

POTENCIAL DE LOS CAMPOS ELÉCTRICOS PARA LA MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS

FLAVIO HUMBERTO FERNÁNDEZ MORALES.

Profesor

*Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Sede Duitama.
GRUPO GEANT (Grupo de Energía y Aplicación de Nuevas Tecnologías)
flavio@duitama.uptc.edu.co*

JULIO ENRIQUE DUARTE

Profesor

*Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Sede Duitama.
GRUPO GEANT (Grupo de Energía y Aplicación de Nuevas Tecnologías)
julioenriqueduarte@latinmail.com*

JOSEP SAMITIER MARTÍ

Profesor

*Departamento de Electrónica
Universitat de Barcelona
samitier@el.ub.es*

RESUMEN

*En el presente artículo se ilustra el potencial que tienen los campos eléctricos no uniformes para la manipulación de micropartículas. Para ello se presentan los principios físicos que rigen el movimiento de partículas eléctricamente neutras cuando son sometidas a campos eléctricos inhomogéneos, generando fenómenos tales como la dielectroforésis común (DEP), dielectroforésis de onda viajera (TWD) y la electrorotación (ROT). Además se presentan algunos resultados de la verificación experimental de una microestructura en espiral, fabricada en tecnología CMOS, cuya prueba se hizo con microesferas de poliestireno de 6 μm de diámetro. Por último se ilustra la manipulación de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* mediante electrodos de platino que inducen en ellas el fenómeno de dielectroforésis común.*

PALABRAS CLAVE: Dielectroforésis, levaduras, manipulación de micropartículas, circuitos integrados

ABSTRACT

*This paper shows the potential of non-uniform electric fields to manipulate micro-particles. This was carried out by presenting the physical principles which rule the movement of electrically neutral particles when they are subjected to non-homogeneous electric fields, originating phenomena such as common dielectrophoresis (DEP), traveling-wave dielectrophoresis (TWD) and electro-rotation (ROT). Furthermore some experimental results are shown in a spiral CMOS microstructure which was tested employing polystyrene micro-spheres of 6 μm in diameter. Finally, the *Saccharomyces cerevisiae* manipulation was shown by means of platinum electrodes which induce common dielectrophoresis on the yeast cells.*

KEY WORDS: Dielectrophoresis, yeast cells, microparticle manipulation, integrated circuits

INTRODUCCIÓN

La manipulación de objetos biológicos, que constituye una operación única en muchos procesos biotecnológicos como son la fusión de células y la manipulación genética, es un campo de investigación muy activo e importante.

En las técnicas convencionales las células son tratadas como una masa suspendida dentro de un medio. Ya que las células generalmente son frágiles y tienen dimensiones en el rango de las micras, las herramientas mecánicas convencionales son demasiado grandes y rígidas para realizar una manipulación eficiente.

En los últimos 25 años se ha invertido una gran cantidad de trabajo en ingeniería para desarrollar microherramientas manipuladoras de micropartículas, lo cual implica la fabricación de dispositivos con tamaños similares a los de las partículas que se quieren manejar, normalmente entre 1 y 100 μm o menos si lo que se desean manipular son virus, bacterias o fragmentos de ADN [1]. Hoy en día los tamaños y niveles de precisión requeridos solo se pueden lograr utilizando tecnología de microsistemas.

Se han desarrollado técnicas libres de contacto utilizando campos eléctricos y fuerzas ópticas para la caracterización y el manejo de partículas biológicas. La alternativa óptica ha permitido el desarrollo de las también llamadas pinzas láser de un solo haz, que aprovechan la presión óptica para atrapar y transportar células individuales. Esta técnica tiene la ventaja de que no requiere la fabricación de electrodos pero, por el contrario, puede causar daño mecánico a las biopartículas y se necesita gran cantidad de tiempo para ejecutar la operación deseada [2].

Cuando el método electrostático es empleado para la manipulación de células tiene la ventaja inherente de no requerir partes mecánicas móviles. Además, es más adecuado para la miniaturización ya que solo se necesita la integración de electrodos.

El método electrostático involucra dos fenómenos. El primero es la electroforésis, la cual utiliza voltajes DC para conseguir la migración de partículas cargadas dentro de una solución. Se debe tener especial cuidado con la disociación electrolítica que se puede presentar en la interface electrodo-solución. El segundo fenómeno es la dielectroforésis que es más adecuado ya que la disociación electrolítica se evita empleando señales de alta frecuencia.

El término dielectroforésis (DEP) fue utilizado por primera vez por Pohl en 1951 para describir el movimiento de materia causado por los efectos de la polarización en un campo eléctrico no uniforme [3]. Éste fenómeno ha sido la base de una gran cantidad de aplicaciones en biotecnología y biomedicina, entre ellas podemos mencionar: caracterización de partículas artificiales y biopartículas [4], dispositivos de fusión celular [5], separación de partículas sobre la base de la polarizabilidad diferencial [6], recolección de partículas [7], cultivo de células sobre superficies blindadas por campo eléctrico [8], registros de desplazamiento y deflectores de biopartículas [9], y manipulación de partículas en términos de movimiento lineal y posicionamiento [10], levitación [11], atrapado en jaulas de campo eléctrico [12], y movimiento de líquidos [13].

