



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN COMPUTACIÓN

Secretaría de Investigación y Posgrado

Diseño y Caracterización de un Biosensor
en Modo de Resonancia para la
Detección de Microorganismos Patógenos.

T E S I S

que para obtener el Grado de
Maestro en Ciencias en Ingeniería de Cómputo
con opción de Sistemas Digitales

P R E S E N T A

Ing. Víctor Francisco Martínez Silva



Directores de Tesis:
Dr. Luis Alfonso Villa Vargas y
Dr. José Jorge Chanona Pérez

México, Distrito Federal

Junio, 2012



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 12:00 horas del día 11 del mes de mayo de 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del:

Centro de Investigación en Computación

para examinar la tesis titulada:

“Diseño y caracterización de un biosensor en modo de resonancia para la detección de microorganismos patógenos”

Presentada por el alumno:

MARTÍNEZ
Apellido paterno

SILVA
Apellido materno

VÍCTOR FRANCISCO
Nombre(s)

Con registro:

A	1	0	0	2	8	6
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de: **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA DE CÓMPUTO CON OPCIÓN EN SISTEMAS DIGITALES**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de Tesis


Dr. Luis Alfonso Villa Vargas


Dr. José Jorge Chanona Pérez


Dr. Víctor Hugo Ponce Ponce


Dr. Marco Antonio Ramírez Salinas


Dr. Herón Molina Lozano

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Luis Alfonso Villa Vargas



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN COMPUTACIÓN
DIRECCIÓN



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México D.F. el día 16 del mes de mayo del año del 2012, el (la) que suscribe Víctor Francisco Martínez Silva alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería de Cómputo con opción en Sistemas Digitales con número de registro A100286, adscrito al Centro de Investigación en Computación, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Luis Alfonso Villa Vargas y el Dr. José Jorge Chanona Pérez y cede los derechos del trabajo intitulado Diseño y Caracterización de un Biosensor en Modo de Resonancia para la Detección de Microorganismo Patógenos, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección vfsilva@yahoo.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Víctor Francisco Martínez Silva

Nombre y Firma

Resumen

Los microorganismos se encuentran presentes inevitablemente en el ambiente y en todo tipo de alimentos y materiales biológicos. Por ello, su detección temprana, es importante para la prevención y control de las enfermedades.

En la última década, el desarrollo de micro y nanoestructuras para la detección de cantidades casi imperceptibles de microorganismos patógenos, ha sido una alternativa importante; ya que ofrecen características multifuncionales, además de ser altamente sensibles y de permitir detección biológica con un alto grado de especificidad.

Por lo anterior, la simulación y caracterización de dichos microsistemas juega un papel muy importante en el diseño de éstos.

El presente trabajo de tesis muestra la simulación de varias microestructuras resonantes, conocidas como cantilivers. La herramienta utilizada fue COMSOL Multiphysics, empleándose el método de elemento finito para el tratamiento numérico.

Los diseños de cantilivers propuestos para la medición del cambio de masa de forma óptica es de *largo* = $50\mu m$, *ancho* = $5\mu m$ y *espesor* = $1\mu m$ y $0,5\mu m$ y capacitiva es de *largo* = $450\mu m$, *ancho* = $10\mu m$ y *espesor* = $1\mu m$ y $0,5\mu m$.

Abstract

The microorganisms are inevitably present in the environment and all kinds of food and biological materials. Therefore, early detection is important for the prevention and control of disease.

In the last decade, the development of micro and nanostructures for detecting amounts almost imperceptible of pathogenic microorganisms has been an important alternative, since they offer multifunctional characteristics, besides being highly sensitive and allowing biological detection with a high degree of specificity.

Therefore, the simulation and characterization of these micro plays an important role in the design thereof.

This thesis shows the simulation of several resonant microstructures, known as cantilevers. The tool used was COMSOL Multiphysics, employing the finite element method for the numerical treatment.

Designs cantilevers proposed for measuring the mass change optically is *length* = $50\mu m$, *width* = $5\mu m$ and *thickness* = $1\mu m$ and $0,5\mu m$ and capacitive is *long* = $450\mu m$, *width* = $10\mu m$ and *thickness* = $1\mu m$ and $0,5\mu m$.

Agradecimientos

Agradezco a mi madre María de Jesús Silva de la Barrera y mi padre Erasmo Baltazar Mat3n3z Reyes†, a mis hermanas M3nica, Alicia, Vanessa y Milagros y mi hermano Baltazar por su amor, apoyo y compa3a.

Agradezco a mi t3a Mar3a de los 3ngeles Silva de la Barrera por su amor y apoyo que me brind3 en todo este tiempo.

Agradezco a mis amigos y amigas Robert, Oscar, Daney, Dennis, Fabiola, Mayuric, Nayeli, Leonor y mis compa3eros de la maestr3a Edgar, Jes3s, Jaime, Remy, Dutch por todo su apoyo durante los estudios. Tamb3n a Gabriela Mendoza Madrigal por su disposici3n y apoyo al trabajo conjunto que tuvimos durante este tiempo.

Agradezco al Dr. Luis Alfonso Villa Vargas, Dr. Marco Antonio Ram3rez Salinas, Dr. Jes3s Alberto Mart3n3z Castro y Dr. Jos3 Jorge Chanona P3rez por sus ense3anzas, su experiencia y apoyo para la realizaci3n de este trabajo de tesis.

Este trabajo ha sido soportado en parte por la SIP-IPN bajo el proyecto 20113709 asignado al CIC-IPN, por el ICyTDF bajo proyecto 317-2009 asignado al CNMN y por el CONACyT bajo los proyectos 124104 asignado al CIC-IPN y 115976 asignado al CENAM.

Índice general

1. Introducción	13
1.1. Antecedentes	13
1.1.1. MEMS	13
1.1.1.1. Antecedentes Históricos	13
1.1.1.2. Definiciones y Conceptos	14
1.1.1.3. Cantilivers	14
1.1.2. La Ciencia e Ingeniería de los Materiales	17
1.1.2.1. Propiedades Mecánicas de los Materiales	18
1.1.2.2. Clasificación General de los Materiales	18
1.1.2.3. Clasificación de los Materiales de acuerdo al Orden Atómico.	20
1.1.2.4. Silicio y Polisilicio	22
1.2. Planteamiento del Problema	26
1.3. Justificación	27
1.4. Hipótesis	29
1.5. Objetivos	29
1.5.1. Objetivo General	29
1.5.2. Objetivos Específicos	29
1.6. Alcance	30
1.7. Metodología de la Investigación	30
1.8. Resumen	30
2. Biosensores	33
2.1. Detección de Microorganismos	33
2.1.1. Métodos Convencionales	33
2.1.2. Métodos Basados en MEMS	35
2.1.2.1. Sensores Químicos	35
2.1.2.2. Sensores Biológicos	37

2.1.2.3. Sensores de Masa	38
2.2. Resumen	40
3. Física de Biosensores Basados en MEMS	41
3.1. Modelo Físico	41
3.1.1. Desplazamiento	45
3.1.2. Constante de Elasticidad	46
3.2. Frecuencia natural	46
3.2.1. Variación en la frecuencia por cambio de masa	47
3.3. Resumen	48
4. Últimos Avances en el Diseño y Construcción de MEMS basados en Cantilivers	49
4.1. Sensores Electroquímicos	50
4.2. Sensores Basados en Detección Óptica	51
4.3. Sensores Basados en Detección de Cambios de Masa	52
4.4. Cantilivers en Modo Dinámico	54
4.4.1. Características Físicas Reportadas	55
4.5. Resumen	56
5. Propuesta de Diseño	57
5.1. Consideraciones de Diseño	58
5.2. Simulación	59
5.2.1. Constante de Elasticidad	59
5.2.2. Desplazamiento	60
5.2.3. Frecuencia propia o natural	61
5.2.4. Resolución del Cantiliver	63
5.3. Resumen	65
6. Conclusiones y Trabajo Futuro	67
6.1. Conclusiones	67
6.2. Trabajo Futuro	69
A. Proceso de Fabricación de Cantilivers	71
B. Fundamentos de Microbiología y Pruebas de Crecimiento en Cantilivers de Microscopía de Fuerza Atómica	77
B.1. Crecimiento de Microorganismos	77
B.2. Funcionalización	80

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	3
C. Pautas para el diseño de un biosensor	87

Índice de figuras

1.1.	Formas de transducción de los cantilivers.	17
1.2.	Niveles de ordenamiento atómico en los materiales.	21
1.3.	Distintos planos de cristal para una simple red cúbica de átomos.	22
1.4.	Defunciones por enfermedades intestinales a nivel nacional	28
2.1.	Métodos convencionales para la detección de micro organismos patógenos.	34
2.2.	Representación esquemática de un sensor químico o biológico.	36
3.1.	Dimensiones de la viga cantiliver y línea neutra	42
3.2.	Radio de curvatura de una viga flexionada	43
3.3.	Viga cantiliver de sección transversal rectangular	44
5.1.	Características físicas y geométricas de un cantiliver	57
5.2.	Geometría del biosensor propuesto basado en cantilivers.	58
5.3.	Constante de elasticidad	59
5.4.	Desplazamiento vertical	61
5.5.	Frecuencia propia	62
5.6.	Gráfica del cambio de frecuencia	63
5.7.	Gráfica de la masa efectiva detectada	65
A.1.	Curvas de oxidación del horno Minibrute Middle.	72
A.2.	Curva de velocidad de centrifugado de la resina HPR 504.	73
A.3.	Esquemas de las fotomáscaras para la columna y los dispositivos a fabricar.	73
B.1.	Curva típica de crecimiento bacteriano.	78
B.2.	Principio de funcionamiento del microscopio de fuerza atómica.	80
B.3.	Sistema acoplado para la funcionalización de cantilivers.	81

B.4. Curvas de A vs f en función del tiempo	83
B.5. Microorganismos (<i>Lactobacillus plantarum</i>) creciendo en la superficie de agarosa de los cantilivers funcionalizados.	84
B.6. Cinética del cambio de la señal integrada de los cantilivers. . .	85

Índice de cuadros

1.1. Módulo de Young y coeficiente de Poisson del Silicio.	23
1.2. Características físicas del Silicio.	23
1.3. Propiedades mecánicas del polisilicio.	25
4.1. Transductores electroquímicos utilizados en la detección de microorganismos patógenos	51
4.2. Transductores ópticos utilizados en la detección de microorganismos patógenos	52
4.3. Características de los distintos sensores de masa.	53
4.4. Trabajos basados en cantilivers para la detección de microorganismos patógenos	54
4.5. Características físicas de NEMS y MEMS en modo de resonancia.	55
5.1. Constante de Elasticidad	60
5.2. Desplazamiento total del cantiliver	60
5.3. Frecuencia propia del cantiliver	62
5.4. Cambio de frecuencia	64
5.5. Masa efectiva detectada	64
A.1. Receta para el grabado de plasma en el SiO ₂	74
A.2. Receta para la deposición del polisilicio.	74
A.3. Receta para el grabado en el polisilicio.	75

Glosario

$\langle \vartheta \rangle$	Radio de curvatura medio
δf	Cambio de frecuencia
δm	Cambio de masa
μm	Micrómetros
ν	Coefficiente de Poisson
ρ	Densidad
ϑ	Radio de curvatura instantáneo
<i>ADN</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>AFM</i>	Atomic Force Microscope (MFA, Microscopio de fuerza atómica)
<i>ag</i>	Atogramo
<i>APPCC</i>	Prácticas de manufactura y análisis de riesgos y control de puntos críticos. En inglés HACCP, Hazard analysis and critical control points
<i>CAD</i>	Computer-Aided Design (Diseño asistido por computadoras)
<i>E</i>	Módulo de Young
<i>ELISA</i>	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)

F	Fuerza
f_o	Frecuencia natural de resonancia
fg	Femtogramos
g	Gramos
GPa	Giga pascales
H	Espesor (Thickness)
Hz	Hertz
I	Momento de inercia de la sección transversal
J	Jules
K	Grados Kelvin
k	Constante de elasticidad
kg	Kilogramos
L	Longitud (Length)
LCD	Liquid Crystal Display (Pantalla de cristal líquido)
$LPCVD$	Chemical Vapor Deposition (Deposición de Vaporización Química)
LRO	Long Range Order (Orden de largo alcance)
LSI	Large Scale Integration (Integración de escala larga)
M	Momento flector
m	Metros
m_b	Masa total de la porción suspendida de la viga
m_c	Masa concentrada o del microorganismo

m_o	Masa suspendida efectiva del cantiliver
<i>MEMS</i>	Microelectromechanical Systems (Sistemas Microelectromecánicos)
<i>MOS</i>	Metal Oxide Semiconductor (Semiconductor de Óxido Metálico)
<i>MST</i>	Microsystems Technology (Tecnología de Microsistemas)
n	Constante de la geometría asociada a la sección transversal de un cantiliver rectangular
<i>NEMS</i>	Nanoelectromechanical Systems (Sistemas Nanoelectromecánicos)
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
<i>PCR</i>	Polymerase Chain Reaction (Cadena de la polimerasa)
pg	Picogramos
<i>QCM</i>	Quartz Crystal Microbalance
<i>S</i>	Siemens
<i>SAW</i>	Surface Acoustic Wave (Onda acústica de superficie)
<i>SEM</i>	Scanning Electron Microscope
<i>SPR</i>	Surface Plasmon Resonance (Resonancia Plasmónica de Superficie)
<i>SRO</i>	Short Range Order (Orden de corto alcance)
<i>TEM</i>	Transmission Electron Microscope
W	Ancho (Width)

W	Watt
w	Desplazamiento vertical
zg	Zeptogramos
Índice de Miller	Conjunto de números (h, k, l) que identifican unívocamente un sistema de planos cristalográficos
Ar	Argón
Cantiliver	Viga o voladizo
Dosis infecciosa	Cantidad que debe ser consumida para dar lugar a síntomas de enfermedades transmitidas por los alimentos
driver	Dispositivo de salida o electrodo polarizador
GaAs	Arseniuro de galio
Periodo de incubación	Tiempo entre el consumo de un alimento contaminado y la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad
Si	Silicio
SiH_4	Silano
SiO_2	Dióxido de Silicio

Capítulo 1

Introducción

En el presente capítulo se presentan los principios de operación de microtransductores, iniciando con los antecedentes históricos y la definición de los sistemas microelectromecánicos; junto con las propiedades mecánicas y la clasificación de los materiales. Se define el planteamiento del problema, justificación, hipótesis, objetivos, alcance y metodología de la investigación del presente trabajo de tesis.

1.1. Antecedentes

1.1.1. MEMS

1.1.1.1. Antecedentes Históricos

Los microsistemas tienen varios años de usarse. En la década de los 60's ya se habían manufacturado matrices unidimensionales (arrays) de diodos MOS para visualizar imágenes y el grabado de silicio ya se utilizaba para crear membranas delgadas que podrían convertir la presión en una señal eléctrica. En estos años la idea de crear sensores integrados ya era evidente.

En los años 70 se comenzó a utilizar el grabado anisotrópico selectivo para la formación de diafragmas y surge el micro maquinado en volumen o profundo (bulk micromachining).

A principios de los años 80 se comienzan a fabricar sensores de presión en un chip integrado con lectura de salida. A mediados de esta misma década el micro maquinado de superficie aparece en escena en la manufactura de sensores

de presión, acelerómetros y otras micro estructuras. En este momento, junto con la creación de micro actuadores, surge la necesidad de referirse a estos sistemas por un nombre: sistemas microelectromecánicos (MEMS). Poco a poco se fue adoptando este término en el mundo científico y popular [1].

1.1.1.2. Definiciones y Conceptos

Los sistemas micro se refieren a dispositivos en el intervalo de tamaños de 1×10^{-6} m y contienen elementos y estructuras muy pequeñas que solo pueden ser observados empleando sistemas de microscopia. Por otra parte, un sistema micro electromecánico (MEMS) implica que hay elementos eléctricos y/o electrónicos y mecánicos es decir, partes movibles de algún tipo dentro del sistema pero a escalas del orden de los micrones.

En la práctica el concepto es mucho más extenso; ya que un MEMS puede contener dispositivos térmicos, magnéticos, de fluidos y ópticos. Los cuáles pueden ser o no eléctricos, electrónicos y mecánicos necesariamente.

Con respecto a su función, un MEMS puede realizar operaciones de adquisición y/o procesamiento de señales, desplegando datos, de control y como actuador. Lo que conllevan a tomar en cuenta el embalaje, la partición de componentes, la calibración, la relación señal — ruido, la estabilidad y la fiabilidad del dispositivo [1].

Un MEMS no es solo hacer “las cosas grandes pequeñas”, es aprovechar también las ventajas que por naturaleza se tienen a esta escala.

Los sistemas microelectromecánicos se conocen como MEMS en EE.UU., Tecnología de microsistemas (MST, Microsystems Technology) en Europa o Micromáquinas (micromechatronics) en Japón.

1.1.1.3. Cantilivers

Los cantilivers son MEMS sencillos llamados también vigas o voladizos. Este tipo de sistemas tienen la habilidad de detectar señales extremadamente pequeñas, es por ello que son muy buena alternativa para detectar estrés y fuerzas pequeñas [2].

Los cantiliver tienen su principal origen como sondas de detección en los microscopios de fuerza atómica (MFA), su funcionamiento se basa en detectar la interacción entre una superficie y una punta micrométrica o nanométrica que

se encuentra colocada en un extremo de una viga (cantiliver) del microscopio [3].

De acuerdo a la forma de funcionamiento los cantilivers se dividen en dos tipos: estáticos y dinámicos. El primero consiste en tener una flexión en la viga ocasionada por el elemento a ser detectado. Esta deflexión es la que se mide. El segundo consiste en excitar el voladizo a su estado natural de resonancia y detectar algún cambio en la frecuencia por la presencia del elemento a medir, a través de la amplitud, frecuencia de resonancia o fase [2].

Hay cinco formas de excitación para los cantilivers en modo dinámico:

- Electromagnética: La oscilación se produce por un campo magnético, para ésto el voladizo debe tener un material sensible al campo. Es frecuente su uso en puentes con alta resolución [4].
- Electrostática: La oscilación es por medio de un campo eléctrico entre la viga y el dispositivo de salida (driver¹). Este tipo de excitación se usa para medidas de masa [5].
- Electrotérmica: Se coloca un material muy resistivo sobre la superficie y entre el material y el cantiliver hay una tensión variable, provocando una compresión / expansión por medio del calor ocasionando el movimiento de resonancia en el cantiliver.
- Optotérmica: La resonancia es provocada por una fuente luminosa con potencia variable en el tiempo.
- Piezoeléctrica: Una tensión alterna sobre un material piezoeléctrico provoca la oscilación en el cantiliver.

Existen cinco maneras de medir el cambio de resonancia en los voladizos en modo dinámico:

- Capacitiva: La señal de lectura del transductor es la corriente capacitiva formada por el sistema integrado del cantiliver y el driver [6].

¹Dispositivo de salida o electrodo polarizador, el término “driver” proviene del idioma inglés

- Inductiva: El voladizo tiene un material conductor por el cual circula una corriente continua. Con el movimiento oscilatorio del cantiliver se genera un campo magnético que proporciona información sobre el movimiento.
- Óptica: Se lleva a cabo mediante una fuente de luz coherente (láser, dos puntos con una relación de fase constante) y un fotodiodo alineado con la luz reflejada por el voladizo se mide el movimiento de esta [5]. Es muy usada esta técnica con los detectores de masa con excitación electrostática, puede alcanzar una resolución de $5 \times 10^{-18}g$ [7].
- Piezoresistiva: El movimiento se detecta a través del material piezoeléctrico depositado en la base de anclaje del cantiliver que entrega una señal eléctrica proporcional al movimiento de ésta. Se utiliza mucho con microcanales con una resolución de $1.4 \times 10^{-17} g/\mu m^2$ [8].
- Piezoeléctrica: Se mide la variación de tensión del material piezoeléctrico que se mueve conjuntamente con el voladizo. Es muy parecido al método de lectura piezoresistivo.

Los métodos de detección en los cantilivers en modo estático son cuatro:

- Capacitivo: Se miden los cambios de capacitancia dados por la separación entre el cantiliver y un electrodo. Este método tiene desventajas si se quiere implementar a escala nanométrica, ya que las capacidades parásitas pueden dominar la capacidad dinámica que se da en el cambio de separación y es la que se quiere medir.
- Óptico: Este método consiste en hacer incidir un haz de luz láser sobre el voladizo y mediante un fotodetector se registra la luz reflejada. Al igual que el anterior tiene desventajas para escala nanométrica, por el límite de difracción de la luz.
- Piezoeléctrico: Se deposita una capa de material piezoeléctrico sobre el voladizo y se mide el potencial debido al estrés producido.
- Piezoresistivo: Mide las variaciones por la deflexiones en la resistencia de un material piezoresistivo depositado sobre el cantiliver.

