M. Rovira, C. Domínguez, X.

Muñoz, C. Jiménez. (Contribució oral en el XXV Cross-Border Meeting on Sensors and Biosensors, en línea, 2021).

Use of protein-based silk-fibroin films for the fabrication of antifouling electrochemical biosensors. A. Moreno, A. Cadarso, M. Rovira, C. Domínguez, X. Muñoz, C. Jiménez. (Contribució oral en el EPoSS Annual Forum 2022, en Turin, Itàlia, 2022).

Modified ISFETs with silk fibroin membrane for pH measurements in biological matrices. A. Moreno, P. Giménez, M. Rovira, A. Cadarso, C Jiménez, C. Domínguez, X. Muñoz. (Contribució oral en el 12th Ibero-American Congress on Sensors, en Aveiro, Portugal, 2022).

New sensors based on microelectronic technologies for cell culture monitoring. A. Moreno, G. Guirado, C. Domínguez, C. Jiménez, X. Muñoz. (Contribució poster I oral en el Doctoral Workshop of the PhD programme in Chemistry, en Bellaterra, Espanya, 2023).

Long-term enzymatic biosensor for glucose monitoring in cell culture media. A. Moreno, M. Ben, S. Santiago, C. Domínguez, S. D. Aznar-Cervantes, X. Muñoz-Berbel, C. Jiménez-Jorquera. (Contribució poster I oral en el XXVII Transfrontier Meeting on Sensors and Biosensors, en Perpignan, França, 2023).

Silk Fibroin as a Matrix for Robust Enzymatic Glucose Sensors in Cell Culture Media A. Moreno Diaz, B. Vila, A. C. Reguera, R. Rodríguez-Rodríguez, S. D. Aznar-Cervantes, C. Jiménez-Jorquera, X. Muñoz-Berbel. (Contribució oral en el International Meeting on Chemical Sensors, Freiburg, Alemanya, 2025).

Articles derivats de l'activitat de la tesi:

Nanoporous silk films with capillary action and size-exclusion capacity for sensitive glucose determination in whole blood. A. Márquez, M. V. Santos, G. Guirado, A. Moreno, S. D. Aznar-Cervantes, J. L. Cenis, S. H. Santagneli, C. Domínguez, F. G. Omenetto, X. Muñoz-Berbel. (*Lab on a Chip*)

Silk Fibroin-Functionalised ISFETs for Long-Term pH Monitoring in Cell Cultures. A. Moreno, J. D. Urbano, A. C. Reguera, R. Rodríguez-Rodríguez, S. D. Aznar-Cervantes, F. Perdigones, C. Aracil, J. M. Quero, C. Domínguez Horna, C. Jiménez-Jorquera, X. Muñoz-Berbel, (*en revisió en Analytica Chimica Acta*)

Silk based enzymatic biosensor with a superior stability for long-term amperometric glucose monitoring in cell cultures. A. Moreno, B. Vila, A. C. Reguera, R. Rodríguez, S. D. Aznar, C. Jiménez, P. Giménez and X. Muñoz-Berbel. (*enviat a ACS sensors*)

Thermal transference of micro-waveguides to solvent-sensitive thermoplastic substrates in the production of all-polymeric photonic lab-on-a-chip devices. T. N. Ackermann, A. Moreno, A. Ferrer, M. Mañez, P. Giménez-Gómez, N. Vigués, J. Mas, C. Domínguez, J. Jiménez, X. Munoz-Berbel, (*en preparació*)

Demonstrator for optical biosensing of cell activity using 3D cell guides. A. Moreno, S. Díaz, C. Reguera, P. Giménez, C. Jiménez, A. Laromaine, X. Muñoz, (*en preparació*).

Articles relacionats amb l'activitat de la tesi:

Integrated Platform Enabling Simultaneous Microextraction and Chemical Analysis On-Chip by Using Impedance Technique. E.

Santigosa-Murillo, A. Moreno, M. Ramos-Payán, J.M. Ríos, X. Muñoz-Berbel, M. Muñoz, P. Giménez-Gómez. (*Microchemical Journal*)

Formacions:

Arnau Vidaña Garcia – TFG, Grau en Química – UAB.

Pere Munar Vallespir – TFG, Grau en Química – UAB.

Aina Vera Maroto – Practiques externes, Grau en Química – UAB.

Biel Vila Flores – TFG, Grau en Biomedicina – UIC.