Los fenómenos electrocinéticos de partículas asociados con campos eléctricos no uniformes son: la DEP común o convencional, la electrorotación (ROT) y la dielectroforésis de onda viajera (TWD). Todos ellos tienen el mismo principio físico: interacción de un campo eléctrico no uniforme con partículas dieléctricas no cargadas. Sin embargo varían en aspectos como la forma de los electrodos, las señales de alimentación empleadas para producir el campo y el objetivo final en la aplicación del dispositivo. Así, mientras que las técnicas de DEP y ROT son más adecuadas en la caracterización de partículas y el blindaje de superficies para prevenir la adhesión de células, la TWD ofrece ventajas para el movimiento, separación y posicionamiento de partículas. Hoy en día la mayoría de las aplicaciones emplean técnicas de fabricación basadas en la fotolitografía, en la deposición de electrodos sobre sustratos de silicio o vidrio y en el micromecanizado y el pegado del silicio para conformar las microestructuras.

Ante este panorama, el presente artículo se centra en la descripción de los conceptos básicos, ecuaciones y parámetros que gobiernan el comportamiento dielectroforético de las biopartículas. Igualmente, se presentan algunos de los resultados más relevantes obtenidos en la prueba de dos circuitos integrados: uno fabricado con tecnología CMOS y el otro con tecnología de microsistemas, los cuales fueron ensayados con micropartículas de poliestireno y levaduras, respectivamente.

CONCEPTOS BÁSICOS

Antes de explicar los principios físicos es necesario hablar a cerca de la estructura real de un dispositivo basado en el fenómeno DEP.

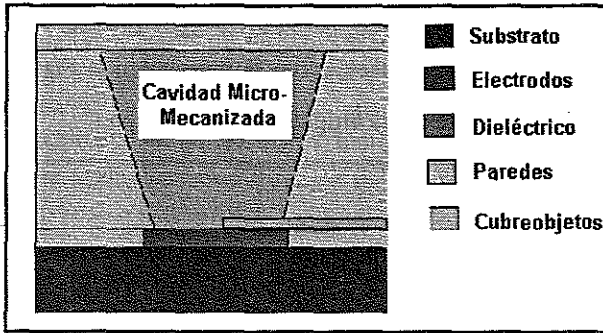


Figura 1. Corte transversal de una cámara DEP típica.

Como se muestra en la Figura 1, el montaje experimental normalmente requiere de los siguientes componentes:

- Medio de Cultivo: Es el líquido o solución acuosa, cuya permitividad relativa y conductividad están bien determinadas, que sirve para contener las partículas que serán sometidas a estudio. Normalmente se coloca sobre los electrodos con una micropipeta y queda confinado en una "piscina" que usualmente está micromecanizada en silicio y pegada al substrato.
- Partículas: Pueden ser microesferas artificiales de látex o poliestireno, empleadas para ensayar los dispositivos, o biológicas que incluyen células animales o vegetales, bacterias, virus y fragmentos de ADN entre otras. En otras palabras, serán el objeto bajo estudio cuyo comportamiento se desea determinar.
- Sistema de Electrodo: Será el encargado de generar el campo eléctrico no uniforme requerido para lograr el movimiento de las partículas suspendidas en el líquido. Usualmente se crecen en substratos de vidrio o silicio y se configuran mediante métodos fotolitográficos. Para evitar la formación de burbujas en la interface electrodo-medio, se puede crecer una capa delgada de dieléctrico entre ellos. Adicionalmente, para reducir los cambios fisiológicos inducidos en las biopartículas por los materiales usados para su manejo, se suelen utilizar metales biocompatibles como oro, titanio, cromo, paladio, níquel u otros parecidos [14].

Partículas en Campos Uniformes de Corriente Continua

Si un campo eléctrico de intensidad uniforme se aplica a un sistema formado por una partícula suspendida en un medio acuoso se presentarán, al menos, tres fenómenos: las partículas se mueven, la doble capa electrónica que rodea a la partícula se verá distorsionada y se inducirán cargas eléctricas en la interface que define la estructura de la partícula [15].

El movimiento lateral de las partículas muchas veces se debe a que éstas tienen una carga neta Q en su superficie. Cuando se expone a un campo eléctrico E , una partícula cargada experimentará una fuerza $F(F=QE)$ la cual genera un movimiento conocido como electroforésis. Éste fenómeno ha sido ampliamente explotado por los investigadores para determinar las propiedades de la superficie de las células [16].

Cuando está suspendida en un electrolito, una partícula que posee una carga eléctrica neta atraerá a su alrededor iones de polaridad opuesta, conformando una doble capa electrónica. Como se muestra en la Figura 2(a), la simetría de ésta doble capa se verá distorsionada ante la presencia de un campo eléctrico. Además, normalmente las propiedades eléctricas de las partículas serán diferentes a las del medio de suspensión. Como resultado de esto, la acción de aplicar un campo eléctrico también inducirá la aparición de cargas eléctricas en el límite que separa la partícula y el medio circundante, tal como se representa en la Figura 2(b).