En la Fig. 1.1 se muestra la conversión de los estímulos de entrada en señales de salida de los transductores, basados en cantilivers, y se asocia con una serie

de mecanismos de transducción. Según el parámetro medido - deformaciones estructurales o cambios de frecuencia de resonancia - el modo de funcionamiento del sensor puede ser referido como estática o en resonancia. Cada uno de estos modos, a su vez, puede estar asociada con diferentes escenarios de la transducción.

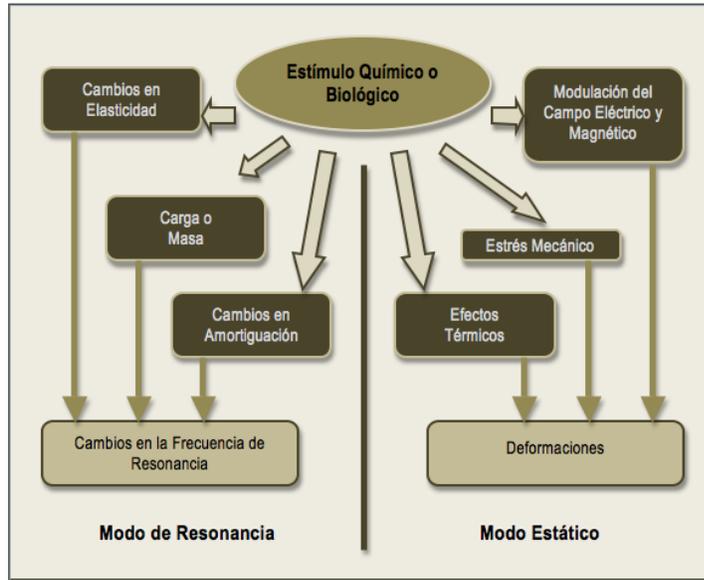


Figura 1.1: Formas de transducción de acuerdo al estímulo químico o biológico y el modo de operación de los cantilivers.

1.1.2. La Ciencia e Ingeniería de los Materiales

La ciencia e ingeniería de los materiales es un campo interdisciplinario que se ocupa de inventar nuevos materiales y mejorar los ya conocidos, mediante el desarrollo de un conocimiento más profundo de las relaciones entre microestructuras, composición, síntesis y procesamiento.

El término composición indica la constitución química de un material. El término estructura significa una descripción del arreglo atómico, visto con distintos grados de detalle. El término síntesis indica la manera de fabricar los materiales a partir de elementos naturales o hechos por el hombre. Por último, el término procesamiento indica el modo en que se conforman los materiales en componentes útiles y para causar cambios en las propiedades

de distintos materiales [9].

Con ello, en la ciencia de materiales se subrayan las relaciones subyacentes entre la síntesis y el procesamiento, la estructura y las propiedades de los materiales. En la ingeniería de materiales el enfoque es hacia cómo convertir o transformar los materiales en dispositivos o estructuras útiles.

Es importante recalcar que los cambios en las propiedades del material se deben a un cambio en su estructura interna (microestructura). Si se puede comprender lo que cambió microscópicamente, se comenzará a descubrir formas para controlar las propiedades del material.

1.1.2.1. Propiedades Mecánicas de los Materiales

Es indispensable conocer algunos conceptos mecánicos de los materiales, comenzando por el esfuerzo. El término esfuerzo indica una carga o una fuerza por unidad de área. Por otra parte, la deformación unitaria se refiere al alargamiento o a un cambio de dimensión, dividido entre la dimensión original. La aplicación del esfuerzo causa la deformación unitaria. Si esa deformación unitaria desaparece después de haber quitado la carga o el esfuerzo aplicado, se dice que la deformación es elástica. Si la deformación unitaria permanece después de eliminar el esfuerzo, se dice que la deformación unitaria es plástica. Cuando la deformación es elástica y el esfuerzo y la deformación guardan una relación lineal, la pendiente del diagrama esfuerzo – deformación unitaria se le llama módulo de elasticidad o módulo de Young. Al valor de esfuerzo necesario para iniciar la deformación plástica se le llama resistencia de cedencia. La deformación porcentual máxima que se puede alcanzar es una medida de la ductibilidad, por ejemplo, de un material metálico [9].

1.1.2.2. Clasificación General de los Materiales

Los materiales se pueden clasificar en 5 grupos:

- Metales y Aleaciones: Incluyen aceros, aluminio, magnesio, zinc, hierro colado, titanio, cobre y níquel. En general, los metales tienen buena conductividad eléctrica y térmica. Los metales y las aleaciones tienen una resistencia relativamente alta, gran rigidez, ductilidad o formabilidad y buena resistencia a los choques térmicos. Tienen utilidad especial en aplicaciones estructurales o bajo cargas dinámicas. Aunque a veces

se usan metales puros, las mezclas de metales llamadas aleaciones permiten mejorar determinadas propiedades o mejores combinaciones de propiedades.

- Cerámicos, vidrios y vitrocerámicos: Los cerámicos se pueden definir como materiales cristalinos inorgánicos. Es posible que sean los materiales más “naturales”. La arena de la playa y las rocas son ejemplo de cerámicos naturales. Los cerámicos avanzados son materiales obtenidos refinando cerámicos naturales y con otros procesos especiales. Se usan en sustratos que albergan chips de computadora, sensores, actuadores, inductores, aislantes eléctricos, etc. Algunos cerámicos se usan como recubrimientos para proteger sustratos metálicos. También se usan en pinturas, plásticos, neumáticos, losetas para transbordadores espaciales, en sensores de oxígeno, etc. En general, debido a la presencia de porosidad (pequeños agujeros), no conducen bien el calor y deben calentarse a temperaturas muy altas para que se fundan. Los cerámicos tienen una resistencia excepcional a la compresión.
- Polímeros (plásticos): Los polímeros son materiales orgánicos comunes. Se producen con un proceso llamado polimerización. Entre los materiales poliméricos están el caucho (elastómeros) y muchas clases de adhesivos. Muchos polímeros tienen una resistividad eléctrica elevada. También pueden proporcionar un buen aislamiento térmico. Aunque tienen menos resistencia, tienen una relación de resistencia al peso alta. Normalmente no son adecuados para usos a altas temperaturas.
- Semiconductores: Los semiconductores base silicio, germanio y arseniuro de galio son parte de una clase más amplia, la de los materiales electrónicos. La conductividad eléctrica de los materiales semiconductores es intermedia entre la de los aisladores cerámicos y los conductores metálicos. Se usan para la construcción de transistores, diodos, circuitos integrados, MEMS, etc.
- Materiales compuestos: La idea principal del desarrollo de materiales compuestos es combinar las propiedades de materiales distintos. Se forman a partir de dos o más materiales y se obtienen propiedades que no posee un solo material. El concreto, la madera terciada, los plásticos reforzados con fibras de vidrios son ejemplos de materiales compuestos.

1.1.2.3. Clasificación de los Materiales de acuerdo al Orden Atómico.

Los materiales también se pueden clasificar de acuerdo a su arreglo atómico o iónico, así cuatro tipos de arreglos han sido propuestos:

- Sin orden: en los gases monoatómicos como el argón (Ar) o el plasma que se forma en un tubo de luz fluorescente, los átomos o los iones no tienen arreglo ordenado. Estos materiales llenan todo el espacio disponible que tienen (ver Fig. 1.2 A).
- Orden de corto alcance (SRO): un material tiene orden de corto alcance (SRO, short-range order) si el arreglo espacial de los átomos sólo se extiende a su vecindad inmediata. Por ejemplo, en las moléculas del agua en estado líquido el orden es de corto alcance, primeramente debido a los enlaces covalentes entre los átomos de hidrógeno y oxígeno, así como los puentes de hidrógeno que se forman debido a la naturaleza dipolar de las moléculas de agua. Sin embargo, las moléculas de agua no tienen un arreglo especial con respecto a sus posiciones mutuas. En la Fig. 1.2 B) se puede ver la distribución.
- Orden de largo alcance (LRO): la mayoría de los metales y aleaciones, los semiconductores, los cerámicos y algunos polímeros tienen una estructura cristalina donde los átomos o iones muestran orden de largo alcance (LRO, long-range order) como en la Fig. 1.2 C) y D); el arreglo atómico especial abarca escalas de longitud mucho mayores $\sim > 100nm$. Los átomos o los iones en esos materiales forman un patrón regular repetitivo, semejante a una red en tres dimensiones. A esos materiales se les llama materiales cristalinos. Si un material cristalino está formado por un solo cristal grande, se le llama material monocristalino o monocristal. Un ejemplo de monocristal es el silicio. Por otra parte, un material policristalino está formado por muchos cristales pequeños con diversas orientaciones en el espacio. Estos cristales más pequeños se llaman granos. Los bordes entre los cristales diminutos, donde los cristales están desalineados entre sí, se llaman límites de grano.
- Cristales líquidos: son materiales poliméricos que tienen un orden especial. En cierto estado los polímeros de cristal líquido se comportan como materiales amorfos (semejantes a líquidos). Sin embargo, cuando

se les aplica un estímulo externo (como un campo eléctrico o un cambio de temperatura) algunas moléculas de polímero se alinean y forman pequeñas regiones que son cristalinas; de ahí el nombre de “cristales líquidos”. Estos materiales tienen muchas aplicaciones en la tecnología de pantallas de cristal líquido (LCD).

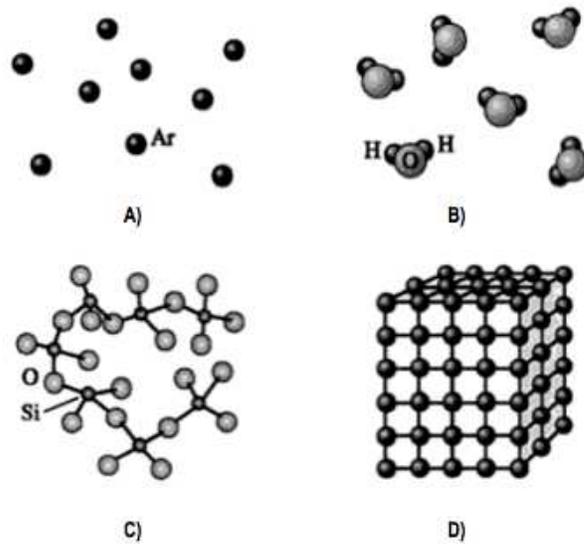


Figura 1.2: Niveles de ordenamiento atómico en los materiales: A) Sin orden. B) y C) Orden de corto alcance. D) Ordenamiento regular que se extiende a través del material [9].

Con base en los arreglo atómicos se pueden clasificar los materiales de la siguiente manera:

- Gases monoatómicos. Sin orden, ej. argón gaseoso.
- Materiales amorfos. Sin orden de largo alcance. Solo orden de corto alcance. Ej. Si amorfo, vidrios, plásticos.
- Cristales líquidos. Orden de corto alcance y de largo alcance en pequeños volúmenes. Ej. polímeros en pantallas de cristal líquido.
- Materiales cristalinos. Orden de corto y de largo alcances.
 - o Monocristal. Ej. Si, GaAs.

o Policristalinos. Ej. metales, aleaciones y la mayoría de las cerámicas.

1.1.2.4. Silicio y Polisilicio

El silicio es un material base para la fabricación de microcircuitos y MEMS por ello es importante conocer sus características fisicoquímicas, así el silicio es un compuesto químico que tiene la facultad de formar arreglos poliméricos con una estructura normalmente en forma cúbica, tiene un número atómico 14 y situado en el grupo 4 de la tabla periódica de los elementos formando parte de la familia de los carbonoides. Es el segundo elemento más abundante en la corteza terrestre (27,7% en peso) después del oxígeno. Está construido de dos caras cúbicas centradas compenetradas de enrejados de átomos. Las obleas de cristal de silicio están clasificadas por su orientación relativa de su superficie a los ejes cristalinicos. En la Fig. 1.3 se ilustran distintas nomenclaturas, basadas en los índices de Miller [10].

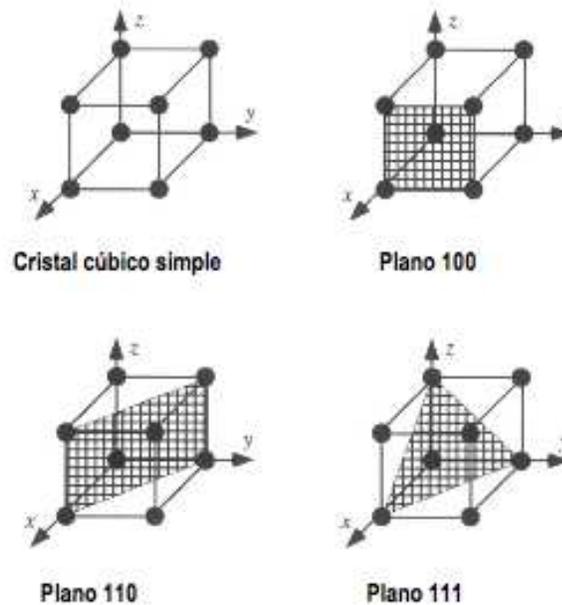


Figura 1.3: Distintos planos de cristal para una simple red cúbica de átomos [1].

Las obleas con una orientación en el plano 100 son las utilizadas convencio-

nalmente en las tecnologías MOS ya que facilita la conjunción entre el Silicio y el dióxido de Silicio. Históricamente, tecnologías para transistores bipolares han usado obleas con orientación 111, aunque últimamente han usado obleas 100. Para aplicaciones de grabado selectivo las obleas con planos cristalinos en 110 son usadas frecuentemente.

Así el silicio con diferentes planos cristalinos posee diferentes propiedades mecánicas; el Cuadro 1.1 muestra las distintas orientaciones o configuraciones del silicio con su correspondiente módulo de Young y coeficiente de Poisson.

Cuadro 1.1: Módulo de Young y coeficiente de Poisson de distintas configuraciones del Silicio [11]

Orientación de la Oblea	Dirección	Módulo de Young	Dirección	Coficiente de Poisson
100	<011>	168.9 GPa ²	<011> <0-11>	0.064
100	<001>	130.2 Gpa	<010> <001>	0.279
110	<111>	187.5 Gpa	<1-11> <1-1-2>	0.182
110	<100>	130.2 Gpa	<001> <1-10>	0.279
111	-	168.9 Gpa	-	0.262

El Cuadro 1.2 resume las características físicas del Silicio.

Cuadro 1.2: Características físicas del Silicio [12].

Propiedad	Valor
Densidad a 25°C	2.329 x 10 ³ kg/m ³
Coficiente de expansión térmica a 300K	2.616 x 10 ⁻⁶ /K
Calor específico	700 J/(K·kg)
Conductividad térmica	1.48 W/(K·m)
Conductividad eléctrica	4.35 x 10 ⁻⁴ S/m
Difusividad térmica	0.86 cm ² /s

Por otra parte, el silicio policristalino o conocido comúnmente polisilicio es un material compuesto por pequeños cristales de silicio. Su principal venta-

ja es su facilidad para ser depositado sobre diversos sustratos, siendo muy compatible con la tecnología CMOS. Tiene un módulo de Young inferior al del Silicio y depende de la técnica de crecimiento del silicio utilizada, del dopaje de la muestra, de las características de la estructura y en ocasiones del método utilizado para calcularlo [13] [14].

En el Cuadro 1.3 se muestra algunas propiedades mecánicas del polisilicio. La tensión interna σ del polisilicio ha sido ampliamente investigada en relación con el proceso de desarrollo de dispositivos LSI³ [15]. Tanto el polisilicio como el silicio amorfo se sintetizan por deposición de vaporización química (LPCVD) utilizando la descomposición térmica del silano (SiH_4) en estado gaseoso, poseen un gran esfuerzo de compresión de -300 a -400 MPa. Este esfuerzo de compresión se debe a los granos desordenados y el contenido de oxígeno [16], que no está relacionado con el estrés térmico debido a que el coeficiente de expansión térmica del poli-Si es el mismo que la del sustrato de silicio. Este esfuerzo de compresión no es deseable en aplicaciones de MEMS, ya que induce la deformación de las estructuras. Esto se puede disminuir con una temperatura alta de templado, por encima de 1050 °C tanto en el horno [17] y mediante un proceso térmico rápido, [18] debido a la tensión de relajación.

³Del inglés Large Scale Integration o Integración de Escala Larga

Cuadro 1.3: Propiedades mecánicas del polisilicio [19].

Deposición	t (μm)	Método	E(GPa)	ν	σ_0 (Mpa)	Gradiente de Tensión (MPa/ μm)	σ_f (GPa)	m	ε_f	K_{IC} MP $\sqrt{\text{m}}$
LPCVD (MuMPs)	3.5	De tensión	170 \pm 7	0.23			1.21 \pm 0.16			
MuMPs 13	3.5	De tensión								1.4 \pm 0.65
MuMPs 19, 21	1.5	De tensión	153 \pm 8 153 \pm 20 146 \pm 10							1.45 \pm 0.19
LPCVD 620°C. Tamaño del grano (50,100, 500 nm)	1.0	De tensión	176 \pm 25 164 \pm 25 164 \pm 25 164 \pm 25				2.86 \pm 0.28 2.69 \pm 0.30 3.37 \pm 0.29			
450 nm LPCVD +11.5 μm Epi, pulido, POC13 dopado	10.5	De tensión	167 \pm 4 164 \pm 6 167 \pm 5 160 \pm 4		-10 -25 -115 -46	+0.9 -0.9 -9.9 +2.8	1.25 1.19 1.08 1.08	10.6 11.7 6.1 11.5		
LPCVD 580°C P+ dopado recocido 950°C	2	De tensión					0.698	11		
Epi In situ PH ₃ dopado	10	De tensión					1.07	7		
LPCVD 520°C (Si ₂ H ₆) Recocido 1000°C	1.8	De tensión	163		76		2.0-2.8 \pm 0.4-0.6	6.3		
LPCVD 520°C (Si ₂ H ₆) Recocido 1000°C POC13 1000°C	2.4	De tensión	167		-7.0		2.0-2.5 \pm 0.2-0.4	10.0		
Estandar	4	De tensión (térmico)					3.1 \pm 0.4			
LPCVD 630°C	0.2	Abultado	160		-240					
LPCVD 630°C N ₂ recocido 1100°C	0.2	Abultado	194		-68					
LPCVD 630°C Recocido 1000°C	4	Abultado	41		189				0.10 %	
LPCVD 580°C Recocido 1100°C No dopado, boro dopado	5.2	Flexión			19 -32		5.0 4.2			3.5 (R=1.0 μm)
LPCVD 580°C Recocido 1100°C No dopado No dopado	5.2	Flexión (resonante)			19*		3.3			
LPCVD 580°C Recocido 1000°C	3.5	Flexión			12 \pm 5					1.1 (crack)
LPCVD como depósito 1000°C recocido	1.27	Pandeo							1.72 % 0.93 %	

1.2. Planteamiento del Problema

La presencia de microorganismos en los alimentos es natural y ocurre inevitablemente. La contaminación de alimentos es un problema de salud a nivel mundial y además genera problemas en la comercialización de los alimentos y materiales biológicos.

La contaminación de alimentos puede ocurrir a través del aire, agua o suelo; estos contaminantes pueden ser de origen químico o biológico. Los de origen químico pueden ser metales pesados, pesticidas, medicamentos para animales, y otros compuestos agroquímicos, este tipo de contaminantes está asociado a los procedimientos agroindustriales para la producción de alimentos. Por otro lado, los alimentos se pueden contaminar biológicamente con microorganismos (bacterias, hongos, protozoarios, virus, etc.), toxinas (micotoxinas, biotoxinas marinas, etc.) y otros compuestos orgánicos. De acuerdo a las legislaciones de otros países, los alimentos no deben contener microorganismos, toxinas o metabolitos en cantidades que presenten un riesgo para la salud de los humanos.[20].

Los riesgos para la inocuidad alimentaria incluyen la existencia de microorganismos patógenos que se encuentran naturalmente en el ambiente y que pueden contaminar los alimentos por un manejo inapropiado (*Listeria*, *Salmonella* y *E. coli*), los cuales pueden ocasionar enfermedades al consumidor [21]. Se entiende por inocuidad alimentaria a la implementación de medidas que reducen los riesgos a la salud de los consumidores, estos riesgos pueden ser de origen biológico o químico; asimismo, la inocuidad alimentaria se enfoca a garantizar que la salud de los consumidores no se ponga en riesgo por el consumo de alimentos.

Existen varios microorganismos patógenos que contaminan alimentos y causan enfermedades en los humanos, los más comunes son los siguientes: *Campylobacter*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* [22]. Por ejemplo, la *Salmonella spp* se encuentra regularmente en alimentos como huevos cocidos, aves, carne, leche cruda, productos lácteos, mariscos, chocolate, especias y ensaladas; la dosis infecciosa⁴ es de entre 15 – 20 microorganismos, con un periodo de incubación⁵ de 12 – 24 horas, la enfermedad que genera

⁴Dosis infecciosa: cantidad que debe ser consumida para dar lugar a síntomas de enfermedades transmitidas por los alimentos.