La distorsión de la doble capa electrónica y la creación de las cargas interfaciales de Maxwell-Wagner hacen que la partícula se comporte como un dipolo. Las magnitudes de estos momentos dipolares inducidos es mucho mayor que las asociadas normalmente con las moléculas porque, aunque el valor de las cargas involucradas no es muy grande, la distancia entre cargas de polaridad opuesta si lo es.

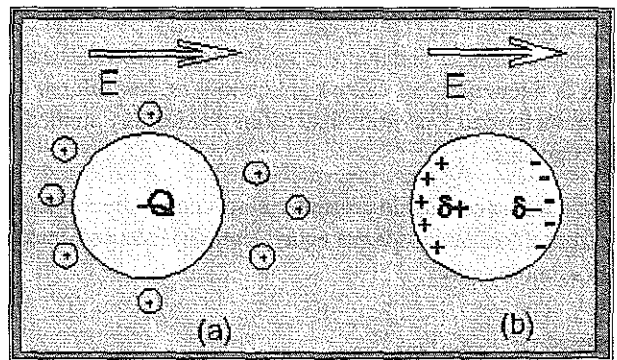


Figura 2. (a) Distorsión de la doble capa electrónica causada por la aplicación de un campo eléctrico E . (b) Cargas interfaciales inducidas en los límites de la partícula.

Si el campo DC se reemplaza por uno de corriente alterna (AC), la influencia del efecto electroforético se irá desvaneciendo para frecuencias por encima de 1 KHz, a causa de la inercia de la partícula. Así mismo, la distorsión de la doble capa electrónica tiene un tiempo de relajación finito y empezará a ser despreciable para frecuencias superiores a 50 KHz. Sin embargo, los momentos dipolares asociados con la polarización interfacial de Maxwell-Wagner

podrán ejercer su influencia hasta frecuencias del orden de 50 MHz.

Para una partícula esférica de radio r y permitividad compleja ε_p^* , suspendida en un medio con permitividad relativa compleja ε_m^* e interactuando con un campo eléctrico de intensidad E , la magnitud de su momento dipolar m originado por las cargas interfaciales viene dado por [17]:

$$m = 4\pi\varepsilon_0\varepsilon_m \frac{(\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*)}{(\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*)} r^3 E \quad (1)$$

Donde $\varepsilon_0 = 8.854 \times 10^{-12}$ (Farad m^{-1}) es la permitividad del vacío. Las permitividades complejas tienen en cuenta el hecho de que tanto las partículas como el medio de suspensión exhiben propiedades conductoras (perdidas de energía) y dieléctricas (almacenamiento de energía) cuando se exponen a campos eléctricos, y tienen la siguiente forma matemática [18]:

$$\varepsilon^* = \varepsilon_0\varepsilon - j\frac{\sigma}{\omega} \quad (2)$$

Donde ε es la permitividad relativa efectiva, σ es la conductividad efectiva, ω es la frecuencia angular del campo eléctrico aplicado y el símbolo $j = \sqrt{-1}$ indica que la corriente de desplazamiento dieléctrico adelanta a la corriente de conducción en un ángulo de 90° . La evaluación de la Ecuación (1) revela que la magnitud y polaridad del momento dipolar inducido dependen en forma complicada de la frecuencia del campo aplicado y de los valores de conductividad y permitividad de las partículas y su medio circundante.

Otra forma común de presentar el momento dipolar m es utilizando el llamado factor equivalente de Clausius-Mosotti F_{CM} , como sigue:

$$m = 4\pi r^3 \varepsilon_0 \varepsilon_m F_{CM} E \quad (3)$$

El factor de Clausius-Mosotti (F_{CM}) viene dado como [19]:

$$F_{CM} = \frac{(\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*)}{(\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*)} \quad (4)$$

De otro lado, si la polarizabilidad de la partícula excede a la del medio circundante (e.d. $|\varepsilon_p^*| > |\varepsilon_m^*|$) la distribución de cargas inducidas producirán un momento dipolar con el mismo sentido del campo aplicado, tal como se representa

en la Figura 3(a). Pero si se cumple la condición opuesta (e.d. $|\varepsilon_p^*| < |\varepsilon_m^*|$) entonces, como se muestra en la Figura 3(b), el momento estará dirigido contra el campo.

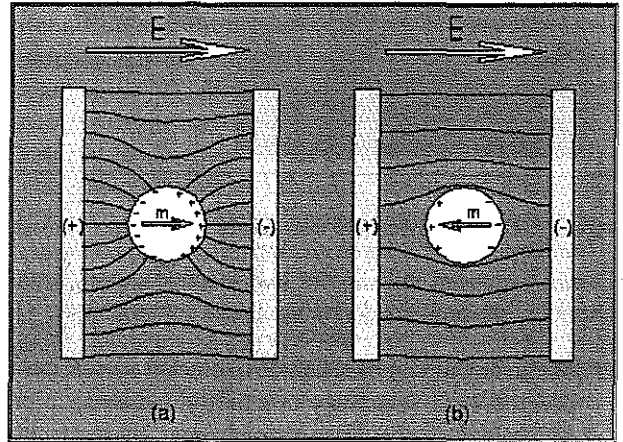


Figura 3. Distribución de cargas eléctricas inducidas en la superficie de la partícula y la dirección del momento dipolar resultante m para cuando: (a) la polarizabilidad de la partícula excede a la del medio, y (b) la partícula es menos polarizable que el medio.

Las ecuaciones descritas anteriormente proveen la base para entender como los campos AC se pueden emplear para el manejo de biopartículas aprovechando fenómenos como la DEP, ROT y TWD.

Dielectroforésis Común

La DEP se define como el movimiento lateral impartido sobre partículas no cargadas como resultado de la polarización inducida por campos eléctricos no uniformes. Éste movimiento puede ser dirigido hacia o desde el máximo del campo eléctrico, dependiendo de las propiedades eléctricas de las partículas y el medio.

Como se dijo en la sección anterior, la DEP se origina por la interacción entre campos eléctricos no uniformes y las cargas inducidas en la superficie de las partículas. Esta distribución de carga tendrá cantidades iguales de cargas positivas y negativas. El campo eléctrico alineará a los dipolos con respecto a él. Como el campo es no uniforme, un extremo del dipolo estará en una región más débil que el otro, lo cual originará una fuerza neta que afectará tanto a dipolos inducidos como permanentes, y los obligará a moverse acercándose o alejándose de la región con mayor densidad de campo. La dirección de movimiento viene determinada por la polaridad del factor de Clausius-Mosotti.

Los campos eléctricos mostrados en la Figura 3 son generados utilizando un par de electrodos de placas paralelas, de manera que en ausencia de partículas el campo

será uniforme, despreciando los efectos de borde en los extremos de las placas. Debido a la simetría del sistema, no existirá ninguna fuerza neta ejercida sobre la partícula. Sin embargo, la situación cambia cuando las partículas se someten a un campo eléctrico no uniforme, como se muestra en la Figura 4.

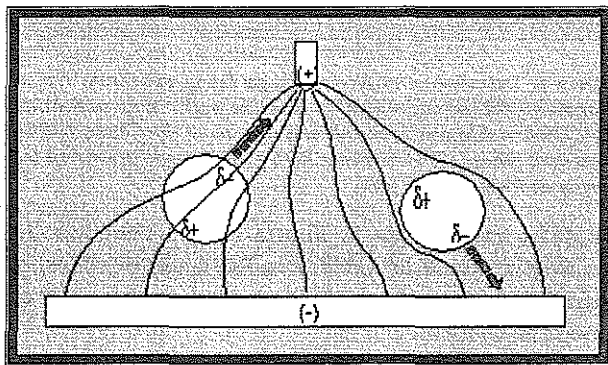


Figura 4. Dos partículas diferentes dentro de un campo eléctrico no uniforme. La partícula de la izquierda es más polarizable que el medio y es atraída hacia la parte más intensa del campo que está alrededor de la punta (p-DEP), mientras que la partícula menos polarizable de la derecha es dirigida lejos de la región más intensa (n-DEP) [20].

La fuerza eléctrica total actuante sobre una partícula de carga neta Q en un campo no uniforme E es:

$$F = QE + (m\nabla)E \quad (5)$$

Donde ∇ es el operador vectorial gradiente. Si la partícula está descargada (e.d. $Q = 0$) o para frecuencias superiores a 1 KHz, donde los efectos de la electroforésis son despreciables, el término del lado derecho de la ecuación (5) será dominado por el momento dipolar y por el gradiente del campo, de manera que la fuerza DEP estará dada por [21]:

$$F_{DEP} = 2 \pi \epsilon_0 \epsilon_m r^3 \text{Re}[F_{CM}] \nabla |E|^2 \quad (6)$$

Donde $\text{Re}[F_{CM}]$ indica la parte real del factor de Clausius-Mosotti.

De la ecuación (6) se ve que la FDEP depende del tamaño de la partícula, de su forma y de la magnitud del grado de no-uniformidad del campo eléctrico aplicado. Además, el sentido de la fuerza depende de la polaridad del momento dipolar inducido, el cual a su vez está determinado por las conductividades y permitividades de la partícula y el medio respectivamente. A diferencia de la electroforésis, el movimiento DEP es independiente de la polaridad del campo.

Electrorrotación

Tal y como lo describió Pohl en [21], algunas veces los campos eléctricos no uniformes pueden inducir un torque sobre las partículas haciéndolas rotar. Con la configuración adecuada de los electrodos es posible atrapar partículas en jaulas o trampas de campo eléctrico [22]. También es posible levitar las partículas por efecto de la n-DEP y, si el campo es rotatorio, hacer que giren. A éste fenómeno se le conoce como electrorrotación (ROT) y aprovechando los espectros de electrorrotación se pueden determinar las características eléctricas de las partículas (conductividad y permitividad). En el caso de las células a partir de su espectro de ROT se pueden establecer su estado fisiológico (viabilidad), edad y composición entre otras cosas [23].

Los campos eléctricos rotatorios se pueden generar utilizando configuraciones como la mostrada en la Figura 5, donde los electrodos se alimentan con cuatro voltajes sinusoidales de igual magnitud, desfasados entre sí 90° . En forma general se pueden emplear n electrodos con desplazamientos de fase (en la señal de alimentación) de $360^\circ/n$ y con formas de electrodos muy variadas, desde electrodos planares hasta conductores puntiagudos [24].