⁵Periodo de incubación: tiempo entre el consumo de un alimento contaminado y la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad.

conocida como Salmonellosis.

1.3. Justificación

La Organización Mundial de la Salud define “enfermedades causadas por alimentos” como un padecimiento generalmente infeccioso o tóxico, causado por agentes que entran al cuerpo a través de la ingesta de alimentos. Debido a la incidencia global de padecimientos causados por alimentos, se ha reportado para el año 2005, 1.8 millones de personas muertas por enfermedades diarreicas y un gran número de estos casos se puede atribuir a alimentos y agua contaminada.

De acuerdo a la agenda estadística de la Secretaria de Salud del Distrito Federal del 2008, reporta para 2007 que las enfermedades infecciosas intestinales son una de las principales causas de enfermedad y mortalidad para la entidad, con 394,347 casos registrados, 2,695 egresos hospitalarios y un total de 266 defunciones (154 mujeres y 112 hombres) y es la quinta causa de mortalidad infantil y preescolar (44 y 18 defunciones respectivamente).

A nivel nacional, consultar la Fig. 1.4, es la primera causa de mortalidad en edad preescolar (1 a 4 años) con 460 defunciones. Es la cuarta en niños y niñas menores de un año con 725 defunciones y la onceava causa en edad escolar (5 a 14 años) con 101 defunciones. Estas enfermedades están asociadas al consumo de alimentos y agua contaminada por microorganismos patógenos, principalmente *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, entre otros.

Las enfermedades infecciosas intestinales son un problema importante de salud pública para el país. Además de los casos de defunciones, estas enfermedades son altamente contagiosas y requieren un control sanitario estricto, lo que representa gastos médicos y hospitalarios elevados para su tratamiento, así como pérdidas económicas por ausentismo laboral.



Figura 1.4: Gráfica de defunciones por enfermedades intestinales a nivel nacional en menores de 15 años.

Existen diversas metodologías y programas para afrontar la contaminación de alimentos tales como buenas prácticas de agricultura, buenas prácticas de manufactura y análisis de riesgos y control de puntos críticos (APPCC⁶) las cuales pueden reducir significativamente el número de microorganismos patógenos en alimentos; sin embargo, la tecnología para detectar estos microorganismos es vital ya que es la clave para prevenir e identificar problemas relacionados con salud y bioseguridad [23] [24] [25].

Los métodos más recurridos para la detección de microorganismos son: cuenta en placa, métodos basados en inmunología y de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), estos métodos son accesibles económicamente, proporcionan información cualitativa y cuantitativa; sin embargo, son restringidos debido al tiempo de ensayo, ya que necesitan de 24 a 72 hrs. para la detección, y no son tan sensibles como para detectar microorganismos patógenos que generalmente se encuentran en bajas concentraciones en alimentos [20].

Debido a ésto, se han hecho diversas investigaciones acerca de nuevos métodos para la detección de microorganismos. Una de ellas es con micro cantilivers, que son instrumentos que tienen la habilidad de detectar señales extremadamente pequeñas de fuerza y estrés [2], teniendo como resultado detecciones de cambio de masa alrededor de los 10 picogramos.

⁶En inglés HACCP, Hazard analysis and critical control points.

1.4. Hipótesis

Es posible construir un biosensor basado en MEMS usando estructuras cantilivers o voladizos.

El funcionamiento del cantiliver será en modo dinámico; es decir, una estructura resonante, ya que ofrece una mejor resolución en la detección de cambios de masa. Para ello se tiene como referencia principal la microbalanza de cuarzo. Con ello se garantiza una relación proporcional del cambio de la frecuencia con el cambio de masa del cultivo de microorganismos patógenos que se vayan a evaluar.

Para sustentar esta hipótesis y comprobarla se plantea un modelo matemático basado en vigas y la simulación mediante el software COMSOL Multiphysics, empleándose para el tratamiento numérico el método de elemento finito. Además de referencias a trabajos[26] que utilizan dicho método para la detección de pequeños cambios de masa.

1.5. Objetivos

Con base en lo expuesto en el Planteamiento del Problema, la Justificación y la Hipótesis, se propone en este trabajo de investigación, el siguiente objetivo:

1.5.1. Objetivo General

Diseñar y simular un biosensor basado en cantilivers en modo de resonancia para la detección de microorganismos patógenos en alimentos.

1.5.2. Objetivos Específicos

- Generar el estado del arte que sustente el presente trabajo.
- Diseñar un biosensor mediante el uso de herramientas CAD.
- Caracterizar la resolución del biosensor mediante herramientas de simulación y modelado.

1.6. Alcance

En este trabajo se parte de que el funcionamiento del cantiliver es en modo dinámico; es decir, una estructura resonante, este modo de operación ofrece una mejor resolución en la detección de cambios de masa. En esta tesis se presenta el diseño de diferentes configuraciones de cantilivers, la simulación de la frecuencia y el desplazamiento de las vigas en los diferentes modos diseñados, y la validación del modelo con datos provenientes de cantilivers comerciales operados en un microscopio de fuerza atómica [26] e información de artículos y referencias del área. Para ello se utilizó el modelo matemático de la viga de Euler-Bernoulli y el software de simulación COMSOL Multiphysics. El método de medición principal para la simulación fue el óptico con la posibilidad de usar el método capacitivo.

1.7. Metodología de la Investigación

Para poder diseñar el biosensor se requerirá primeramente de la literatura del estado del arte, la cuál ofrecerá distintas alternativas de diseño y la posibilidad de proponer una nueva solución. También servirá junto con el material de ciencia e ingeniería de materiales, los modelos físicos y matemáticos de masa resorte y vigas para proponer un modelo que sustente el método analítico de diseño.

Por otra parte se usará el software COMSOL Multiphysics para simular el voladizo y poder comprobar los datos obtenidos del modelo matemático, que junto con los resultados publicados en el estado del arte se sustentará el modelo y la caracterización del mismo.

Por último, dicho diseño se podrá comprobar con los resultados obtenidos de cantiliver probados y caracterizados a través del microscopio de fuerza atómica.

1.8. Resumen

Junto con la creación de los micro actuadores, el término de MEMS comienza a usarse. Los sistemas micro se refieren a dispositivos en el intervalo de tamaños de 1×10^{-6} m y contienen elementos y estructuras muy pequeñas que

solo pueden ser observados empleando sistemas de microscopia. En la práctica el concepto es mucho más extenso; ya que un MEMS puede contener dispositivos térmicos, magnéticos, de fluidos y ópticos.

Los cantilivers son MEMS que tienen la habilidad de detectar señales extremadamente pequeñas y son muy buena alternativa para detectar estrés y fuerzas pequeñas. Generalmente son hechos de silicio y polisilicio ya que ofrecen características fisicoquímicas propicias para dispositivos CMOS y elementos mecánicos, específicamente para estructuras usadas para la detección de cambios de masa. Con ello, el cantiliver diseñado es usado como biosensor para la detección de microorganismos patógenos en los alimentos, ya que es necesario conservar la inocuidad alimentaria. Se utilizó el modelo matemático de la viga de Euler-Bernoulli y el software de simulación COMSOL Multiphysics. El método de medición principal para la simulación fue el óptico con la posibilidad de usar el método capacitivo.

Capítulo 2

Biosensores

En este capítulo se define lo que es un sensor y se revisan los métodos de detección de microorganismos convencionales y los basados en MEMS: sensores químicos, biológicos y de masa.

Un sensor es un dispositivo con capacidad de detectar magnitudes físicas o químicas; por ejemplo: temperatura, intensidad luminosa, distancia, aceleración, inclinación, desplazamiento, presión, fuerza, torsión, humedad, pH, etc., y transformarlas en variables eléctricas (resistencia, capacitancia, tensión, corriente, etc.).

La diferencia entre un sensor y un transductor radica en que el sensor está siempre en contacto con la magnitud física o química a medir, con lo que puede decirse también que es un dispositivo que aprovecha una de sus propiedades con el fin de adaptar la señal que mide para que la pueda interpretar otro dispositivo.

Hay varios tipos de sensores: químicos, biológicos, de masa, de presión, de velocidad, de aceleración, de temperatura, de proximidad, etc.

2.1. Detección de Microorganismos

2.1.1. Métodos Convencionales

Los métodos convencionales para la detección e identificación de agentes patógenos microbianos se basan principalmente en técnicas microbiológicas y bioquímicas. Estos métodos se clasifican principalmente en: cultivo y conteo

por colonias, inmunológicos que implican interacciones antígeno-anticuerpo y los basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que consiste en el análisis de ADN. Si bien estos métodos pueden ser sensibles, de bajo costo y dan información tanto cualitativa como cuantitativa de la muestra de microorganismos, están en gran medida limitados por el tiempo de ensayo, también es necesario tener muestras enriquecidas inicialmente con el fin de detectar los microorganismos patógenos o sus metabolitos que normalmente se producen en pequeñas cantidades en los alimentos.

De los tres métodos, los de cultivo y conteo por colonias siguen siendo las técnicas más usadas para la detección de patógenos en los alimentos, debido a la sencillez de estos métodos y a su uso extensivo en el control sanitario de los alimentos. Sin embargo, el principal inconveniente es el tiempo que se requiere para realizar las pruebas; ya que toma de 2-3 días para obtener resultados iniciales, y de 7-10 días para una confirmación. Esto es un inconveniente obvio en muchas aplicaciones industriales, especialmente en el sector alimentos.



Figura 2.1: Diferentes métodos convencionales empleados para la detección de micro organismos patógenos.

A pesar de sus desventajas, los métodos de cultivo convencionales siguen representando un campo fértil de investigación y desarrollo. Estos métodos se combinan a menudo con otros métodos de detección de patógenos como un ADN automatizado o semiautomatizado, anticuerpo o bioquímicos para obtener resultados más sólidos. Por ejemplo: cultivo y los basados en PCR para la *Salmonella enteritidis* [27].

También, a través de los métodos basados en detección inmunológica con anticuerpos se ha detectado *Salmonella* [28]. Tal vez estos métodos son la única tecnología que ha sido empleada con éxito para la detección de células bacterianas, esporas, virus y toxinas por igual [29] y es ampliamente utilizada para la determinación de microorganismos patógenos. Sin embargo, una de las desventajas es que a fin de garantizar la detección fiable de patógenos en

los alimentos utilizando métodos basados en anticuerpos, se debe tomar en cuenta la influencia del estrés sobre las reacciones de anticuerpos y entender como las actividades fisiológicas de las células a menudo se alteran en respuesta a un estrés. Otra desventaja, es que a pesar de que el tiempo de respuesta es muy inferior en comparación con las técnicas de cultivo tradicionales, todavía se carece de la capacidad de detección de microorganismos en “tiempo real”. No obstante, si las cantidades de los agentes patógenos son suficientemente altas los inmuno-análisis pueden proporcionar información en tiempo real. Pero se corre el riesgo de que haya una baja sensibilidad en las pruebas, una baja afinidad de los anticuerpos para el analito que interesa o la posible interferencia de contaminantes [30].

Por último, pero no menos importante, los métodos de PCR pueden detectar una sola copia de una secuencia de ADN y por lo tanto, pueden ser utilizados para localizar una sola bacteria patógena en los alimentos. El método de PCR tienen claras ventajas sobre otras técnicas para la detección de patógenos microbianos, por ejemplo: son más específicos, sensibles, rápidos, con precisión y capacidad de detectar pequeñas cantidades de ácido nucleico en una muestra [31]. Recientemente se informó que un ensayo de PCR resultó ser el más sensible en la detección de *Salmonella* en los alimentos marinos en comparación con la de cultivo y los métodos de ELISA [32]. Sin embargo, a pesar de sus ventajas son métodos caros y complicados; ya que requieren de personal especializado para poder llevarlos a cabo.

2.1.2. Métodos Basados en MEMS

2.1.2.1. Sensores Químicos

En 1924, Palmer estudió la coherencia de filamentos finos con libertad de contacto inducidos por ondas electromagnéticas en presencia de distintos gases y la correlación entre las respuestas observadas y el calor de la absorción de gases. Este fue uno de los primeros sensores químicos registrados en la historia [33].

Un sensor químico se define como un transductor físico (transductor de cantidades físicas en señales convenientes de salida) y una capa químicamente selectiva, por lo que señales de salida medibles pueden ser producidas en respuesta a un estímulo químico [33]. En la Fig. 2.2 se ejemplifica la estructura básica de un sensor químico.

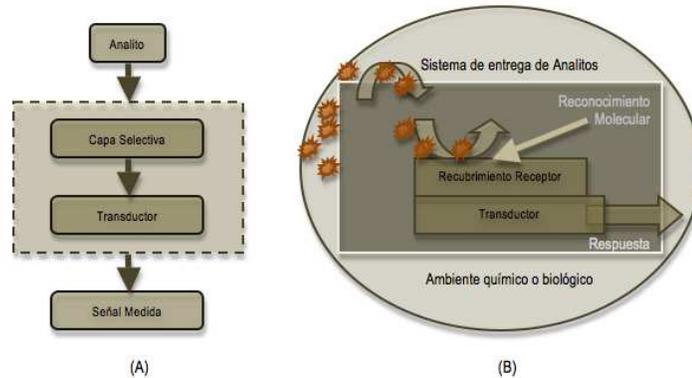


Figura 2.2: (A) Representación esquemática de un sensor químico o biológico con una señal de salida en respuesta de la presencia de una fuente de analitos o compuesto químico de interés. (B) Sensor químico con una capa receptora que provee una respuesta selectiva a moléculas químicas o biológicas [33].

En el diseño de un sensor químico se pueden emplear recubrimientos selectivos a moléculas, esto implica que dichos recubrimientos pueden estar funcionalizados químicamente con compuestos que reconozca o interaccionen con otras moléculas químicas de interés para su detección o monitoreo, como los sensores empleados para la detección de partículas contaminantes en el ambiente o en el agua, por citar algunos ejemplos. Otro aspecto relevante de los sensores son los diferentes modos de transducción, básicamente estos pueden ser [33]:

- Térmico.
- Masa.
- Electroquímico.
- Óptico.

Los sensores químicos han sido utilizados activamente dentro de la familia de los MEMS (sistemas microelectromecánicos), especialmente las estructuras sencillas llamadas microcantilivers que han demostrado ser muy útiles para ser usados como transductores de estímulos físicos, biológicos o químicos en señales medibles.

Los sensores basados en cantilevers involucran mediciones de su deflexión, frecuencia de resonancia y características de amortiguamiento.

2.1.2.2. Sensores Biológicos

Un sensor biológico tiene un principio de operación similar al de un sensor químico, pero en este caso las interacciones específicas se pueden dar entre biomoléculas del dispositivo funcionalizado con las biomoléculas de interés para la detección, así interacciones entre anticuerpo-antígeno, enzima-sustrato (biomolécula), reconocimiento entre cadenas de DNA, inclusive interacciones microorganismo-medio de cultivo o soporte de cultivo pueden darse para llevar a cabo la biodetección del reconocimiento de la biomolécula de interés. Dando como resultado, de estas interacciones, la variación de una o varias propiedades físico-químicas (pH, transferencia de electrones, de calor, cambio de potencial, variaciones de masa, variación de las propiedades ópticas, entre otras) que finalmente detecta el transductor. Este sistema transforma la respuesta del elemento de reconocimiento en una señal eléctrica indicativa de la presencia del analito sometido a estudio o proporcional a su concentración en la muestra o al crecimiento del microorganismo [34]. Por lo tanto, un biosensor se define como un dispositivo de análisis que incorpora un elemento de reconocimiento biológico (ácido nucleico, enzima, anticuerpo, receptor, tejido, célula) asociado a un sistema de transducción que permite procesar la señal producida por la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito [35].

El término biosensor aparece primeramente a finales de los años 70; aunque el primer biosensor fue un analizador de glucosa desarrollado por Clark y Lyons en 1962 [35]. Este biosensor consistía en una enzima glucosa oxidasa acoplada a un electrodo para oxígeno. La enzima oxida la glucosa y como consecuencia se produce un descenso proporcional de la concentración de oxígeno en la muestra, que es detectado por el electrodo.

Los biosensores pueden clasificarse en cuatro maneras distintas de acuerdo al [35]:

- Tipo de interacción que se establece entre el elemento de reconocimiento y el analito.
 - o Biocatalítica.
 - o Bioafinidad.

- Método utilizado para detectar dicha interacción.
 - o Directa.
 - o Indirecta.
- Naturaleza del elemento de reconocimiento.
 - o Enzima.
 - o Orgánelo, tejido o célula completa.
 - o Receptor biológico.
 - o Anticuerpo.
 - o Ácidos nucleicos.
 - o PIM (polímero de impresión molecular), PNA (ácido nucleico peptídico), aptámeros (ácidos nucleicos de cadena sencilla o anticuerpos químicos).
- Sistema de transducción.
 - o Electroquímico.
 - o Óptico.
 - o Piezoeléctrico.
 - o Termométrico.
 - o Nanomecánico.

En la práctica, la elección del material biológico depende de las características del compuesto a analizar y la elección del transductor está condicionada por el tipo de elemento a ser reconocido; ya que éste determina cuál será la variación en las propiedades físico-químicas que ocurra como consecuencia de la interacción [33].

2.1.2.3. Sensores de Masa

Un sensor de masa es un dispositivo capaz de detectar la magnitud de la masa y transformar esta detección en una variable eléctrica: resistencia, capacitancia, tensión, corriente, frecuencia, entre otros.

Actualmente, hay sistemas capaces de detectar variaciones de masa del orden de los picogramos [5] hasta sensibilidades de $0,18 \text{ ag}^1/\text{cm}^2$, en dispositivos

¹atogramos

comerciales, a altas frecuencias (10-15 MHz) [36].

Probablemente el sensor más utilizado con esta función sea la microbalanza de cuarzo (QCM, Quartz Crystal Microbalance o QMB, Quartz microbalance), que alcanza una resolución de masa absoluta de $0,9 \text{ ng}^2/\text{cm}^2$. Las balanzas de cuarzo se utilizan en monitorización de reacciones químicas, en sensores biomédicos, para monitorizar la deposición de metales y en control ambiental. Estos sistemas en ocasiones permiten realizar medidas electroquímicas en líquido, es lo que se conoce como EQCM (electrochemical quartz crystal microbalance).

El funcionamiento de la microbalanza de cuarzo consiste en aplicar un potencial eléctrico externo sobre un disco de cuarzo con dos electrodos de metal (por lo general oro) produciendo una onda acústica que se propaga a través del cristal. Esta onda encuentra un mínimo de impedancia cuando el grosor del sistema es un múltiplo de la mitad de la longitud de onda de la onda acústica. El disco de cristal de cuarzo debe cortarse con una orientación específica respecto a los ejes cristalinos. La deposición de capas delgadas en la superficie del cristal disminuye la frecuencia proporcionalmente a la masa de la capa depositada. Mediante la detección de la variación en frecuencia se puede determinar la masa depositada [37].

Zhang et al. [38] propone un sistema basado en un microoscilador en forma de peine utilizando amplificación de la resonancia paramétrica con resolución de los picogramos en aire. Por otra parte, Ekinci, K. L. [39], presenta un nanopuente resonante con detección magnética que permiten obtener resoluciones en masa absolutas del orden del atogramo. Este puente se encuentra en un campo magnético perpendicular para excitar la resonancia y junto con la corriente alterna que pasa a través de él se genera una fuerza electromotriz, la cual es detectada a través de un analizador de redes y conocer los cambios de masa.

Se han llegado a diseñar dispositivos capaces de detectar 7 zg^3 [4], realizando medidas en ultra alto vacío y a temperatura inferior a 7 K. Otros resultados de sensores basados en membranas piezoeléctricas resonantes para detección bioquímica [40] indican que se pueden alcanzar resoluciones cercanas a los $300 \text{ fg}^4/\text{Hz}$.

²nanogramos

³zeptogramos

⁴femtogramos

2.2. Resumen

Los métodos convencionales para la detección e identificación de agentes patógenos microbianos se basan en técnicas microbiológicas y bioquímicas. Estos métodos se clasifican principalmente en: cultivo y conteo por colonias, inmunológicos que implican interacciones antígeno-anticuerpo y los basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que consiste en el análisis de ADN. Sin embargo, el principal inconveniente es el tiempo que se requiere para realizar las pruebas; ya que toma de 2-3 días para obtener resultados iniciales, y de 7-10 días para una confirmación.

Por otra parte, se encuentran los biosensores como alternativa para la detección de microorganismos. Un biosensor se define como un dispositivo de análisis que incorpora un elemento de reconocimiento biológico (ácido nucleico, enzima, anticuerpo, receptor, tejido, célula) asociado a un sistema de transducción que permite procesar la señal producida por la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito. Y un sensor de masa es un dispositivo capaz de detectar la magnitud de la masa y transformar esta detección en una variable eléctrica: resistencia, capacitancia, tensión, corriente, frecuencia, entre otros.