Los espectros de electrorrotación se obtienen graficando la velocidad y el sentido de rotación originados por el torque inducido por el campo, como función de la frecuencia del voltaje aplicado. El análisis de éstos espectros permite determinar las características eléctricas de los diversos componentes celulares (citoplasma, núcleo, etc.), las propiedades superficiales de las partículas o el efecto de agentes de ensayo que alteran las partículas bajo prueba [25].

La manera controlada de inducir el spin celular es mediante campos eléctricos rotatorios, y la geometría polinomial puede servir para efectuar casi simultáneamente medidas de DEP y ROT [26]. Al generar un campo rotatorio E , se ejercerá un torque Γ sobre la partícula, el cual viene dado por [27]:

$$\Gamma = m \times E \quad (7)$$

En el caso de partículas esféricas, homogéneas, isotrópicas y linealmente polarizables, su torque rotacional está dado por:

$$\Gamma = -4 \pi \epsilon_0 \epsilon_m r^3 \text{Im}[F_{CM}] E^2 \quad (8)$$

El símbolo Im representa la parte imaginaria del factor de Clausius-Mosotti, el cual determina la velocidad y el sentido de la electrorrotación inducida. Así, si el componente imaginario de m es positivo, en la Ecuación (8) se ve que el torque será negativo y hará que la partícula rote en sentido opuesto al del campo eléctrico y viceversa. Una explicación más intuitiva del fenómeno se da en la Figura 5(b).

Para que se presente el fenómeno ROT debe existir n-DEP ya que en presencia de p-DEP las partículas serán atraídas hacia el borde de los electrodos enganchándose a ellos sin poder rotar.

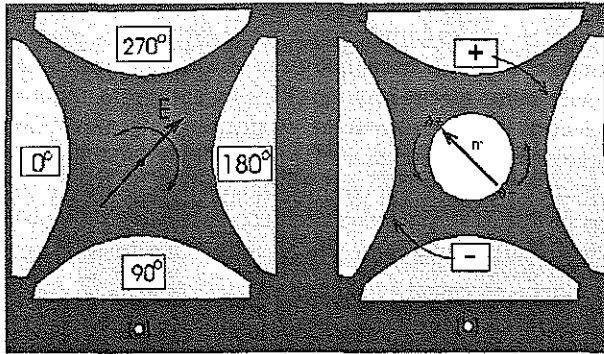


Figura 5. (a) Un campo rotatorio se puede generar entre cuatro electrodos aplicando voltajes sinusoidales desfasados 90° entre sí. (b) Dependiendo del ángulo de fase del momento dipolar inducido, ver ecuación (9), el torque rotacional actuante sobre la partícula podrá ir en la misma dirección o en dirección opuesta al campo. En el caso mostrado aquí, y como resultado de los efectos de repulsión de las cargas, la partícula rotará en sentido contrario al del campo.

El ángulo de fase entre el campo aplicado y el momento dipolar inducido está dado por:

$$\tan(\varphi) = \frac{\text{Im}(m)}{\text{Re}(m)} \tag{9}$$

Cuando el factor $\text{Im}(m)$ es positivo (para ángulos entre 0° y +180°), y de acuerdo con la ecuación (8), la partícula rotará en sentido anti-campo, mientras que si $\text{Im}(m)$ es negativo (para valores entre 0° y -180°), la rotación será co-campo.

En geometrías de electrodos simétricos, como la mostrada en la Figura 5, el campo eléctrico rotatorio es uniforme en la parte central de la estructura y el comportamiento electrorotacional estará descrito por la Ecuación (8). Sin embargo, cerca de los bordes de los electrodos tanto las fuerzas DEP como ROT afectan el comportamiento cinemático de las partículas, o en otras palabras, las propiedades electrocinéticas de las partículas estarán influidas tanto por la componente real como la imaginaria del momento dipolar inducido. La dependencia con la frecuencia de estas dos componentes se muestra en la Figura 6 para casos modelo de células con la membrana intacta y no viables (con membranas débiles). Lo interesante es que los máximos de frecuencia y los puntos de cruce por cero son únicos para cada tipo de partícula, y de ellos se puede extraer información útil.

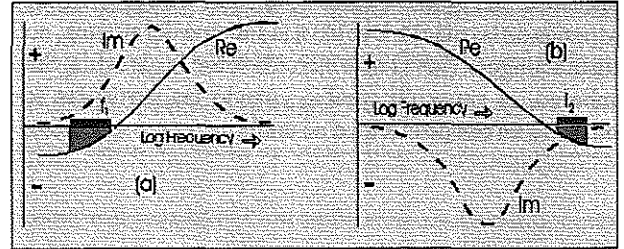


Figura 6. Variaciones en frecuencia de las componentes real e imaginaria del momento dipolar inducido para casos modelo de (a) Célula viable con la membrana intacta, y (b) Célula con la membrana porosa. El movimiento ROT y TWD puede ocurrir en los rangos de frecuencias f_1 y f_2 .

Como se muestra en la Figura 6, hay ventanas de frecuencia donde la TWD y la ROT son posibles, y corresponden a regiones donde también se presenta el fenómeno de n-DEP.