Actualmente, hay sistemas capaces de detectar variaciones de masa del orden de los picogramos. Trabajos reportan detecciones del orden de los 7 zg, medidas en ultra alto vacío y a temperatura inferior a 7 K y hasta sensibilidades de 0,18 ag/cm².

Capítulo 3

Física de Biosensores Basados en MEMS

Es importante para el diseño del biosensor el análisis de la física de la estructura mecánica. Concretamente la ecuación de la elástica de la viga para el campo de desplazamientos que sufre el eje de la viga desde su forma recta original a la forma curvada o flectada final.

Para diseñar y modelar el biosensor se tomará la ecuación de la viga de Euler - Bernoulli. La cuál es una viga plana de sección transversal rectangular, empotrada en uno de sus extremos. Por otra parte, se tomará como valor de una fuerza el peso de una masa de $0.1\mu g$.

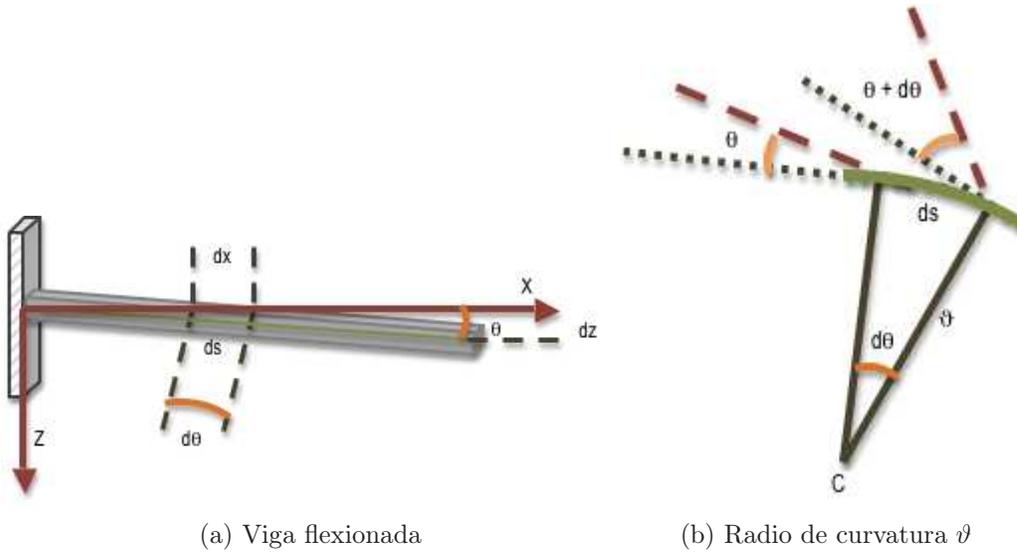
Por otra parte, para el cálculo de la frecuencia natural de la viga sin la masa y con la masa para poder determinar la resolución del cantiliver se usará la solución de la ecuación clásica la viga vibrante.

3.1. Modelo Físico

Una viga o una barra delgada es un sólido homogéneo e isótropo cuya longitud es grande comparada con las dimensiones de su sección trasversal.

Para modelar la viga cantiliver o voladizo se toma para el análisis una barra empotrada con una longitud L , anchura W y espesor H como se muestra en la Fig. 3.1a. Se fijará uno de sus extremos.

Por otra parte, cuando una viga se flexiona debido a las fuerzas exteriores que se aplican, existen algunas partes de la viga que se acortan y hay otras zonas



(a) Viga flexionada

(b) Radio de curvatura ϱ

Figura 3.2: Radio de curvatura de una viga flexionada

En la Fig. 3.2a se observa el triángulo rectángulo de base dx , altura dz e hipotenusa ds , por lo que se establecen las siguientes relaciones:

$$\begin{aligned} \tan \theta &= \frac{dz}{dx} \\ \theta &= \arctan \frac{dz}{dx} \end{aligned} \quad (3.2)$$

$$\begin{aligned} ds &= \sqrt{dx^2 + dz^2} \\ &= \sqrt{1 + \left(\frac{dz}{dx}\right)^2} dx \end{aligned} \quad (3.3)$$

Sustituyendo la Ec. 3.2 y la Ec. 3.3 en la Ec. 3.1 tenemos lo siguiente:

$$\begin{aligned}
 \vartheta &= \frac{\sqrt{1 + \left(\frac{dz}{dx}\right)^2} dx}{d \arctan \frac{dz}{dx}} \\
 &= \frac{\sqrt{1 + \left(\frac{dz}{dx}\right)^2} dx}{\frac{\frac{d^2z}{dx^2} dx}{1 + \left(\frac{dz}{dx}\right)^2}} \\
 &= \frac{\left(1 + \left(\frac{dz}{dx}\right)^2\right)^{3/2}}{\frac{d^2z}{dx^2}} \tag{3.4}
 \end{aligned}$$

Si se consideran las siguientes condiciones:

- Como se definió anteriormente la longitud de la barra L es mucho mayor que las dimensiones de su sección transversal como se muestra en la Fig. 3.3.
- La deformación debida a su propio peso es despreciable.
- La sección de la barra no cambia cuando se dobla.
- Cuando el espesor de la barra es pequeño comparado con el radio de curvatura, la sección transversal cambia muy poco.

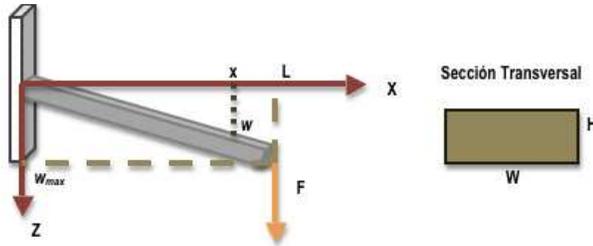


Figura 3.3: Viga cantiliver de sección transversal rectangular

y se aplica una fuerza en el extremo libre de la viga como se ilustra en la Fig. 3.3 es aplicable la ecuación de Euler-Bernoulli que relaciona el momento flector M de la fuerza aplicada y el radio de curvatura de la barra deformada.

$$M = \frac{E \cdot I}{\vartheta} \tag{3.5}$$

3.1.1. Desplazamiento

Sustituyendo la Ec. 3.4 en la Ec. 3.5 se obtiene que:

$$M = E \cdot I \frac{\frac{d^2z}{dx^2}}{\left(1 + \left(\frac{dz}{dx}\right)^2\right)^{3/2}} \quad (3.6)$$

y considerando que para pequeñas pendientes $(dz/dx)^2 \approx 0$ y $dz = dw$, la Ec. 3.6 queda como la Ec. 3.7 que modela la flexión de una viga fija de un extremo con pequeñas deflexiones, como en la Fig.3.3 (de esta manera puede verse un cantiliver) [1].

$$\frac{d^2w}{dx^2} = \frac{M}{EI} \quad (3.7)$$

Donde M es el momento interno de flexión que, en equilibrio, corresponde con las cargas aplicadas externamente. I es el momento de inercia de la sección transversal del voladizo y E es el módulo de Young.

Resolviendo la Ec. 3.7 con las siguientes condiciones iniciales:

$$w(0) = 0 \quad (3.8)$$

$$\left. \frac{dw}{dx} \right|_{x=0} = 0 \quad (3.9)$$

y sustituyendo el momento interno $M = -F(L - x)$ en cualquier posición x dentro de la viga. Obtenemos la ecuación:

$$w = \frac{FL}{2EI} x^2 \left(1 - \frac{x}{3L}\right) \quad (3.10)$$

Donde F es la fuerza aplicada en el extremo final del cantiliver.

Esta ecuación representa el desplazamiento vertical w de la viga al ser flexionada. Si se desea saber cuál es la máxima deflexión al final del cantiliver $x = L$ se sustituye en la Ec. 3.10 y se obtiene lo siguiente:

$$w_{max} = \left(\frac{L^3}{3EI}\right) F \quad (3.11)$$

Sustituyendo en la Ec. 3.11 el momento de inercia $I = (1/12)H^3W$ se obtiene:

$$w_{max} = \left(\frac{4L^3}{EWH^3}\right) F \quad (3.12)$$

3.1.2. Constante de Elasticidad

Si se observa detenidamente la Ec. 3.12, hemos obtenido la ecuación de Hooke; donde k es la constante de elasticidad. Con ello podemos concluir que un cantiliver o voladizo sujeto de uno de sus extremos puede ser modelado a través de un sistema masa - resorte.

El valor de la constante k es el siguiente:

$$k = \frac{3EI}{L^3} (N/m) \quad (3.13)$$

o substituyendo el valor de I

$$k = \frac{EWH^3}{4L^3} (N/m) \quad (3.14)$$

Con base en la Ec. 3.14 podemos afirmar que la deflexión de la viga depende solamente de la geometría de la viga y las propiedades del material usado.

3.2. Frecuencia natural

Tomando en cuenta el modelo masa - resorte y que el comportamiento del cantiliver será en modo dinámico; podemos decir que un sensor resonante, basado en cantilivers, puede ser modelado como un oscilador armónico con una frecuencia de resonancia igual a:

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m_o}} \quad (3.15)$$

Donde m_o es la masa suspendida efectiva del cantiliver. m_o está relacionada con la masa total de la porción suspendida de la viga m_b y la masa m_c concentrada (masa de algún objeto por lo general en el extremo libre) a través de la ecuación $m_o = nm_b + m_c$. Donde n es una constante de la geometría asociada a la sección transversal de un cantiliver rectangular, en este caso n vale 0.24.

Si sustituimos k , m_o y $m_c = 0$ en la Ec. 3.15 obtenemos la ecuación de la frecuencia natural de resonancia, f_o , en ausencia de algún amortiguamiento.

$$f_o = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{\kappa^4 EI}{L^4 \rho A}} \quad (3.16)$$

La constante $\kappa = 1,875$ es un parámetro obtenido de la resolución clásica de la ecuación de movimiento de los distintos modos de oscilación de un cantiliver resonante [41].

La frecuencia también puede ser expresada en términos de las características físicas del material.

$$f_o = \frac{(1,875)^2 H}{2\pi L^2} \sqrt{\frac{E}{12\rho}} \quad (3.17)$$

Tanto la Ec. 3.15, como la Ec. 3.16 y 3.17 son frecuentemente usadas como punto de partida en la estimación de la sensibilidad para mediciones de masa de sensores resonadores basados en cantilivers [42].

3.2.1. Variación en la frecuencia por cambio de masa

La resolución del cantiliver $\delta f/m_c$ se puede medir mediante la siguiente ecuación [42]:

$$\delta f = 0,279 \cdot \sqrt{\frac{EIm_c^2}{L^3m_b^3}} \quad (3.18)$$

donde m_c es la masa efectiva del microorganismo, considerando que esta masa está distribuida de uniformemente sobre la superficie del cantiliver.

La Ec. 3.18 es válida solo para la frecuencia natural f_0 y se puede expresar de la siguiente forma:

$$\delta f = 0,279 \cdot \frac{m_c}{L^3W\rho} \sqrt{\frac{E}{12\rho}} \quad (3.19)$$

Como se puede observar en la Ec. 3.19 el cambio de la frecuencia solo depende de las características físicas del cantiliver, específicamente de E , W y L ; además de la masa del microorganismo.

Por la tanto un cantiliver con los siguientes valores geométricos: $L = 100\mu m$, $W = 5\mu m$ y $H = 1\mu m$ tendrá una constante elástica $K = 0,2N/m$ y una frecuencia fundamental $f_{res} = 0,134MHz$.

Considerando que por ejemplo la masa de un solo microorganismo es, $m_c = 1x10^{-16}kg$ [26], así el cambio en la frecuencia del cantiliver será $\delta f = 40,04Hz$.

Esta masa (m_c) es importante ya que es la del microorganismo que se va a detectar con el cantiliver.

Si se definen las propiedades físicas del cantiliver como:

$$P_c = \sqrt{\frac{EI}{L^3 m_b^3}}$$

y con base en la Ec. 3.18, el cambio de masa δm quedaría definido con la ecuación 3.20.

$$\delta m = \frac{\delta f}{0,279 \cdot P_c} \quad (3.20)$$

Por lo tanto, para un valor de $\delta f = 1Hz$, el valor de $m_c = 2,039x10^{-15}g$. O bien, $0,49Hz/fg$.

La relación $\delta m/\delta f$ sería:

$$\frac{\delta m}{\delta f} = \frac{1}{0,279 \cdot P_c} \quad (3.21)$$

Tanto la Ec. 3.18, Ec. 3.20 y Ec. 3.21 ofrecen una buena aproximación del funcionamiento del cantiliver.

3.3. Resumen

Para diseñar y modelar el biosensor se tomará la ecuación de la viga de Euler - Bernoulli y para el cálculo de la frecuencia natural de la viga y determinar la resolución del cantiliver se usará la solución de la ecuación clásica la viga vibrante.

Una viga o una barra delgada es un sólido homogéneo e isótropo cuya longitud es grande comparada con las dimensiones de su sección transversal.

Se usa el radio de curvatura ϑ para poder obtener la ecuación de la viga de Euler - Bernoulli y obtener el máximo desplazamiento w en el eje y y la constante de elasticidad k . Para este análisis el peso de la viga es despreciable.

Por otra parte, tomando en cuenta el modelo masa - resorte se usa la ecuación de la viga resonante; es decir un sensor resonante, basado en cantilivers, puede ser modelado como un oscilador armónico con una frecuencia de resonancia. Con ello obtenemos la resolución del cantiliver.

Capítulo 4

Últimos Avances en el Diseño y Construcción de MEMS basados en Cantilivers

De acuerdo con la literatura (Referencias) existen métodos que utilizan transductores basados en métodos electroquímicos, ópticos y de masa. Cada uno de estos tres contiene diferentes subclases que pueden ser divididas en métodos “label-based” (con marcaje) y “label-free” (sin marcaje). El mecanismo de transducción “label-based” se basa en la presencia de una molécula o estructura adicionada, este mecanismo se basa en los tintes fluorescentes hechos de moléculas de colorantes orgánicos o sintéticas. Los métodos de desarrollo más recientes consisten en nanopartículas inorgánicas que pueden ser transducidas empleando métodos ópticos, magnéticos, electrónicos, entre otros. Por ejemplo, las nanopartículas de oro son utilizadas en ensayos de hibridación de ADN para detectar una secuencia de ADN con mayor sensibilidad y especificidad en comparación con los ensayos de fluorescencia tradicional. Los puntos cuánticos o “quantum dots” son otro elemento importante en la nanoescala y son aplicables a los biosensores. Los puntos cuánticos pueden excitarse empleando radiación y proporcionan una alta sensibilidad y estabilidad en comparación con fluorescencia [43].

Una de las ventajas de los biosensores de nanoescala, tales como microcantilevers y nanotubos es que son libres de etiqueta o “label-free” [44] [45], que es la segunda subclase de los mecanismos de transducción de biosensores. Por ejemplo, un cantilever puede ser utilizado para detectar la hibridación

de ADN mediante la medición de la variación de la frecuencia de resonancia del cantilever. Este método tiene el potencial de servir como una plataforma para la biodetección de múltiples compuestos [46]. Otro método “label-free” es el uso de nanotubos que registran un cambio de la conductividad cuando un marcador molecular se une a ellos. Así mismo se ha medido la cinética de hibridación de ADN usando un chip de microfluidos integrados con nanotubos recubiertos [47]. Otro método empleando “label-free” es la resonancia plasmónica de superficie (SPR), que mide un cambio en el ángulo de la óptica la reflexión mientras la unión de la superficie se produce. Esta técnica ha sido utilizada para detectar proteínas [48] y puede ser utilizada para detectar los enlaces para moléculas de gran tamaño [49].

4.1. Sensores Electroquímicos

Los métodos basados en la detección electroquímica son otros posibles medios de transducción que se han utilizado para la identificación y cuantificación de patógenos de transmisión alimentaria.

Los sensores electroquímicos se pueden clasificar en amperométricos, potenciométricos, impedimétricos y conductimétricos, basados en los parámetros observados como el potencial y conductancia. Aunque la detección electroquímica tiene varias ventajas como el bajo costo, la capacidad de trabajar con muestras turbias y la miniaturización con facilidad, la sensibilidad y selectividad son ligeramente limitadas en comparación con la detección óptica. En el Cuadro 4.1 se presentan las características de sensores electroquímicos utilizados actualmente.

Cuadro 4.1: Transductores electroquímicos utilizados en la detección de microorganismos patógenos [35] [34]

Sistema de Transducción	Elemento de Reconocimiento	Microorganismo o Analito
Electroquímico	Anticuerpos	<i>S. typhimurium</i> , <i>E. Coli</i> 0157:H7 <i>Campylobacter</i> , <i>S. Aureus</i>
Impedimétrico		<i>Salmonella</i> , <i>Proteus vulgaris</i>
Piezoeléctrico tipo QCM	Anticuerpos, receptores proteína A	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>E. coli</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Yersinia pestis</i> , <i>Proteus</i> , <i>Serratia</i> , <i>Klebsiella</i>
Piezoeléctrico tipo SAW	Anticuerpos	<i>E. coli</i> , <i>Legionella</i> , <i>Salmonella</i>
Amperométrico	Oxalato oxidasa Biocatalítica	Oxalato
Amperométrico Potenciométrico	β -glucosidasa Biocatalítica	Amigdalina
Potenciométrico	Colinesterasas Biocatalítica	Glucoalcaloides

4.2. Sensores Basados en Detección Óptica

Por otra parte, se encuentran los biosensores ópticos que han sido de gran interés para la detección de bacterias patógenas debido a su sensibilidad y selectividad. La detección basada en métodos ópticos tiene subclases basadas en la absorción, refracción, dispersión, infrarrojo, Raman, quimioluminiscencia, fluorescencia y fosforescencia. Las técnicas más empleadas comúnmente en la detección óptica son la resonancia plasmónica de superficie y fluorescencia debido a su sensibilidad. Las técnicas ópticas utilizando fibra óptica, láser, prisma y guías de onda también se emplean para la detección de patógenos.

A continuación se muestra en el Cuadro 4.2 distintos biosensores desarrollados para detectar microorganismos patógenos en alimentos. Estos son principalmente de tipo inmunológico combinados con transductores piezoeléctricos, ópticos, bioluminiscentes o de impedancia, que permiten una detección directa sin marcaje de la interacción antígeno-anticuerpo [34] [50].

Cuadro 4.2: Transductores ópticos utilizados en la detección de microorganismos patógenos [34] [51] [52] [53] [54].

Sistema de Transducción	Elemento de Reconocimiento	Microorganismo
Sensor Potenciométrico de Direccionamiento de Luz(LAPS)	Anticuerpos	<i>S. typhimurium</i> , <i>E. Coli</i> 0157:H7 <i>B. subtilis</i> , <i>Y. Pestis</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Brucella melitensis</i>
Nanoelectromecánico	Anticuerpos	<i>E. coli</i> 0157:H7
Resonador Superficial de Plasmones (SPR)	Anticuerpos	<i>E. coli</i> 0157:H7, <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Listerio monocytogenes</i> , <i>B. Subtilis</i>
Resonancia de espejos	Anticuerpos	<i>S. aureus</i>
Bioluminiscencia		<i>Mycobacterium avium</i> , <i>M. Paratuberculosis</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i>
Inmunoensayos Fluorescentes (FIA)	Anticuerpos	<i>S. typhimurium</i> , <i>Yersinia</i> , <i>V cholerae</i> , <i>E. coli</i>
Interferometría óptica	Anticuerpos	<i>Salmonella typhimurium</i>
Fibra óptica	Anticuerpos	<i>E. coli</i> 0157:H7, <i>S. aureus</i>

4.3. Sensores Basados en Detección de Cambios de Masa

Los sensores sensibles a cambios de masa son adecuados para detecciones muy finas, donde la transducción se basa en los pequeños cambios en la masa. El principal medio de análisis de masa depende del uso de cristales piezoeléctricos que pueden hacer vibrar a una frecuencia específica con la aplicación de una señal eléctrica de una frecuencia específica. La frecuencia de oscilación depende de la frecuencia eléctrica aplicada al cristal, así como la masa del cristal. Por lo tanto, cuando la masa aumenta debido a la unión de los compuestos químicos o biológicos, la frecuencia de oscilación del cristal cambia y el cambio resultante puede ser medido eléctricamente y pueden ser utilizados

4.3. SENSORES BASADOS EN DETECCIÓN DE CAMBIOS DE MASA 53

para determinar la masa adicional del cristal. El cuarzo es utilizado como un material piezoeléctrico común. Los dos principales tipos de sensores basados en masa son: microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) y superficie de onda acústica (SAW). Cuando la superficie del sensor piezoeléctrico, que ha sido recubierta con un anticuerpo, se coloca en una solución con los patógenos, la unión del agente con la superficie cubierta con anticuerpos da como resultado un aumento de la masa de cristal, y esto da lugar a un incremento de frecuencia. La detección basada en incremento de masa es relativamente fácil de usar, rentable y emplea el análisis “label-free” que incrementa la sensibilidad y especificidad.