Dielectroforésis de Onda Viajera

El arreglo de electrodos lineales con la configuración adecuada y alimentados con la secuencia apropiada de voltajes, se puede utilizar para generar ondas de campo eléctrico viajero, que al interactuar con las partículas dentro de una suspensión, causarán su desplazamiento, ver Figura 7.

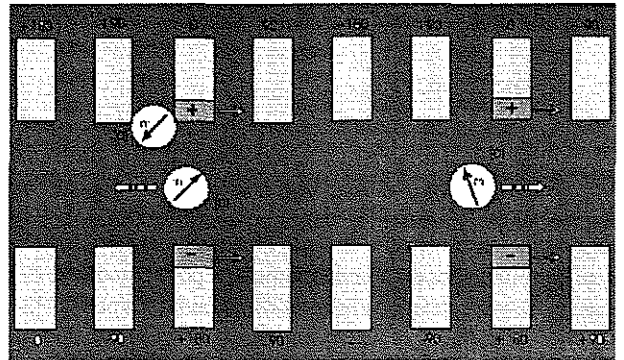


Figura 7. Campo eléctrico viajero de izquierda a derecha producido por electrodos energizados con voltajes cosenoidales cuya relación de fases se indica. (a) Movimiento esperado de una célula viable (f_1 en Figura 6). (b) Célula atrapada por p-DEP. (c) Movimiento de una célula no viable (f_2 en Figura 6).

A éste fenómeno de movimiento translacional de materia se le conoce como dielectroforésis de onda viajera (TWD) y es muy útil en aplicaciones de movimiento lineal, separación y transporte de partículas. Los electrodos interdigitados castellados de la Figura 7 son alimentados por voltajes cuya distribución se repite periódicamente cada cuatro electrodos, y además tienen la ventaja de que pueden ser tan largos como lo requiera la aplicación [28].

Diversos autores han encontrado que la TWD es un fenómeno en esencia de características electrorotacionales, donde la fuerza TWD que afecta a la partícula es proporcional a la componente imaginaria (o fuera de fase) del momento dipolar inducido y, en últimas, a la parte imaginaria del factor de Clausius-Mosotti. Cabe recordar que el F_{CM} es una función compleja debido a que las partículas reales exhiben propiedades conductoras y dieléctricas, como se indicó en la Ecuación (2).

En el caso específico de la Figura 8, se ha encontrado que la fuerza generada en el centro del canal interelectródico se puede describir como [29]:

$$F_{DEP} = \frac{-4 \pi \epsilon_0 \epsilon_m r^3 \text{Im}[F_{CM}] E^2}{\lambda} \quad (10)$$

Donde E es la intensidad del campo eléctrico a través del canal y λ la distancia periódica entre electrodos de la misma fase. Lejos del centro del canal y cerca de las puntas de los electrodos, el comportamiento electrocinético de las partículas es más complicado que el descrito por la Ecuación (10), ya que en estas regiones también influye la componente real del momento dipolar.

Las aplicaciones potenciales del efecto de los campos eléctricos viajeros para la manipulación y separación de biopartículas surgen gracias a las variaciones con respecto a la frecuencia de las partes real e imaginaria del momento dipolar inducido, como se muestra en la Figura 6. La situación ideal reflejada en la Figura 6(a) corresponde a una célula viable suspendida en un medio acuoso de baja conductividad. A bajas frecuencias (típicamente menores a 10 KHz), la membrana lípida citoplásmica representa una barrera resistiva al campo aplicado. La situación mostrada en la Figura 6(b) ocurre cuando la partícula es menos polarizable que el medio circundante de manera que exhibirá n-DEP [30]. Así, cuando la frecuencia se incrementa por encima de 100 KHz, la reactancia capacitiva de la membrana empezará a cortocircuitar a su resistencia y el campo podrá penetrar en el citoplasma conductor, de modo que la partícula aparecerá como más polarizable que el medio circundante y ocurrirá p-DEP. Como la DEP está determinada por la componente real del momento dipolar inducido esto significa que $Re(m)$ se incrementará con el aumento de frecuencia y, a causa de los procesos de polarización involucrados, se ve que $Im(m)$ será positivo para el mismo rango de frecuencias [31].

Con respecto a la geometría de electrodos para TWD de la Figura 7, las células solo serán empujadas al centro del canal si experimentan n-DEP, de otra manera serán

atrapadas por los electrodos como consecuencia de la p-DEP (como la partícula b en la Figura 7). En la Ecuación (10) también se ve que la velocidad de desplazamiento de la partícula por el centro del canal es proporcional al valor de $Im(m)$. De acuerdo con ésta consideración, así como con la Ecuación (10) y la Figura 6(a), las células viables se moverán en sentido contrario al de la onda de campo viajero dentro de la ventana de frecuencias f_1 ; de otro lado, la partícula levitará sobre el plano de los electrodos para ($f < f_1$) o quedarán atrapadas en ellos para ($f > f_1$).