Vaughan, et al., [55] reportaron la detección de *L. monocytogenes* con inmunosensores QCM con un límite de detección de 1×10^7 UFM/mL. También se ha reportado la detección rápida (80 s) de *S. typhimurium* y *E. coli* O157:H7 con biosensores de superficie de onda acústica (SAW) [56]. Nanduri, et al. [57] desarrollaron un biosensor basado en los fagos inmovilizados por adsorción física en la superficie de un QCM para la detección de β -galactosidasa de *E. coli*.

En la tabla 4.3 se muestran varios sensores de masa reportados con su sensibilidad máxima y mínima masa reportada. Nótese que algunos precisan microscopios de fuerza atómica (AFM), electrónico de barrido (SEM) y electrónico de transmisión (TEM).

Cuadro 4.3: Características de los distintos sensores de masa.

Dispositivo	Características	Condiciones	Excitación / Detección	Sensibilidad Máxima	Mínima Masa Reportada	Referencia
Materiales Piezoeléctricos	Microbalanza de Cuarzo	Condiciones Ambiente	Electrostática / Eléctrica	0.18 ng / cm ²	0.9 ng / cm ²	[36]
	Membranas Resonantes	Condiciones Ambiente	Electrostática / Eléctrica	0.27 pg / Hz		[40]
Cantilevers Resonantes	Precisa AFM	Condiciones Ambiente	Mecánica / Óptica	37 fg / Hz	10 pg	[58]
	Precisa láser	P = 10 ⁻⁷ Pa, T constante	Electrostática / Óptica	5 ag		[5]
	Precisa láser	Condiciones Ambiente	Fototérmica / Óptica	5.7 x 10 ⁻¹⁶ g	5.5 fg	[59]
Nanotubos Resonantes	Precisa SEM	P ~ 10 ⁻⁵ Pa, T, sin espec.	Piezoeléctrica / SEM	100 zg	150 ag	[60]
	Precisa un TEM	P: Vacío, T, sin especificar	Electrostática / Eléctrica		22 fg	[61]
Puentes Resonantes	Precisa un criostato	Ultra Alto Vacío, T ~ 17 K	Electromagnética / Eléctrica	0.4 ag / Hz	2.5 ag	[39]
	Precisa un criostato	Ultra Alto Vacío, T ~ 10 K	Electromagnética / Eléctrica	1 zg / Hz	7 zg	[4]

4.4. Cantilivers en Modo Dinámico

Los cantilivers o voladizos, como se ha mencionado anteriormente, son instrumentos que tienen la habilidad de detectar señales extremadamente pequeñas, es por ello que los cantilivers son muy buena alternativa para detectar estrés y fuerzas pequeñas [2]. Los voladizos pueden ser usados como detectores porque tienen la capacidad de vibrar a diferentes frecuencias cuando algunos contaminantes se adhieren a su superficie, revelando la presencia de sustancias dañinas. Asimismo, cuando los cantilivers son cubiertos con anticuerpos pueden detectar algunos virus que sean atraídos por diferentes densidades o por cantidad de anticuerpos por área, dependiendo del tamaño del cantiliver [62].

En el Cuadro 4.4 se resumen algunos trabajos de detección de microorganismos patógenos basados en cantilevers.

Cuadro 4.4: Trabajos basados en cantilivers para la detección de microorganismos patógenos

Microorganismos Patógenos	Mecanismo de Transducción	Límite de la Detección	Disposición (Matriz)	Referencia
<i>E. coli</i> 0157:H7	Cantiliver resonante	10 UFC/mL	Búfer en presencia de de cepa salvaje E coli	[63]
<i>E. coli</i> 0157:H7	Cantiliver resonante	1 célula	Búfer, seco y medido	[64] [42]
<i>E. coli</i> 0157:H7	Cantiliver resonante	1 UFC/mL	Búfer; flujo	[65]
<i>E. coli</i> 0157:H7	Cantiliver flexionado	10 ⁶ UFC/mL	Búfer	[66]
<i>Bacillus anthracis</i> (Cepa Sterne)	Cantiliver resonante	300 esporas/mL	Búfer, y en presencia de 10 ⁹ <i>Bacillus thuringiensis</i> esporas/mL	[67] [68]
<i>Bacillus anthracis</i> (Cepa Sterne)	Cantiliver resonante Cantiliver resonante	50 esporas 50 esporas	Dispensadas sobre el sensor en búfer	[69]
<i>Salmonella typhimurium</i>	Cantiliver flexionado	5000 UFC/mL	Búfer	[70]
<i>Salmonella typhimurium</i>	Cantiliver flexionado	100,000 UFC/mL	Búfer	[71]
<i>Salmonella enterica</i>	Modo flexión	25 células	Búfer	[72]

4.4.1. Características Físicas Reportadas

En el Cuadro 4.5 se enlistan las características físicas, así como las referencias, de algunos MEMS y NEMS en modo de resonancia basados en detección de masa. También se menciona un micrófono como referencia para una posible medición del cambio de masa a través del método capacitivo; ya que el cantiliver a diseñar será medido por el método óptico con el microscopio de fuerza atómica. No obstante se mencionan aquellos cuya medición es a través de la variación de la capacitancia.

Cuadro 4.5: Características físicas de NEMS y MEMS en modo de resonancia.

Mecanismo	Oscilación	Frecuencia (Hz)	Dimensiones (Largo x Ancho x Grosor μm)	Separación μm	Capacitancia (F)	Variación de la Capacitancia (F)	Referencia
Nanocantiliver y Driver	Horizontal	0.89×10^6	40 x 1 x 0.6	1	0.237×10^{-15}		[6]
Micrófono MEMS				2	10^{-12}	83×10^{-18}	[73] [74]
Nanocantiliver y Driver	Horizontal	1.5×10^6	14.5 x 0.265	0.65	$<50 \times 10^{-15}$		[75]
Array de Microcantilivers Resonantes	Vertical	50×10^3	500 x 100 x 8.6				[76]
Microcantiliver y Driver	Vertical	$1 \times 10^3 - 10 \times 10^6$	200 μm^2 de área	2 - 4	0.02 pF/ μm^2	$0.41 \times 10^{-12} - 3.19 \times 10^{-12}$	[77]
Membrana			50 μm^2 de área	0.267 mm. r.c. ¹		6×10^{-15}	[78]
Membrana			120 μm^2 de área			0.015×10^{-12}	[79]

Los valores de capacitancia reportados entre los pico y femto faradios serán la base del diseño del cantiliver y la variación en ato faradios para el método de medición capacitivo.

4.5. Resumen

Existen métodos que utilizan transductores basados en métodos electroquímicos, ópticos y de masa. Cada uno de estos tres contiene diferentes subclases que pueden ser divididas en métodos “label-based” (con marcaje) y “label-free” (sin marcaje).

Los sensores electroquímicos se pueden clasificar en amperométricos, potenciométricos, impedimétricos y conductimétricos, basados en los parámetros observados como el potencial y conductancia.

La detección basada en métodos ópticos tiene subclases basadas en la absorción, refracción, dispersión, infrarrojo, Raman, quimioluminiscencia, fluorescencia y fosforescencia. Las técnicas más empleadas son la resonancia plasmónica de superficie y fluorescencia.

Los sensores sensibles a cambios de masa depende del uso de cristales piezoeléctricos que pueden hacer vibrar a una frecuencia específica con la aplicación de una señal eléctrica de una frecuencia específica. Cuando la masa aumenta debido a la unión de los compuestos químicos o biológicos, la frecuencia de oscilación del cristal cambia y el cambio resultante puede ser medido y utilizado para determinar la masa adicional del cristal.

Como sensores de cambios de masa están los voladizos o cantilivers ya que tienen la capacidad de vibrar a diferentes frecuencias. Cuando los cantilivers son cubiertos con anticuerpos pueden detectar algunos virus que sean atraídos por diferentes densidades o por cantidad de anticuerpos por área, dependiendo del tamaño del cantiliver.

Capítulo 5

Propuesta de Diseño

En el presente capítulo se analiza y propone el diseño de un biosensor basado en cantilivers. Se realizan las simulaciones con el software COMSOL Multiphysics usando un modelo de dimensión espacial 3D. La física usada fue Mecánica Estructural, Mecánica de Sólidos. Los estudios realizados fueron Estacionario, Frecuencia propia y Análisis pre-estresado, frecuencia propia.

Se analizaron varios modelos de cantilivers de distintas dimensiones y las propiedades físicas de desplazamiento, frecuencia natural y cambio de frecuencia.

Las propiedades mecánicas del cantiliver están completamente definidas por el módulo de Young (E), la densidad (ρ) y las dimensiones geométricas, Fig. 5.1, como lo pudimos constatar en la Ec. 3.14 y en la Ec. 3.17 del modelo matemático.

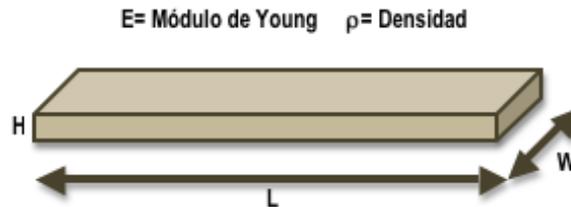


Figura 5.1: Características físicas y geométricas de un cantiliver de sección transversal rectangular.

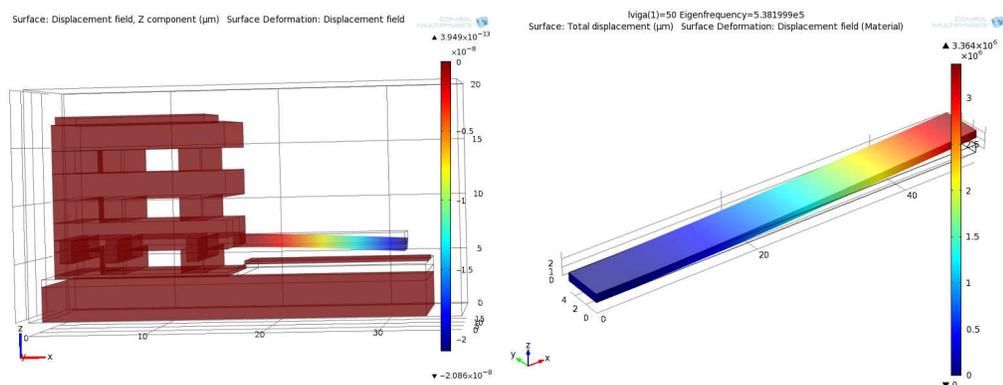
Para el polisilicio el valor de $E = 160GPa$ y $\rho = 2320Kg/m^3$.

5.1. Consideraciones de Diseño

Las consideraciones que se tomaron en cuenta para el diseño del cantiliver fueron las siguientes:

- El peso del cantiliver es despreciable.
- La sección transversal del cantiliver es rectangular.
- Las medidas del voladizo son acordes a las especificaciones de Laboratorios Sandia (Sandia Labs).
- Solo se varió el espesor del cantiliver para una propuesta distinta a la de Laboratorios Sandia.
- El método de medición propuesto es el óptico.
- Se toma en cuenta la posibilidad de medir a través del método capacitivo.

La geometría del cantiliver (ver Fig. 5.2) se basó primeramente en la generada por el software SUMMIT V de los Laboratorios Sandia como se muestra en la Fig. 5.2a. Sin embargo, para optimizar el tiempo de la simulación se tomó solamente la parte del cantiliver suspendido y se fijo de un extremo como en la Fig. 5.2b.



(a) Geometría basada en SUMMIT V (b) Geometría optimizada para la simulación

Figura 5.2: Geometría del biosensor propuesto basado en cantilivers.

5.2. Simulación

5.2.1. Constante de Elasticidad

En el Cuadro 5.1 se muestran los valores de la constante de elasticidad k que va decreciendo conforme la L aumenta. Si se analizan tanto la gráfica de la Fig. 5.4 como la Fig. 5.3 y la Fig. 5.5 podemos comprobar que a menor constante k se obtendrá una menor frecuencia y el cantiliver será lo suficientemente largo para tener un máximo desplazamiento vertical. Estos factores se deben de tomar en cuenta para elegir el método adecuado de medición. Por nuestra parte, los cantilivers con menor constante k son los propicios, hasta este punto de nuestro análisis, como propuesta de primer diseño, para que pueda ser usado con el método de lectura capacitivo; ya que con el método de lectura óptico a través del microscopio de fuerza atómica no hay ningún inconveniente .

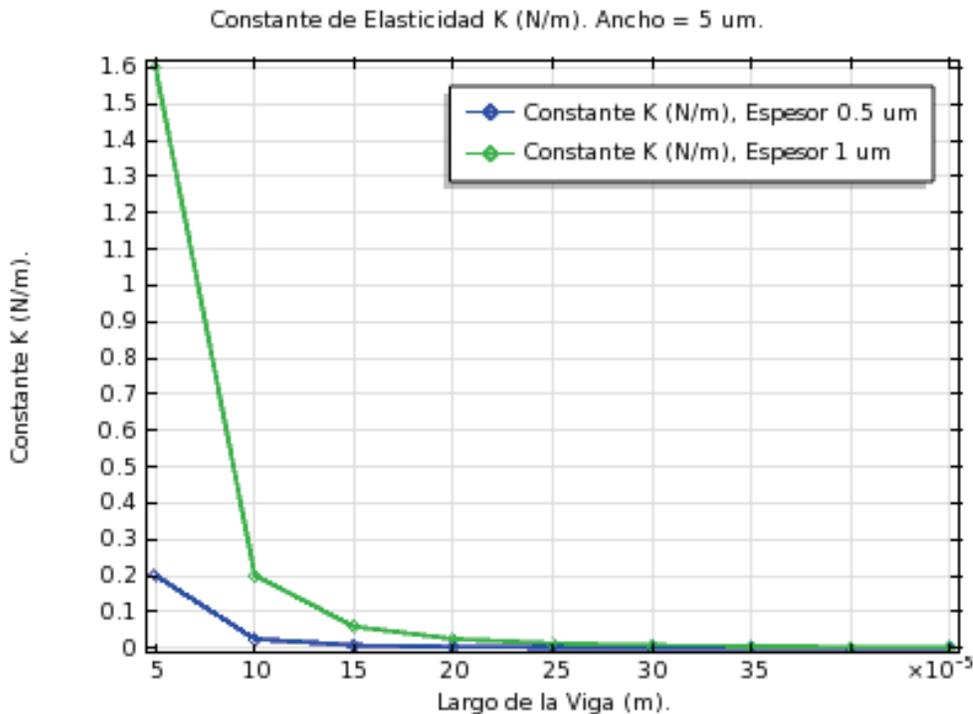


Figura 5.3: Constante de elasticidad k del cantiliver.

Cuadro 5.1: Constante de Elasticidad k

Longitud (m)	Constante k (N/m) Espesor ($0,5\mu m$)	Constante k (N/m) Espesor ($1\mu m$)
5×10^{-5}	0.2	1.6
1×10^{-4}	0.025	0.2
1.5×10^{-4}	0.0074074	0.0592593
2×10^{-4}	0.003125	0.025
2.5×10^{-4}	0.0016	0.0128
3×10^{-4}	9.2592593×10^{-4}	0.0074074
3.5×10^{-4}	5.8309038×10^{-4}	0.0046647
4×10^{-4}	3.90625×10^{-4}	0.003125
4.5×10^{-4}	2.7434842×10^{-4}	0.0021948

5.2.2. Desplazamiento

Los parámetros que se variaron primeramente fueron la longitud L y el espesor H . El valor de W es de $5\mu m$, $m_c = 5^{-15}kg$. y $x = L$ teniendo como resultado los siguientes valores:

Cuadro 5.2: Desplazamiento total del cantiliver w_{max}

Longitud (m)	Desplazamiento w_{max} (m) Espesor ($0,5\mu m$)	Desplazamiento w_{max} (m) Espesor ($1\mu m$)
5.0×10^{-5}	$2.4380300372281454 \times 10^{-13}$	$3.0505095359764295 \times 10^{-14}$
1.0×10^{-4}	$1.9556683343700367 \times 10^{-12}$	$2.4450397862999123 \times 10^{-13}$
1.5×10^{-4}	$6.606535997380173 \times 10^{-12}$	$8.259462322941486 \times 10^{-13}$
2.0×10^{-4}	$1.566777872031654 \times 10^{-11}$	$1.95861209544786 \times 10^{-12}$
2.5×10^{-4}	$3.0609468451366024 \times 10^{-11}$	$3.826357672352172 \times 10^{-12}$
3.0×10^{-4}	$5.2903382490112966 \times 10^{-11}$	$6.613421409892272 \times 10^{-12}$
3.5×10^{-4}	$8.402091346306517 \times 10^{-11}$	$1.0502899512654266 \times 10^{-11}$
4.0×10^{-4}	$1.2543177046181993 \times 10^{-10}$	$1.5679400642569697 \times 10^{-11}$
4.5×10^{-4}	$1.7860824755676053 \times 10^{-10}$	$2.2326908063527546 \times 10^{-11}$

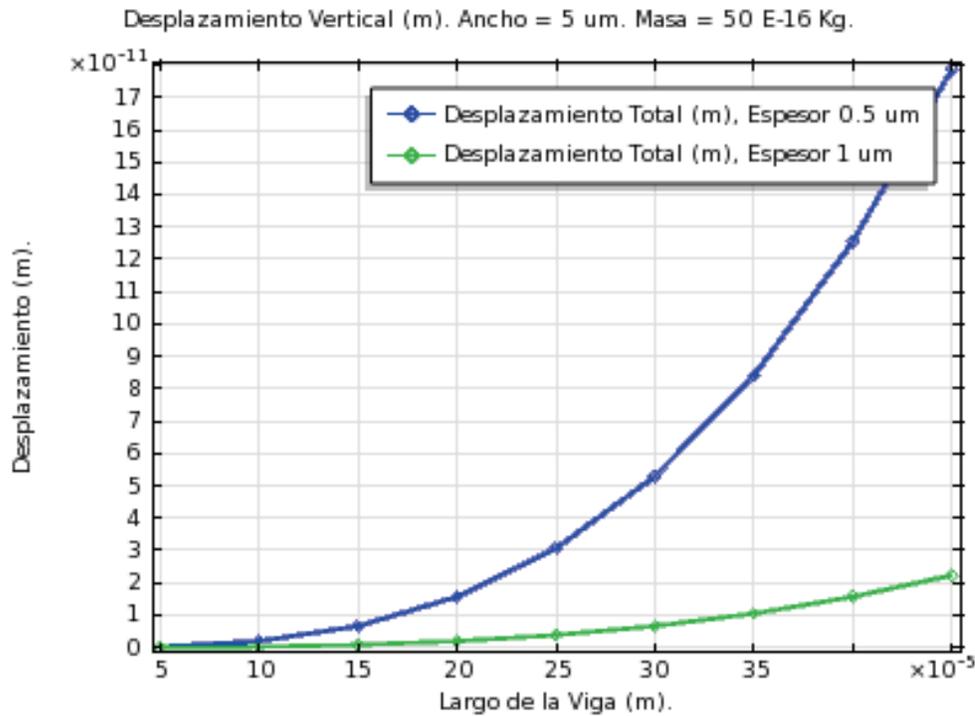


Figura 5.4: Desplazamiento vertical w_{max} del cantiliver.

En el Cuadro 5.2 y en la Fig. 5.4 se puede observar que los cantiliver entre $350\mu\text{m}$ y $450\mu\text{m}$ tienen un desplazamiento del orden de los nanómetros y picómetros, respectivamente, lo que puede ser útil para el método de medición capacitivo.

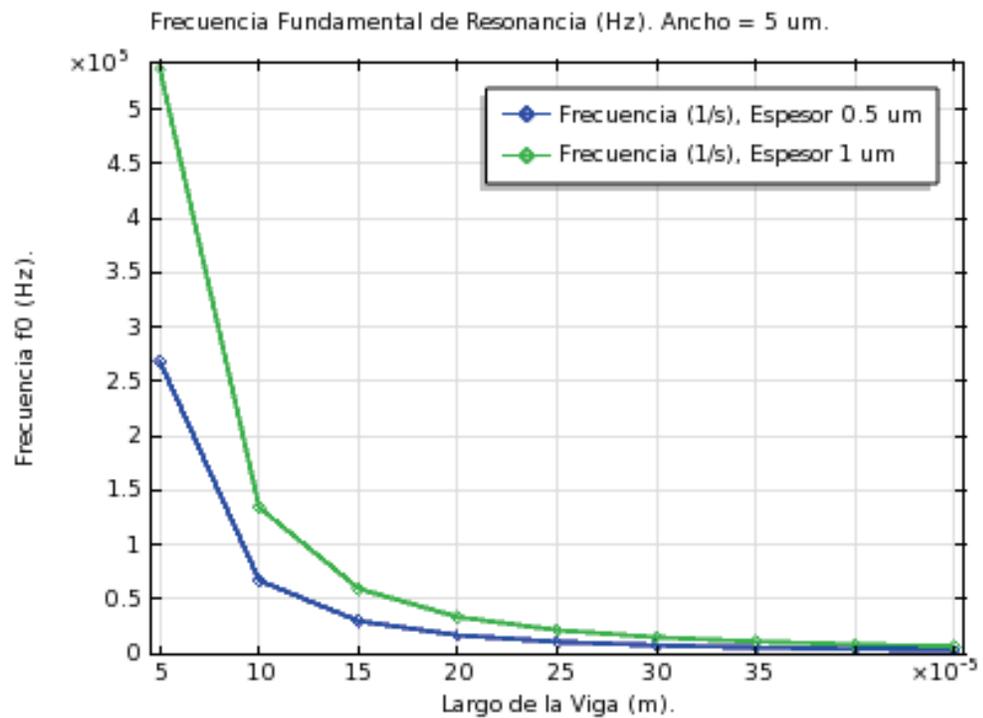
5.2.3. Frecuencia propia o natural

Como se mencionó anteriormente y se ha comprobado con los resultados presentados, la frecuencia natural y la constante de elasticidad solo dependen de las propiedades físicas y geométricas del cantiliver.

Por otra parte, nótese que al aumentar el espesor del cantiliver la frecuencia propia aumenta (Ec. 3.17); sin embargo la flexión máxima disminuye, lo que puede no ser beneficioso para una medición capacitiva del cantiliver.

Cuadro 5.3: Frecuencia propia f_0 del cantiliver

Longitud (m)	Frecuencia f_0 (Hz) Espesor (0,5 μ m)	Frecuencia f_0 (Hz) Espesor (1 μ m)
5.0×10^{-5}	269291.475176762	538256.9132960123
1.0×10^{-4}	67204.152913949	134392.15352030878
1.5×10^{-4}	29850.19306876653	59694.21830569453
2.0×10^{-4}	16785.162553259946	33568.81396648876
2.5×10^{-4}	10740.568961890633	21480.529309781126
3.0×10^{-4}	7457.743077199213	14914.842265302708
3.5×10^{-4}	5478.635602061956	10957.11389753691
4.0×10^{-4}	4194.26947173846	8388.478427505861
4.5×10^{-4}	3313.8071278223065	6627.486154941889

Figura 5.5: Gráfica de la frecuencia f_0 del cantiliver para distintas longitudes L .

5.2.4. Resolución del Cantiliver

De acuerdo con el desarrollo experimental, únicamente se varió la longitud y el espesor del voladizo dado que el ancho no influye en el comportamiento del mismo (Ec. 3.19). Con el propósito de analizar el cambio de frecuencia se fijó el espesor H con un valor de $1\mu m$ y se varió la anchura W , el valor de m_c fue de $1^{-16}kg$.

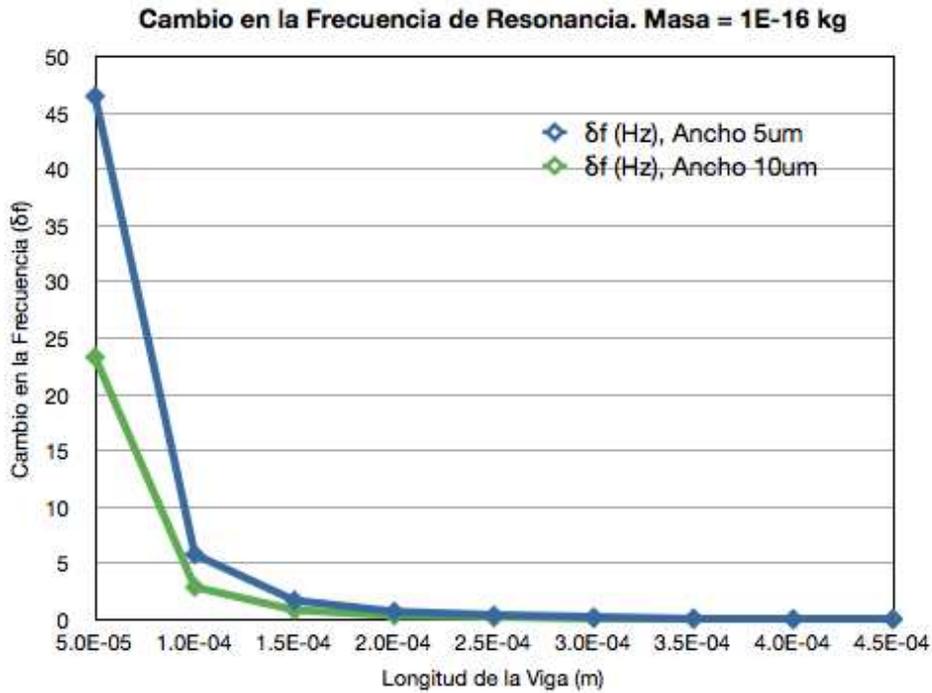


Figura 5.6: Gráfica del cambio de frecuencia δf del cantiliver.

Con base en el Cuadro 5.4 y la Fig. 5.6 se puede ver que el aumento en el ancho del cantiliver repercute en gran medida en su sensibilidad cuando se trata de longitudes menores de $200\mu m$ y en longitudes mayores la sensibilidad es casi igual. Con esta información podemos elegir, si el modo de lectura es capacitivo, cualquier cantiliver mayor de $150\mu m$. Por ejemplo, el voladizo de $450\mu m \times 5\mu m$ es una buena alternativa por el valor de w_{max} y porque el δf es más sensible que la viga de $10\mu m$. Es decir, el cantiliver de $5\mu m$ tiene una $\delta f = 0,0679655792000631$, lo cual significa que por cada $0,01Hz$ de cambio detectó 6 intervalos de masa y el cantiliver de $10\mu m$ solo 3. Esto se puede ver

Cuadro 5.4: Cambio de frecuencia δf del cantiliver con $m_c = 1^{-16}kg$

Longitud (m)	Cambio de Frecuencia δf (Hz) Ancho W ($5\mu m$)	Cambio de Frecuencia δf (Hz) Ancho W ($10\mu m$)
5.0×10^{-5}	46.4720420030644	23.3130868270528
1.0×10^{-4}	5.79659093200462	2.90364238800248
1.5×10^{-4}	1.71507517479768	0.861891189400922
2.0×10^{-4}	0.725903468199249	0.362221456700354
2.5×10^{-4}	0.37225513280282	0.185371997198672
3.0×10^{-4}	0.211695248699471	0.107241915600753
3.5×10^{-4}	0.117221259000871	0.0675207361000503
4.0×10^{-4}	0.0459419429407717	0.0452261453392566
4.5×10^{-4}	0.0679655792000631	0.0317599581303512

más claro en el Cuadro 5.5 y la Fig. 5.7, donde la masa efectiva m_c detectada por cada $\delta f = 1Hz$ es mucho menor la del cantiliver de $450\mu m \times 5\mu m$.

Cuadro 5.5: Masa efectiva m_c (kg) detectada con $\delta f = 1Hz$ y $x = L$

Longitud (m)	Masa Efectiva m_c (kg) Ancho W ($5\mu m$)	Masa Efectiva m_c (kg) Ancho W ($10\mu m$)
5.0×10^{-5}	2.1679×10^{-18}	4.33579×10^{-18}
1.0×10^{-4}	1.73432×10^{-17}	3.46863×10^{-17}
1.5×10^{-4}	5.85332×10^{-17}	1.17066×10^{-16}
2.0×10^{-4}	1.38745×10^{-16}	2.77491×10^{-16}
2.5×10^{-4}	2.70987×10^{-16}	5.41974×10^{-16}
3.0×10^{-4}	4.68266×10^{-16}	9.36531×10^{-16}
3.5×10^{-4}	7.43588×10^{-16}	1.48718×10^{-15}
4.0×10^{-4}	1.10996×10^{-15}	2.21993×10^{-15}
4.5×10^{-4}	1.5804×10^{-15}	3.16079×10^{-15}

Sin embargo, los cantiliver mayores de $150\mu m$ deben tener una masa mayor que la propuesta (m_c) para tener una repercusión significativa en la frecuen-

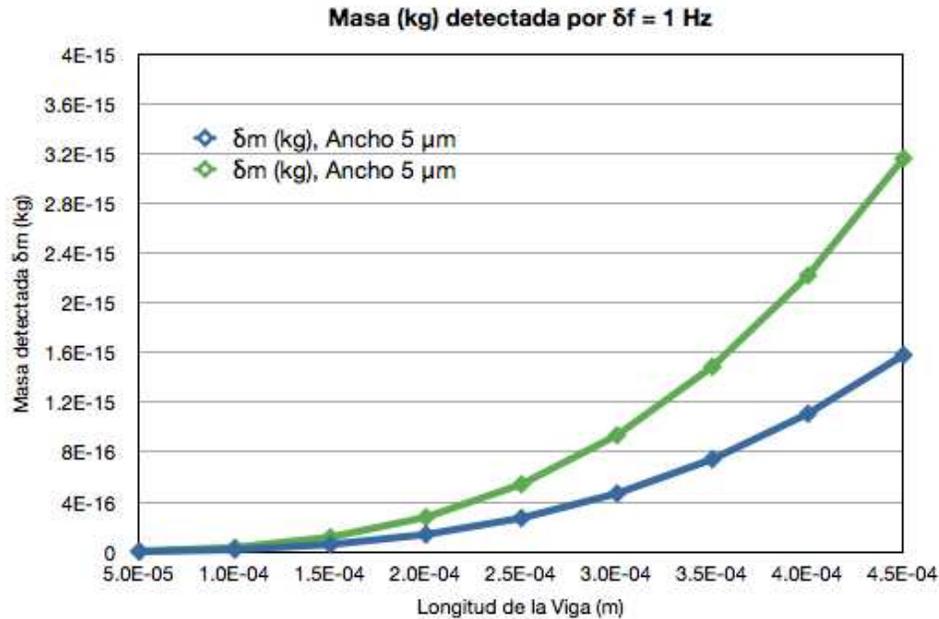


Figura 5.7: Gráfica de la masa efectiva δm (kg) detectada con $\delta f = 1 Hz$ y $x = L$.

cia. Por otra parte, si el modo de medición es óptico el cantiliver de $50\mu m$ con cualquier ancho podría ser una opción factible para detectar masas del orden de $2fg$.

5.3. Resumen

Las simulaciones para diseñar el biosensor se realizaron en el software COMSOL Multiphysics usando un modelo de dimensión espacial 3D. La física usada fue Mecánica Estructural, Mecánica de Sólidos. Los estudios realizados fueron Estacionario, Frecuencia propia y Análisis pre-estresado, frecuencia propia.

Se simularon varios modelos con distintas dimensiones, tomando en cuenta las especificaciones de los laboratorios Sandia y propias. El método de medición es el óptico.

La constante de elasticidad es menor para menores frecuencias y el cantili-

ver con menores dimensiones tiene una constante de elasticidad y frecuencia mayores. Estos factores se deben de tomar en cuenta para elegir el método adecuado de medición.

Los cantiliver entre $350\mu m$ y $450\mu m$ tienen un desplazamiento del orden de los nanómetros y picómetros, respectivamente, lo que puede ser útil para el método de medición capacitivo.

Por último, si el modo de medición es óptico el cantiliver de $50\mu m$ con cualquier ancho podría ser una opción factible para detectar masas del orden de $2fg$.

Capítulo 6

Conclusiones y Trabajo Futuro

6.1. Conclusiones

La contaminación de alimentos es un problema de salud a nivel mundial, la presencia de microorganismos ocurre de manera natural e inevitable [21]. El presente trabajo mostró una importante alternativa para la conservación de la inocuidad alimentaria en la detección temprana de dichos microorganismos. Los trabajos citados en el estado del arte, comprueban dicha propuesta; ya que mencionan a los cantilivers como una excelente opción en los biosensores para detectar estrés y fuerzas pequeñas [2] causadas por la presencia de microorganismo patógenos (detección de masa). Por otra parte, se compiló una serie de material bibliográfico que mejoró el estudio de microestructuras para distintas aplicaciones en nuestro centro de investigación [1] [41] [19] [2] [33] [35] [64] [42].

Para el diseño y la simulación de la resolución del biosensor propuesto se usaron el software SUMMIT V y el software de elemento finito COMSOL Multiphysics, respectivamente, los cuales permitieron proponer distintos diseños con diferentes configuraciones de cantilivers.

A través de la simulación de la frecuencia y los cambios de ésta, además del desplazamiento de las vigas con el COMSOL se obtuvo la validación del modelo utilizado junto con datos provenientes de cantilivers comerciales operados en un microscopio de fuerza atómica [26] e información de artículos y referencias del área. Gracias a ello se decidió como primera propuesta el método de medición óptico y como alternativa el método capacitivo.

Con base en los resultados obtenidos concluimos que la constante de elasticidad es menor para menores frecuencias y el cantiliver con menores dimensiones tiene una constante de elasticidad y frecuencia mayores pero con una mayor resolución.

Los cantiliver entre $350\mu m$ y $450\mu m$ tienen un desplazamiento del orden de los nanómetros y picómetros, respectivamente, lo que puede ser útil para el método de medición capacitivo.

Por otra parte, al aumentar el espesor del cantiliver la frecuencia de resonancia aumenta; sin embargo la flexión máxima disminuye, lo que puede no ser beneficioso para una medición capacitiva del cantiliver.

No obstante, el hecho de aumentar la frecuencia garantiza una mejor resolución, lo que sucede con los cantilivers de $50\mu m$ con una anchura de $5\mu m$ y $10\mu m$. Sin embargo, el aumento con la misma longitud no aumenta la resolución, al contrario la disminuye.

En general, los diseños de dimensiones pequeñas muestran una mejor resolución en los cambios de masas ya que pueden detectar cantidades alrededor de $2fg$.

Los diseños de cantilivers propuestos para la medición del cambio de masa de forma óptica es de $largo = 50\mu m$, $ancho = 5\mu m$ y $espesor = 1\mu m$ y $0,5\mu m$ y capacitiva es de $largo = 450\mu m$, $ancho = 10\mu m$ y $espesor = 1\mu m$ y $0,5\mu m$.

Los resultados obtenidos en el trabajo de tesis fueron presentados en exposición oral en:

- 11th Interamerican Congress of Microscopy - CIASEM 2011. Funcionalización y caracterización de cantilevers para la fabricación de microbiosensores mediante técnicas de microscopía y espectroscopía. Mendoza-Madrigal, A. G. and Palacios-González, E. and Martínez-Silva, V. F. and Garibay Febles, V. and Méndez-Méndez, J. V. and Villa-Vargas, L. A.. 24-29 septiembre, Mérida Yucatán, México.
- 3rd International Supercomputing Conference in Mexico. Diseño y Caracterización de un Biosensor en Modo de Resonancia para la Detección de Microorganismos Patógenos. V. Martínez-Silva, L. Villa-Vargas, J. Chanona-Pérez, M. Ramírez-Salinas, J. Martínez-Castro. 14-16 Marzo 2012, Guanajuato, Gto.

6.2. Trabajo Futuro

El uso de microestructuras resonantes cantilivers en la detección de pequeños cambios de masa prometen ser una excelente alternativa y basados en el presente trabajo de tesis motivan a los siguientes trabajos futuros:

- Fabricación y caracterización de los diseños propuestos.
- Con base en la caracterización de los diseños propuestos mejorar el modelo propuesto y la simulación.
- Adecuación de los diseños para la medición capacitiva.
- Uso de los cantilivers resonantes en nuevas aplicaciones.
- Fortalecimiento de la línea de investigación de MEMS y NEMS en el centro de investigación.
- Establecimiento de pautas de diseño, simulación, funcionalización y fabricación de MEMS y NEMS en el IPN.

Apéndice A

Proceso de Fabricación de Cantilivers

El siguiente proceso de fabricación se llevó a cabo en la estancia de investigación en la University of Alberta en el laboratorio NanoFab (A Micro Machining and Nanofabrication Facility) bajo la supervisión del Dr. Stephane Evoy.

Se usaron obleas de silicio de 4 pulgadas. Los pasos de la fabricación fueron los siguientes:

- Lavado de las obleas con solución Piraña (3:1) compuesta de ácido sulfúrico, H_2SO_4 (96 %) y peróxido de hidrógeno, H_2O_2 (30 %). El tiempo de exposición de las obleas en la solución fue de 15 min.
- Crecimiento de la capa de sacrificio de 600nm de óxido de silicio térmico (SiO_2) en un horno Minibrute Middle (Thermal Oxide and General Annealing) durante 3.5hrs. a 950°C (consultar Fig. A.1). En este proceso es importante que el nivel de humedad (agua) del horno no disminuya.
- La medición del espesor de la capa de óxido de sacrificio se hizo con un sistema de mapeo de espesores de películas transparentes, Filmetrics Resist and Dielectric Thickness Mapping System.
- Se depositó un capa de hezametildisilazano (HDMS) para acrecentar la adhesión de la fotoresina en el SiO_2 . Se usó un YES HDMS Oven durante 17min. en el programa 1.

- Se depositó aproximadamente una capa de fotoresina de $1.25\mu\text{m}$ (ver Fig. A.2 como referencia) de espesor sobre cada oblea con un Solitec Spinner a una velocidad de expansión de 500RPM por un tiempo de 10s y una velocidad de rotación de 4000RPM durante 40s. Por cada oblea se usó 10mL. de fotoresina.

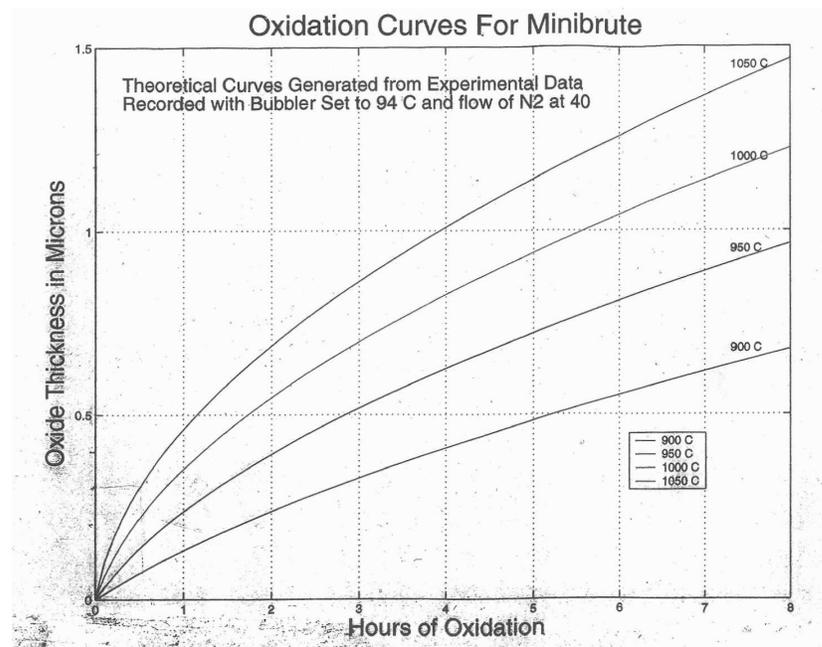


Figura A.1: Curvas de oxidación del horno Minibrute Middle [80].

- Las obleas fueron calentadas u horneadas suavemente (soft bake) en un CEE Hotplate durante 90s a 115°C . Antes hay que precalenta el CEE por 30min. Después de haberse calentado las obleas es necesario exponerse al ambiente del laboratorio durante 15min. para que éstas se rehidraten y la exposición de la fotoresina resulte adecuada.
- El primer patrón que se grabó fue el de la máscara de la Fig. A.3a. La alineación de las máscaras con las obleas se hicieron con el Mask Aligner (IR Thru wafer) con una exposición de rayos ultravioleta de 2s.

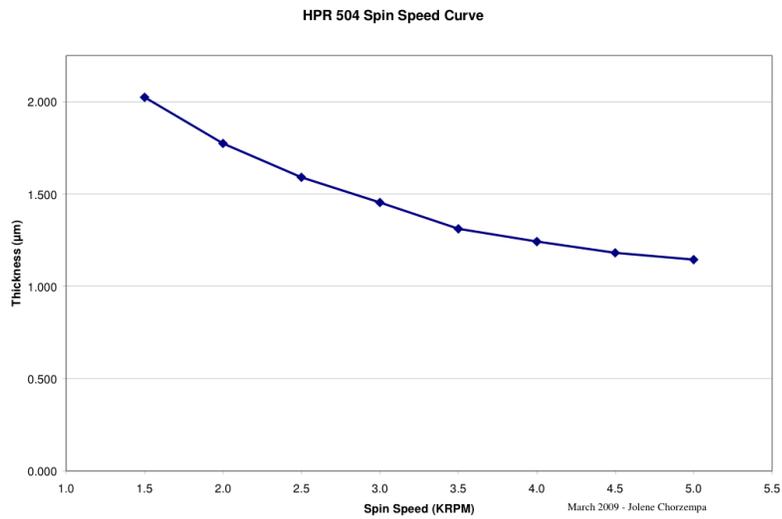


Figura A.2: Curva de velocidad de centrifugado de la resina HPR 504 [80].