Para el caso de células no viables, las cuales tienen su membrana lípida físicamente dañada haciéndola porosa a los iones, no representan una gran barrera resistiva al campo eléctrico aplicado y para bajas frecuencias las células experimentarían p-DEP. Los iones también se filtrarán desde el citoplasma hacia el medio circundante y, para frecuencias altas (iguales o superiores a 1 MHz), las estructuras lípidas y proteínicas de la célula se comportarán en términos dieléctricos como "espacios muertos". El volumen ocupado por la célula aparecerá como menos polarizable que el medio de suspensión débilmente conductor y, cuando se alcanzan éstas frecuencias, la partícula presentará n-DEP. Así, el parámetro $Re(m)$ decae con el incremento de frecuencia, y de consideraciones teóricas se puede deducir que $Im(m)$ es negativo dentro de éste rango y el movimiento será en la misma dirección de la onda de campo viajero, dentro de la ventana de frecuencias f_2 (Figura 6b) [31].

Microestructura CMOS en Espiral para Aplicaciones TWD

A continuación se presentan algunos resultados obtenidos con una microestructura CMOS en espiral para aplicaciones TWD que fue probada con micropartículas de poliestireno.

La cámara TWD está formada por 4 electrodos de aluminio, arrollados en espiral, con 5 mm de ancho y 7 mm de separación como se muestra en la Figura 8. Los electrodos fueron crecidos en la capa de metal del proceso CMOS llevado a cabo en el Centro Nacional de Microelectrónica (CNM) de Barcelona, España. Las estructuras en espiral son típicas en aplicaciones TWD ya que con ellas se pueden generar ondas viajeras sobre una gran superficie empleando una sola capa de metal, sin necesidad de procesado adicional.

La señal de alimentación se obtuvo combinando un generador Hewlett Packard y un circuito de diseño propio que permite disponer de 4 señales bipolares desfasadas entre sí 90°. Como partículas de prueba se usaron microesferas monodispersas de poliestireno (Polysciences Europe GmbH). Antes de aplicar la solución con una micropipeta sobre los electrodos, esta fue sometida a la

acción de un agitador ultrasónico durante tres minutos, para mantener las microesferas en su estado monodisperso. El comportamiento de las partículas se grabó en una cinta de vídeo para su posterior análisis y se observó a través de un estereomicroscopio Karl Zeiss, con una cámara Sony adaptada a él.

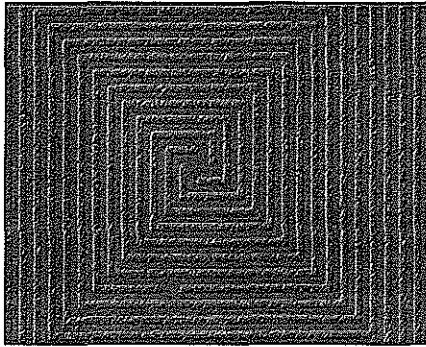


Figura 8. Región central de los microelectrodos. El ancho característico de las pistas es de 5 mm.

Al aplicar la señal de alimentación se observa que las partículas ubicadas en la parte central de los brazos de la espira presentan un desplazamiento lineal, alejándose o acercándose al centro de la estructura según el brazo en el que se encuentren ubicadas. Al invertir la secuencia de alimentación de los electrodos también se invierte el sentido de desplazamiento de las partículas. La velocidad promedio de este movimiento es de aproximadamente 120 mm s^{-1} . (ver Figura 9). Las partículas que se hallan más próximas a la diagonal siguen una trayectoria parabólica: primero se acercan al centro y, una vez atravesada la diagonal, se alejan de él. Este comportamiento se puede explicar debido a que las esquinas de las espiras presentan el máximo gradiente del campo eléctrico dentro de la estructura, y cualquier partícula desplazándose en sus proximidades sufrirá un cambio brusco en su dirección de movimiento. Después de cada medida la microestructura se limpió con un baño ultrasónico de agua destilada durante 5 minutos. Este procedimiento permite reciclar cada dispositivo hasta 3 veces sin percibir alteraciones en su funcionamiento.

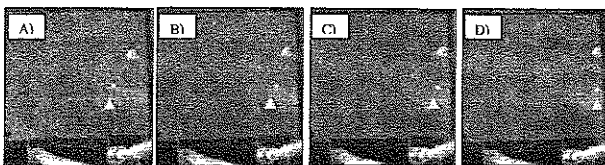


Figura 9. Secuencia del movimiento de aglomerados de partículas en dos brazos de la espira. La tensión aplicada fue de $\pm 4.5 \text{ V}$ y 190 KHz , con una conductividad de la solución de 1.26 mS m^{-1} . Los cuadros fueron capturados cada 0.5 s [32].

En la Figura 9 se muestra una secuencia de cuatro imágenes, capturadas cada 0.5 s , en las cuales se observa el camino seguido durante el desplazamiento de un aglomerado de partículas de poliestireno. Valga decir que las imágenes corresponden a una vista superior de la estructura CMOS y que la dificultad de su visualización radica en que las partículas levitan a una cierta altura sobre la superficie, haciendo necesario un cambio con respecto al plano inicial de enfoque.