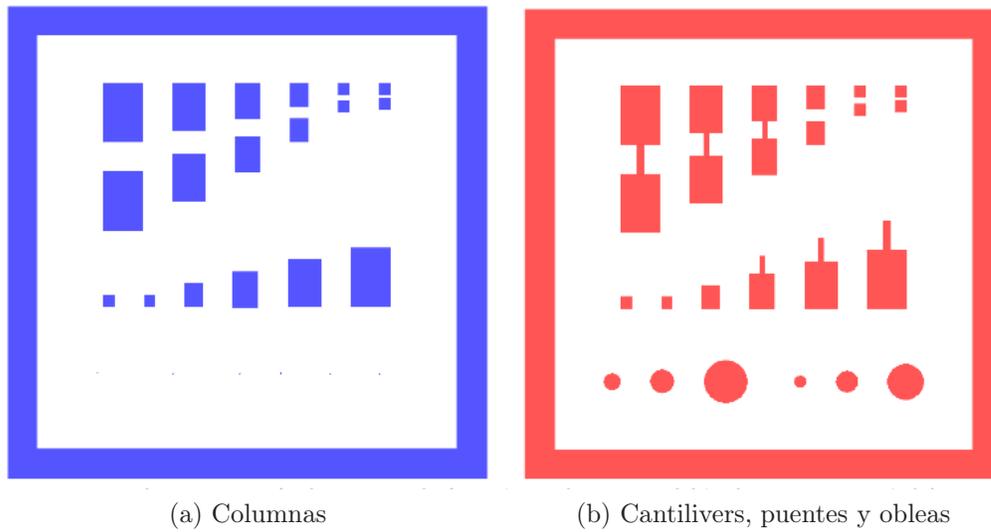


Figura A.3: Esquemas de las fotomáscaras para la columna y los dispositivos a fabricar [80].

- Se verificó el grabado del primer patrón (ver Fig. A.3a) en las obleas

con un microscopio óptico con imagen fluorescente Leica INM-100.

- La fotoresina se removió con acetona durante 20s.
- El ataque químico en el óxido de silicio fue a través de un grabado de plasma con un Trion RIE¹ con los valores mostrados en el Cuadro A.1. El grabado fue por 995s y la resina se removió con sonicación de acetona durante 20s.

Cuadro A.1: Valores de configuración del Trion RIE para el grabado en SiO₂ [80].

Parámetro	Valor
Gas Flow - CHF ₃ (sccm)	40
Gas Flow - O ₂ (sccm)	5
Chamber Pressure (mTorr)	40
RF Power (W)	125

- Para la deposición de polisilicio se usó un horno al vacío Tystar LPCVD con una receta de estrés bajo. El espesor de la capa fue de aproximadamente 500nm y los parámetros de la receta usados están en el Cuadro A.2.

Cuadro A.2: Valores de configuración para la deposición del polisilicio [80].

Parámetro	Valor
Temperatura (°C)	590
Gas Flow - SiH ₄ (sccm)	50
Chamber Pressure (mTorr)	250

- Nuevamente se llevó a cabo el proceso de litografía (deposición de la fotoresina, horneado, alineación y exposición a los rayos ultravioleta) usando la máscara de la Fig. A.3b.

¹Del inglés Reactive ion etching

- Para el grabado del polisilicio se usó nuevamente el Trion RIE. Se usaron los valores de configuración del Cuadro A.3.

Cuadro A.3: Valores de configuración para el grabado en el polisilicio [80].

Parámetro	Valor
Gas Flow - C_4F_8 (sccm)	65
Gas Flow - SF_6 (sccm)	80
Chamber Pressure (mTorr)	20
RF Power (W)	20

Apéndice B

Fundamentos de Microbiología y Pruebas de Crecimiento en Cantilivers de Microscopía de Fuerza Atómica

B.1. Crecimiento de Microorganismos

El crecimiento bacteriano involucra la división de una célula original en dos células hijas mediante fisión binaria, así este proceso puede repetirse de forma indefinida dependiendo de la concentración de sustrato disponible en el sistema de crecimiento. En un proceso por lote la población bacteriana experimenta un crecimiento de tipo exponencial y este puede evaluarse mediante el recuento celular por métodos directos e individuales (microscopía, citometría de flujo), por métodos directos y masivos (biomasa), por métodos indirectos e individuales (conteo de colonias), o por métodos indirectos y en bloque (número más probable, turbidez, absorción de nutrientes). Normalmente estos métodos pueden ser costosos, tardados y en algunos casos presentan un bajo nivel de precisión y sensibilidad [81].

Una curva típica de crecimiento bacteriano en un cultivo por lote realizado por ejemplo en una caja Petri, matraz o reactor, muestra cuatro fases diferentes (Fig. B.1):

A) Fase de adaptación.

- B) Fase exponencial.
- C) Fase estacionaria.
- D) Fase de declive.

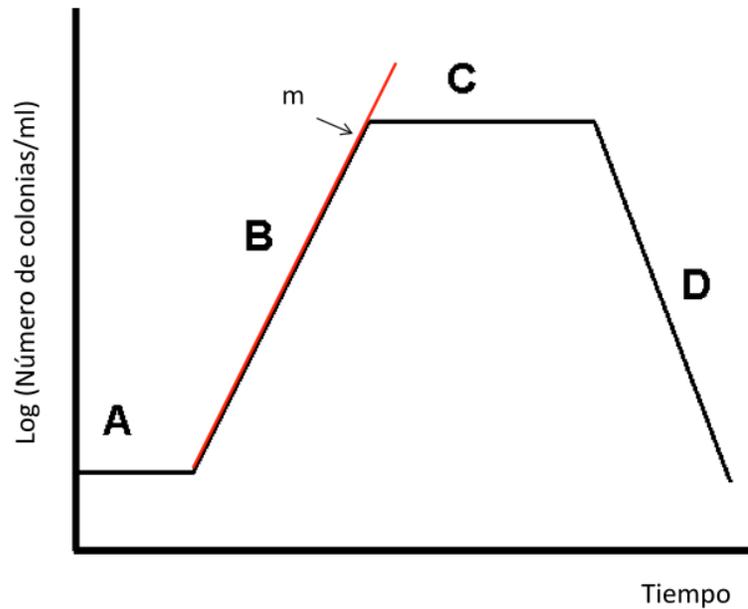


Figura B.1: Curva típica de crecimiento bacteriano ilustrando sus diferentes etapas (m es la tasa de crecimiento específica del microorganismo basada en un modelo simplificado de crecimiento logarítmico).

A. Durante esta fase las bacterias se adaptan a las condiciones de crecimiento. Es el período en el que las bacterias individuales están madurando y no tienen aún la posibilidad de dividirse. Durante la fase de adaptación del ciclo de crecimiento de las bacterias, se produce la síntesis de ARN, enzimas y otras moléculas. Así que en esta fase los microorganismos no están latentes o no crecen.

B. Esta fase también es a veces llamada fase logarítmica, es un período caracterizado por la duplicación celular. El número de nuevas células que aparecen por unidad de tiempo es proporcional a la población actual. Si el crecimiento no se limita, la duplicación continuará a un ritmo constante, por lo tanto el

número de células y la tasa de crecimiento de la población se duplican con cada período de tiempo consecutivo. Para este tipo de crecimiento exponencial, representando el logaritmo natural del número de células frente al tiempo se obtiene una línea recta. La pendiente de esta línea es la tasa de crecimiento específica del organismo, que es una medida del número de divisiones por célula y por unidad de tiempo. La tasa real de este crecimiento (es decir, la pendiente de la recta en la figura) depende de las condiciones de crecimiento, que afecta a la frecuencia de los eventos de división celular y a la probabilidad de que ambas células hijas sobrevivan. Bajo condiciones controladas, por ejemplo las cianobacterias pueden duplicar su población cuatro veces al día. El crecimiento exponencial no puede continuar indefinidamente, sin embargo, porque el medio llega pronto al agotamiento de nutrientes mientras se acumulan los desechos.

C. En la fase estacionaria, la tasa de crecimiento disminuye como consecuencia del agotamiento de nutrientes y la acumulación de productos tóxicos. Esta fase se alcanza cuando las bacterias empiezan a agotar los recursos que están disponibles para ellas. Esta fase se caracteriza por un valor constante del número de bacterias a medida que la tasa de crecimiento de las bacterias se iguala con la tasa de muerte bacteriana.

D. En la fase de declive o muerte, las bacterias se quedan sin nutrientes y mueren [82].

Así, es posible monitorear el crecimiento de microorganismos mediante microbiosensores, por ejemplo los basados en cambio de masa, el sistema más sencillo es una viga o cantiliver de silicio sometido a una excitación electrostática. Es posible funcionalizar la superficie del cantiliver con un soporte biológico u orgánico para lograr la adhesión y el crecimiento de los microorganismos; este puede ser evaluado de forma indirecta desde los cambios de amplitud y frecuencia de resonancia de cantiliver detectado mediante un sistema de fotodetección. Un sistema sencillo que integra estos elementos son los microscopios de fuerza atómica. El principio de funcionamiento de un microscopio de fuerza atómica se ilustra en la Fig. B.2

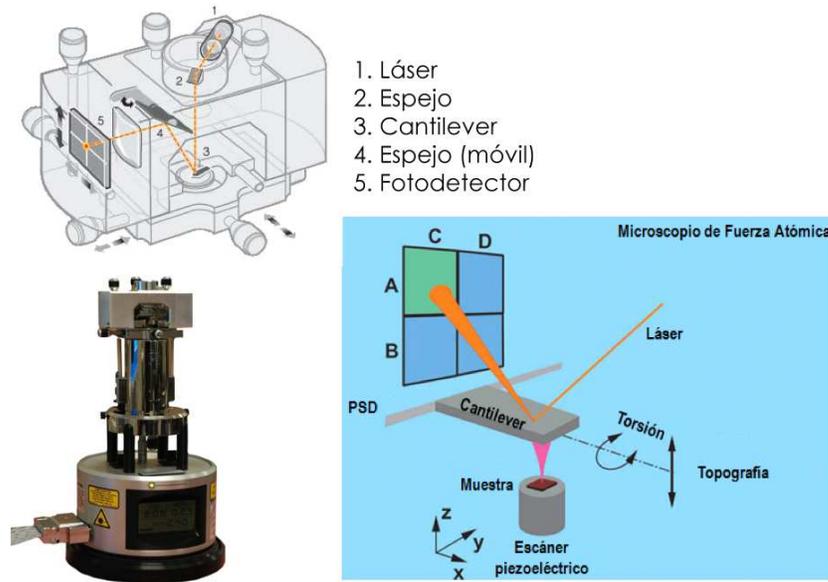


Figura B.2: Principio de funcionamiento del microscopio de fuerza atómica.

B.2. Funcionalización

En este trabajo se realizó una prueba de concepto que coadyuvó a plantear la simulación para el modo dinámico del funcionamiento del cantilever, se desarrolló una metodología para la funcionalización y detección empleando técnicas de microscopía óptica, electrónica de barrido y de fuerza atómica.

El proceso de funcionalización de los cantilevers se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Primeramente se hizo una limpieza para eliminar la contaminación de la superficie. Los cantilevers se limpiaron durante 20 minutos con una solución “Piraña” (95-97 % de H_2SO_4 y 30 % H_2O_2 , 1:1), posteriormente se enjuagaron con agua esterilizada, filtrada y desionizada. La limpieza se realizó dos veces [83].
- El siguiente paso fue fijar los cantilevers en una platina de vidrio y se sumergieron en una solución sililada (1 % (3-glicidil-oxipropil)-trimetiloxisilano, 0.5 % N-etildiisopropilamina) durante 4 horas para formar una monocapa autoensamblada la cual proporcionó una superficie hidroxil-reactiva para reaccionar con los grupos hidroxilo de la

agarosa.

- Posteriormente, los cantilevers se enjuagaron con agua esterilizada, filtrada y desionizada y se secaron con nitrógeno gaseoso [84].
- La formación de la película de agarosa se llevo a cabo por medio de microcanales y de microcapilares:

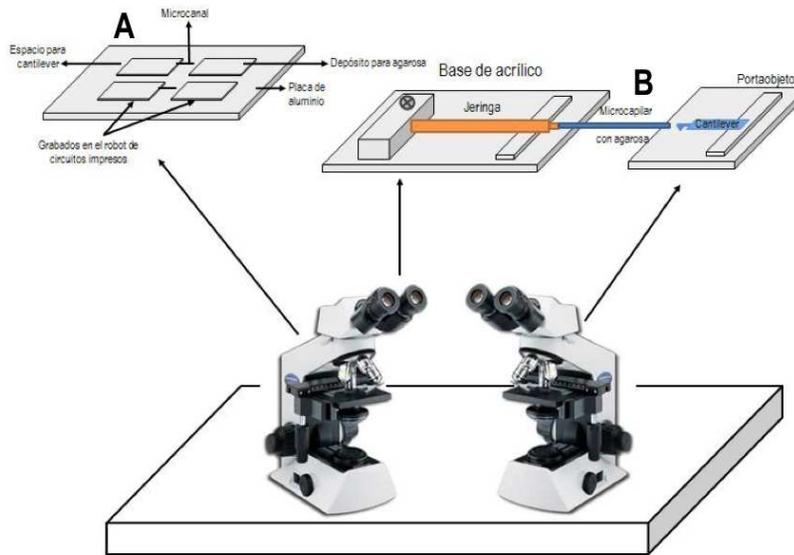


Figura B.3: Sistema acoplado para la funcionalización de cantilevers, empleando A) microcanales y B) microcapilares. [26].

- o Para la funcionalización con microcanales, se empleó una placa de aluminio pulida ($3 \times 3 \times 0.1$ cm), la cual fue grabada con un robot de circuitos impresos (LPKF, Protomat), siguiendo un diseño generado en el software L-Edit. El microcanal se realizó a través de una devastación con el haz de iones de un Microscopio Electrónico de Barrido de Doble Haz (Unidad Dual Beam SEM/FIB NOVA 200, FEI Company). Las dimensiones del microcanal fueron de $400\mu\text{m}$ de largo x $90\mu\text{m}$ de ancho. En uno de los grabados se adhirió una lámina de acetato de polivinilo con la finalidad de confinar el flujo de la agarosa para que pueda fluir hacia el cantilever. Se colocó una jeringa en la lámina de acetato para suministrar

la agarosa al 1%. En el grabado se colocó el porta cantilever previamente funcionalizado cuidando que el cantilever se ajustara a las medidas del microcanal y que la agarosa que se encontraba a 40°C fluyera fácilmente. El porta cantilever permaneció en el microcanal durante 30 segundos, una vez que la agarosa había sido suministrada. El proceso se monitoreó con un microscopio óptico (MEIJI EMT CPI-48403-35) y una videocámara (SONY DCR-TRV120) ver Fig. B.3A.

- o Para la funcionalización con microcapilares, un porta cantilever se fijó a un portaobjetos con la finalidad de colocarlo en la platina de un microscopio óptico (MEIJI EMT CPI-48403-35). Por otro lado, se fabricó un sistema de micromanipulación a partir de placas de acrílico, una jeringa y un microcapilar, el cual contenía una solución de agarosa al 0.8% (p/v) y se colocó en un soporte con movimiento vertical y horizontal que sirvió como manipulador del capilar. El cantilever se introdujo en el microcapilar y permaneció durante 30 segundos con la finalidad de cubrir la superficie con agarosa. El proceso se monitoreó con un microscopio óptico y una videocámara anteriormente mencionados (ver Fig. B.3B) [85].

En esta prueba de concepto se usó con modelo un microorganismo probiótico (*Lactobacillus plantarum*) debido a que este microorganismo muestra una adecuada adhesión al soporte (agarosa) y al ser no patógeno su manejo no implica un riesgo durante los experimentos y manipulación. Así, para detectar el crecimiento de este microorganismo en un cantilever, se puso en contacto durante 10 minutos por inmersión con una suspensión con células en el medio de cultivo MRS (Man Rogosa Sharpe, 1960) que es específico para este microorganismo probiótico.

Para evaluar la detección de este microorganismo se usó la deflexión del cantilever (medida indirecta del crecimiento microbiano), se usó un microscopio de fuerza atómica (MultiMode V, VEECO). La medición se llevó a cabo de la siguiente manera: se empleó un cantilever funcionalizado en modo Tapping o intermitente, se calibró el microscopio con la frecuencia de resonancia propia de cada cantilever; el cantilever oscila a su propia frecuencia de resonancia usando un actuador piezoeléctrico. Así la señal de amplitud y frecuencia de resonancia fueron obtenidas

a diferentes tiempos cada 30 minutos durante cinco horas. Se propuso un método para evaluar ambas señales (frecuencia de resonancia y amplitud) e involucra la integración numérica de estas curvas con respecto al tiempo, se evaluó el área bajo la curva de un intervalo donde se percibía señal, graficando tiempo vs f (frecuencia de resonancia) vs A (amplitud), de la gráfica se seleccionó un intervalo de f donde existía señal y desde dichos datos se obtuvo el área bajo la curva de las señales a través de la siguiente ecuación, que evalúa la diferencia de la señal inicial del cantilever con respecto al cambio de la señal a un tiempo θ :

$$\int_{f_i}^{f_f} \left[\frac{\bar{A}}{df} \right]_0 - \int_{f_i}^{f_f} \left[\frac{\bar{A}}{df} \right]_{\theta} \quad (\text{B.1})$$

Donde f_i es la frecuencia de resonancia inicial, f_f es la frecuencia de resonancia final y \bar{A} es el promedio aritmético.

La Fig. B.4, muestra la señal de la f vs A de un cantilivers sin Fig. B.4a y con inoculo Fig. Fig. B.4b inicial del microorganismo de prueba. Para el cantiliver si inoculo se observa que la amplitud (V) y la frecuencia de resonancia (kHz) no varían a lo largo del tiempo debido a que no hay microorganismos y por lo tanto no hay crecimiento. En la Fig. B.4b se observa que el área bajo la curva es menor a lo largo del tiempo y la señal disminuye debido al crecimiento de los microorganismos.

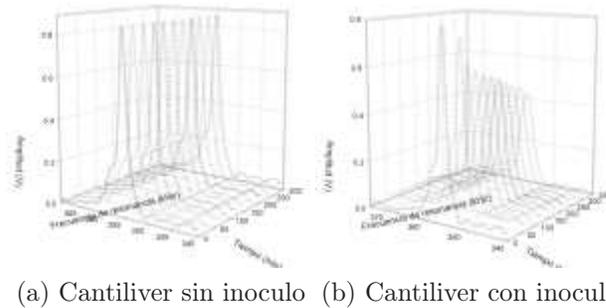


Figura B.4: Curvas de A vs f en función del tiempo, obtenidas en el microscopio de fuerza atómica, ambos determinados en aire y en modo intermitente (tapping)

En la Fig. B.5 se muestran imágenes de microscopía electrónica de barrido de alta resolución donde se aprecia el crecimiento de los microorganismos en los cantilivers en diferentes etapas de crecimiento.

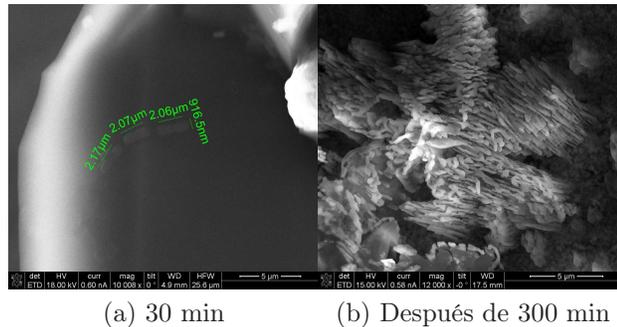


Figura B.5: Microorganismos (*Lactobacillus plantarum*) creciendo en la superficie de agarosa de los cantilivers funcionalizados en diferentes etapas de crecimiento.

Los valores de las señales en los cantilivers evaluados mediante el método de integración permiten observar como la diferencia de entre la señal inicial integrada aumenta con respecto al tiempo y esto se pudo asociar al crecimiento de los microorganismos; mientras cuando el cantiliver no tiene inóculo este valor permanece constante como se puede apreciar en la Fig. B.6.

Con base en estos experimentos se puede obtener información útil para mejorar el modelo matemático propuesto para la flexión de las vigas, además de la simulación y diseño de microbiosensores basados en cantilivers para la detección microorganismos patógenos, de importancia en alimentos y en otras áreas médico-biológicas.

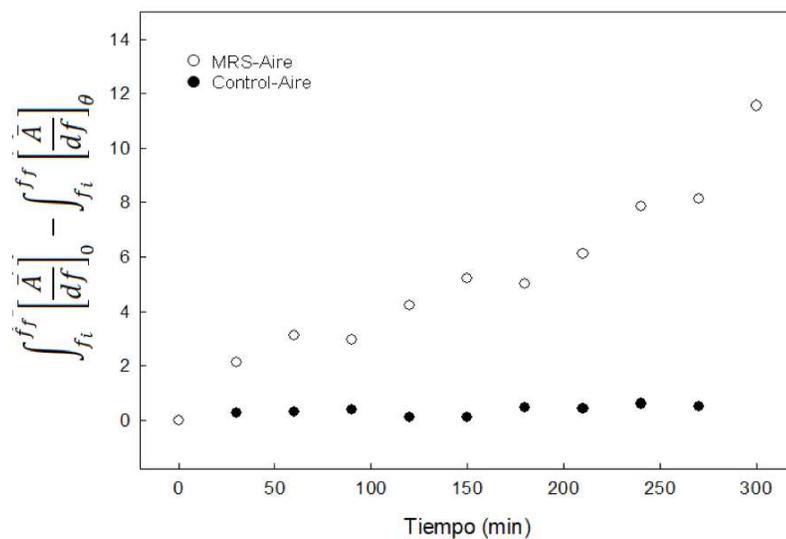


Figura B.6: Cinética del cambio de la señal integrada de los cantilivers con y sin inoculo, que se asocio al crecimientos de los Microorganismos (*Lactobacillus plantarum*) en la superficie de los cantilivers funcionalizados.

Apéndice C

Pautas para el diseño de un biosensor

El proceso para el diseño de un biosensor basado en MEMS y NEMS puede ser variable de manera experimental; sin embargo, existen pautas importantes y comunes. Las siguientes pautas que se mencionan son producto de la experiencia al realizar el presente trabajo de tesis.

- Primeramente se debe tener claro el uso de los MEMS y NEMS para diseñar un biosensor; específicamente su uso como transductor o actuador.
- Definir el fenómeno biológico que se pretende detectar, es decir; si se requiere sensar la presencia de un microorganismo, bacteria, virus, DNA, entre otros.
- Verificar los trabajos y artículos ya hechos para detectar dicho fenómeno biológico.
- Clasificar los métodos de detección con base a las herramientas de diseño y modelado y de fabricación con que se cuentan.
- Identificar las formas de excitación y medición de los MEMS usados en los métodos de los trabajos ya existentes.
- Definir si se va a verificar el concepto de una de las propuestas ya hechas, si se va a mejorar algún método que se haya propuesto o se

esté usando actualmente o si se quiere proponer un método nuevo de detección.

- Verificar las características físicas de los materiales que se van a usar.
- Es necesario, más no indispensable, tener un modelo matemático que represente el comportamiento físico y caracterización del transductor que se va a usar. En caso de no tenerlo, se necesitan referencias de las características físicas y mediciones del transductor.
- Para la simulación se debe contar con la geometría del transductor, las medidas de éste, los materiales a usar, las características físicas de dichos materiales, las condiciones ambientales a las que va a operar, el modo de excitación y de medición del transductor, las condiciones del elemento biológico a sensar, la interrelación que va a tener el elemento biológico con el transductor. Es necesario todos estos aspectos ya que van a definir la física o físicas y los estudios que se van a usar en la simulación.
- Verificar los datos de la simulación con los datos obtenidos por el modelo matemático y/o referencias.
- Ya que se ha elegido el o los modelos a fabricar, se debe realizar las máscaras y verificar el proceso de fabricación y pruebas para validar las simulaciones y modelo matemático.

Bibliografía

- [1] Stephen D. Senturia. *Microsystems Design. Vol. 1*. Kluwer Academic Publishers, 2002.
- [2] P. G. Datskos, T. Thundat, and V. N. Lavrik. *Micro and Nanocantilever Sensors. Encyclopedia of Nonoscience and Nanotechnology*. Kluwer Academic Publishers, 2004.
- [3] G. Binnig, C. F. Quate, and Ch. Gerberg. Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, 1986.
- [4] Kamil L. Ekinici. Nanomechanics. presentado en microtechnologies for the new millenium 2005. symposium smart sensor, actuator and mems ii. *Proceedings of SPIE*, 2005.
- [5] Takahito Ono, Xinxin Li, and Hidetoshi Miyasahita. Mass sensing of adsorbed molecules in sub-picogram sample with ultrathin silicon resonator. *Review of Scientific Instruments.*, 2003.
- [6] J. Verd, M. Abadal, G. Villarroya, J. Teva, X. Uranga, A. Borrisé, F. Campabadal, J. Esteve, E. Figueras, F. Pérez-Murano, Z. Davis, E. Forsen, A. Boisen, and N. Barniol. Design, fabrication and characterization of a sub-microelectromechanical resonator with monolithically integrated cmos readout circuit. *IEEE Journal of Microelectromechanical Systems*, 2005.
- [7] L. A. Pinnaduwaage, A. Gehl, D.L. Hedden, G. Muralidharan, T. Thundat, R. T. Lareau, T. Sulchek, L. Manning, B. Rogers, M. Jones, and J.D. Adams. A microsensor for trinitrotoluene vapor. *Nature*, 2003.
- [8] T.P. Burg and S. R. Manalis. Suspended microchannel resonators for biomolecular detection. *Applied Physics Letters*, 2003.

- [9] Donald R. Askeland and Prodeep P. Phulé. *Ciencia e Ingeniería de los Materiales*. International Thomson, 2004.
- [10] S. A. Campbell. *The Science and Engineering of Microelectronic Fabrication*. Oxford University Press, 1996.
- [11] C. Kapnistis, K. Misiakos, and N. Haralabidis. A low noise small area self switched cmos charge sensitive readout chain. *IEEE Trans. Nucl. Sci.*, 1999.
- [12] C. Guazzoni, M. Sampietro, A. Fazzi, and P. Lechner. Embedded front-end for charge amplifier configuration with sub-threshold mosfet continuous reset. *IEEE Trans. Nucl. Sci.*, 2000.
- [13] E. Obermeier. Proceedings of material research. mechanical and thermophysical properties of thin film materials for mems: Techniques and devices. *Society Symposium.*, 1997.
- [14] C. Serre, P. Gorostiza, A. Pérez-Rodríguez, F. Sanz, and J. R. Morante. Measurement of micromechanical properties of polysilicon microstructures with an atomic force microscope. *Sensors and Actuators A.*, 1998.
- [15] S. Ekelof. The genesis of the wheatstone bridge. *Eng. Sci. and Education J.*, 2001.
- [16] D. J. Yonce, P. P. Bey Jr., and T. L. Fare. A dc autonulling bridge for real- time resistance measurement. *IEEE Trans. Circ. and Syst. I.*, 2000.
- [17] D. W. Braudaway. Precision resistors: a review of the techniques of measurement, advantages, disadvantages, and results. *IEEE Trans. Instr. and Meas.*, 1999.
- [18] L. Xiujun and G. C. M. Meijer. A smart and accurate interface for resistive sensors. *IEEE Trans. Instr. and Meas.*, 2001.
- [19] Jan G. Korvink and Oliver Paul, editors. *MEMS: A Practical Guide to Design, Analysis, and Applications*. Springer, 2006.
- [20] V. Velusamy, K. Arshak, O. Korostynska, K. Oliwa, and C. Adley. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnology Advances.*, 2010.

- [21] R. B. Avendaño, R. S. Rinderman, M. S. Lugo, and L. A. Mungaray. *La inocuidad alimentaria en México: las hortalizas frescas de exportación*. Miguel Ángel Porrúa, 2006.
- [22] E. Alocilja and S. Radke. Marker analysis of biosensors for food safety. *Biosensors and Bioelectronics.*, 2003.
- [23] S.S. Jin, J. Zhou, and J. Ye. Adoption of haccp system in the chinese food industry: a comparative analysis. *Food Control.*, 2008.
- [24] E. Taylor. A new method of haccp for the catering and food service industry. *Food Control.*, 2007.
- [25] G. Mucchetti, B. Bonvini, S. Francolino, E. Neviani, and D. Carminati. Effect of washing with a high pressure water spray on removal of listeria innocua from gorgonzola cheese rind. *Food Control.*, 2008.
- [26] A. G. Mendoza-Madrigal, E. Palacios-González, V. F. Martínez-Silva, V. Garibay Febles, J. V. Méndez-Méndez, and L. A. Villa-Vargas. Funcionalización y caracterización de cantilevers para la fabricación de microbiosensores mediante técnicas de microscopía y espectroscopía.
- [27] AEH Shearer, CM Strapp, and RD. Joerger. Evaluation of a polymerase chain reaction-based system for detection of salmonella enteritidis, escherichia coli o157: H7, listeria spp., and listeria monocytogenes on fresh fruits and vegetables. *J Food Prot.*, 2001.
- [28] I Abdel-Hamid, D Ivnitski, P Atanasov, and E. Wilkins. Highly sensitive flow-injection immunoassay system for rapid detection of bacteria. *Anal Chim Acta*, 1999b.
- [29] SS Iqbal, MW Mayo, JG Bruno, BV Bronk, CA Batt, and JP. Chambers. A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat agents. *Biosens Bioelectron.*, 2000.
- [30] JH Meng and MP. Doyle. Introduction. microbiological food safety. *Microb Infect*, 2002.
- [31] S. Toze. Pcr and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. *Water Res*, 1999.

- [32] R. Kumar, PK. Surendran, and N. Thampuran. Evaluation of culture, elisa and pcr assays for the detection of salmonella in seafood. *Lett Appl Microbiol.*, 2008.
- [33] P. G. Datskos, V. N. Lavrik, and M. J. Sepaniak. *Chemical and Biological Sensors Based on Microcantilevers*. Kluwer Academic Publishers, 2005.
- [34] M. Velasco-García and T. Mottram. Biosensor technology addressing agricultural problems. *Biosystems Engineering*, 2003.
- [35] Víctor González Rumayor, Esther García Iglesias, Olga Ruiz Galán, and Lara Gago Cabezas. Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria. Technical report, Universidad Complutense de Madrid, 2005.
- [36] QSense. <http://www.q.sense.com>. Technical report, QSense, 2011.
- [37] C.K. O’Sullivan and G.G. Guilbautl. Commercial quartz crystal microbalances-theory and applications. *Biosensors and Bioelectronics.*, 1999.
- [38] Wenhua Zhang and Kimberly L. Turner. Application of parametric resonances amplification in a single-crystal silicon micro-oscillator based mass sensor. *Sensors and Actuators A.*, 2005.
- [39] K.L. Ekinici, X. M. H. Huang, and M.L. Roukes. Ultrasensitive nanoelectromechanical mass detection. *Applied Physics Letters.*, 2004.
- [40] Liviu Nicu, Matthiew Guirardel, Frédéric Chambosse, Pierre Rougerie, Sary Hinh, Emmanuelle Trevisiol, Jean-Marie Francois, Jean-Pierre Majoral, Anne-Marie Caminade, Eric Cattan, and Christian. Bergaud. Resonating piezoelectric membranes for microelectromechanilly based bioassay: detection of streptavidin-gold nanoparticles interaction with biotinylated dna. *Sensors and Actuators B.*, 2005.
- [41] Dorr Sarid. *Scanning Force Microscopy. With Applications to Electric, Magnetic and Atomic Forces*. Oxford University Press, 1994.
- [42] B. Ilic, D. Czaplewski, M. Zalalutdinov, H. G. Craighead, P. Neuzil, C. Campagnolo, and C. Batt. Single cell detection with micromechanical oscillators. *Journal of Vacuum Science and Technology B*, 2001.

- [43] T. Jamieson, R. Bakhshi, D. Petrova, R. Pocock, M. Imani, and A. M. Seifalian. Biological applications of quantum dots. *Biomaterials.*, 2007.
- [44] A. K. Gupta, P. R. Nair, D. Akin, M. R. Ladisch, S. Broyles, M. A. Alam, and R. Bashir. Anomalous resonance in a nanomechanical biosensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, 2006.
- [45] W. U. Wang, C. Chen, K. H. Lin, Y. Fang, and C. M. Lieber. Label-free detection of small-molecule-protein interactions by using nanowire nanosensors. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, 2005.
- [46] D. A. Chang-Yen, D. Myszka, and B. K. Gale. A novel pdms microfluidic spotter for fabrication of protein chips and microarrays. *Journal of Microelectromechanical Systems.*, 2006.
- [47] S. Nie, Y. Xing, G. J. Kim, and J. Simons. Nanotechnology application in cancer. *Annual Review of Biomedical Engineering.*, 2007.
- [48] X. Yu, D. Xu, and Q. Cheng. Label-free detection methods for protein microarrays. *Proteomics.*, 2006.
- [49] P. Englebienne, A. V. Hoonacker, and M. Verhas. Surface plasmon resonance: principles, methods and applications in biomedical sciences. *Spectroscopy.*, 2003.
- [50] V. Venugopal. Biosensors in fish production and quality control. *Biosensors and Bioelectronics.*, 2002.
- [51] P.D. Patel. (bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. *Trends in Analytical Chemistry.*, 2002.
- [52] R. H. Hall. Biosensor technologies for detecting microbiological food-borne hazards. *Microbes and Infection.*, 2002.
- [53] D. Ivnitski, I. Abdel-Hamid, P. Atanasov, and E. Wilkins. Biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Biosensors and Bioelectronics.*, 1999.
- [54] P. Leonard, S. Hearty, J. Brennan, L. Dunne, J. Quinn, T. Chakraborty, and R. O’Kennedy. Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. *Review. Enzyme and Microbial Technology.*, 2003.

- [55] R. D. Vaughan, C. K. O'Sullivan, and G. G. Guilbault. Development of a quartz crystal microbalance (qcm) immunosensor for the detection of *listeria monocytogenes*. *Enzyme and Microbial Technology.*, 2001.
- [56] H. Chen and J. M. Barbaree. Effects of physiologic conditions on the rapid detection of salmonella typhimurium with an acoustic wave sensor. *Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology.*, 2002.
- [57] V. Nanduri, I. B. Sorokulova, A. M. Samoylov, A. L. Simonian, V. A. Petrenko, and V. Vodyanoy. Phage as a molecular recognition element in biosensors immobilized by physical adsorption. *Biosensors and Bioelectronics.*, 2007.
- [58] L.B. Sharos, A. Raman, S. Crittenden, and R. Reifengerger. Enhanced mass sensing using torsional and lateral resonance microcantilevers. *Applied physics Letters.*, 2004.
- [59] Nickolay V. Lavrik and Panos G. Datskos. Femtogram mass detection using photothermally actuated nanomechanical resonators. *Applied Physics Letters.*, 2003.
- [60] Mitsumasa Nishio, Shintaro Sawaya, Seiji Akita, and Yoshikazu. Nakayama. Carbon nanotube oscillator towards zeptogram detection. *Applied Physics Letters.*, 2005.
- [61] Philippe Poncharal, Z. L. Wang, Daniel Ugarte, and Walt A. De Heer. Electrostatic deflections and electromechanical resonances of carbon nanotubes. *Science.*, 1999.
- [62] A. ElAmin. Nanocantilevers studied for quick pathogen detection. Technical report, <http://www.foodProductiondaily.com>, 2006.
- [63] D. Maraldo, K. Rijal, G. Campbell, and R. Mutharasan. Method for label-free detection of femtogram quantities of biologics in flowing liquid samples. *Analytical Chemistry.*, 2007c.
- [64] B. Ilic, D. Czaplewski, H. G. Craighead, P. Neuzil, C. Campagnolo, and C. Batt. Mechanical resonant immunospecific biological detector. *Applied Physics Letters.*, 2000.

- [65] GA Campbell and R. Mutharasan. A method of measuring escherichia coli o157:h7 at 1 cell/ml in 1 liter sample using antibody functionalized piezoelectric-excited millimeter-sized cantilever sensor. *Environ. Sci. Technol.*, 2007a.
- [66] J Zhang and HF. Ji. An anti e-coli o157 : H7 antibody-immobilized microcantilever for the detection of escherichia coli (e-coli). *Analytical Sciences.*, 2004.
- [67] GA. Campbell and R. Mutharasan. Detection of bacillus anthracis spores and a model protein using pemc sensors in a flow cell at 1 ml/min. *Biosensors and Bioelectronics.*, 2006b.
- [68] GA. Campbell and R. Mutharasan. Piezoelectric-excited millimeter-sized cantilever (pemc) sensors detect bacillus anthracis at 300 spores/ml. *Biosensors and Bioelectronics.*, 2006c.
- [69] AP. Davila, J. Jang, AK. Gupta, T. Walter, A. Aronson, and R. Bashir. Microresonator mass sensors for detection of bacillus anthracis sterne spores in air and water. *Biosens. Bioelectron.*, 2007.
- [70] Q. Zhu, WY. Shih, and W-H. Shih. Real-time, label-free, all-electrical detection of salmonella typhimurium using lead titanate zirconate/gold-coated glass cantilevers at any relative humidity. *Sensors and Actuators B: Chemical.*, 2007b.
- [71] Q. Zhu, WY. Shih, and W-H. Shih. In-situ, in-liquid, all-electrical detection of salmonella typhimurium using lead titanate zirconate/gold-coated glass cantilevers at any dipping depth. *Biosensors and Bioelectronics.*, 2007a.
- [72] BL. Weeks, J. Camarero, A. Noy, AE. Miller, L. Stanker, and JJ. De Yoreo. A microcantilever-based pathogen detector. *Scanning.*, 2003.
- [73] Sheng-Yu Peng, Muhammad S. Qureshi, Paul E. Hasler, Arindam Basu, and F. Levent Degertekin. A charge-based low-power high-snr capacitive sensing interface circuit. *IEEE Transactions on Circuits and Systems I: Regular Papers*, 2008.

- [74] Neal A. Hall, Baris Bicen, M. Kamran Jeelani, Wook Lee, Shakeel Qureshi, F. Levent Degertekin, and Murat Okandan. Detection, micro-machined microphones with diffraction-based optical displacement. *J. Acoust. Soc. Am.*, 2005.
- [75] Julien Arcamone, Bertrand Misischi, Francisco Serra-Graells, Marc A. F. van den Boogaart, Jürgen Brugger, Francesc Torres, Gabriel Abadal, Núria Barniol, and Francesc Pérez-Murano. A compact and low-power cmos circuit for fully integrated nems resonators. *IEEE Transactions on Circuits and Systems II: Express Briefs*, 2007.
- [76] F.M. Battiston, J.-P. Ramseyer, H.P. Lang, M.K. Baller, Ch. Gerber, J.K. Gimzewski, E. Meyer, and H.-J. Güntherodt. A chemical sensor based on a microfabricated cantilever array with simultaneous resonance-frequency and bending readout. *Sensors and Actuators B.*, 2001.
- [77] L. Moreno-Hagelsieb, Y. Nizet, X. Tang, J.-P. Raskin, D. Flandre, and L. A. Francis. Cmos compatible anodic al₂o₃ based sensors for bacteria detection. *Science Direct. Procedia Chemistry*, 2009.
- [78] Cha Misun, Shin Jaeha, Kim June-Hyung, Kim Ilchaek, Choi Junbo, Lee Nahum, Kim Byung-Gee, and Lee Junghoon. Biomolecular detection with a thin membrane transducer. *Lab Chip.*, 2008.
- [79] Tae June Kang, Dong-Kwon Lim, Jwa-Min Namb, and Yong Hyup Kim. Multifunctional nanocomposite membrane for chemomechanical transducer. *Sensors and Actuators B: Chemical.*, 2010.
- [80] NanoFab. <http://www.nanofab.ualberta.ca>. Technical report, University of Alberta, 2011.
- [81] M. H. Zwietering, I Jongenburger, F. M. Rombouts, and K. van'T Riet. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990.
- [82] Raúl Romero Cabello. *Microbiología Y Parasitología Humanas*. Médica Panamericana, 2007.
- [83] N. Nugaeva, K. Y. Gfeller, N. Backmann, H. P. Lang, M. Düggelin, and M. Hegner. Micromechanical cantilever array sensors for selective

- fungual immobilization and fast growth detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005.
- [84] K. Y. Gfeller, N. Nugaeva, and M. Herner. Micromechanical oscillators as rapid biosensor for the detection of active growth of escherichia coli. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005.
- [85] A. Bietsch, J. Zhang, M. Hegner, H.P. Lang, and C. Gerber. Rapid functionalization of cantilever array sensors by inkjet printing. *Nanotechnology*, 2004.