Uno de los principales problemas presentados es la formación de burbujas en la interface electrodo-solución para frecuencias inferiores a 10 KHz , como se muestra en la Figura 10. Esto es debido a la corriente que fluye entre los electrodos. Una forma de reducir este problema es emplear una capa delgada de dieléctrico, para eliminar el contacto entre el electrodo y el metal.

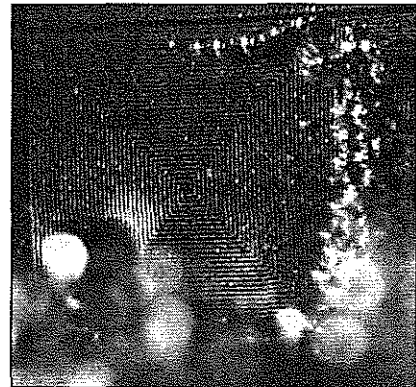


Figura 10. Formación de burbujas sobre la estructura, $s = 1.26 \text{ mS m}^{-1}$ y $\pm 8 \text{ V}$ a 10 KHz .

Con éste experimento se muestran la operatividad y las posibilidades de una microestructura CMOS para el movimiento lineal de microesferas de poliestireno de 6 mm de diámetro. De esta manera, la tecnología CMOS se presenta como una alternativa para el desarrollo de microherramientas para la manipulación de micropartículas, basadas en el fenómeno DEP. Además, el hecho de poder reciclar varias veces un mismo integrado es ventajoso de cara a reducir costos en aplicaciones futuras. Finalmente, la gran ventaja de una microestructura en tecnología CMOS es que se abre la posibilidad de integrar la circuitería de control requerida para configurar un microsistema completo en una sola oblea.

RESULTADOS CON BIOPARTÍCULAS

Con base en la experiencia adquirida con la microestructura CMOS descrita anteriormente, se fabricó un segundo circuito para su utilización con microorganismos. El circuito

integrado y algunos resultados de su prueba se describen a continuación.

Fabricación del Microsistema

En la Figura 1 se mostró el corte transversal de un microsistema que opera bajo el principio de la DEP; dicho esquema sirve como base para entender el circuito integrado aquí descrito. Utilizando la tecnología microelectrónica se diseñaron las máscaras para el depósito de los electrodos de platino sobre una oblea de silicio, que sirve como sustrato. Así mismo, se utilizó el ataque anisotrópico para el micromecanizado de la oblea, lo cual permitió la realización de los canales de entrada y salida de la muestra bajo estudio. El volumen de la cámara para el estudio de la DEP viene delimitado por paredes de silicona, estructuradas a partir de un proceso de depósito sobre toda la oblea, seguido de un proceso de fotocurado selectivo. La extracción de la resina no curada termina con el proceso de delimitación de la microcámara. Finalmente, la estructura se cierra por la parte superior con un cubreobjetos de vidrio para poder visualizar el comportamiento de las partículas. El proceso tecnológico se llevó a cabo en las instalaciones del Instituto de Microelectrónica del CNM en Barcelona.

Como resultado del proceso de fabricación se obtuvo la estructura mostrada en la Figura 11, en la cual se observan las paredes de silicona y se incluye la capa de metal que contiene tres estructuras de electrodos interdigitados castellados (clásicos, desplazados y triangulares) de 50, 70 y 90 mm para estudios de c-DEP (ver Figura 12).

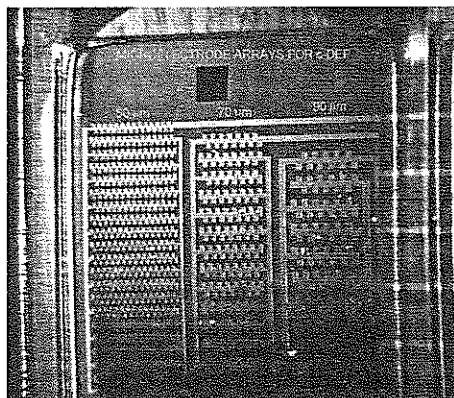


Figura 11. Microestructuras de platino con electrodos interdigitados castellados clásicos y desplazados, así como electrodos en diente de sierra. El fotocurado da como resultado paredes de resina de 800 mm de ancho alrededor del área activa de los electrodos.

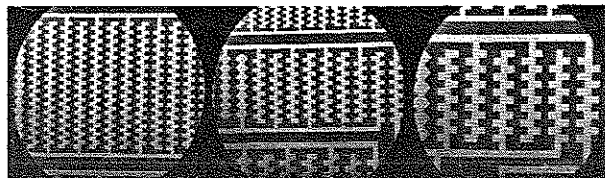


Figura 12. Detalle de los microelectrodos castellados de 50, 70 y 90 mm (de izquierda a derecha).

Resultados con Biopartículas

Para las pruebas con biopartículas se utilizaron levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) como partículas modelo, las cuales fueron provistas por el Departamento de Biología de la Universidad de Barcelona. Los resultados que se describen a continuación se obtuvieron con electrodos castellados y muestran la conveniencia de éstas microestructuras para la manipulación de biopartículas.

Una vez puesta la disolución en la micropiscina, los electrodos de 70 mm se energizaron con 8 V y 20 MHz. Después de unos pocos minutos se observó que las levaduras se concentraban formando agregados en las bahías de los electrodos, así como enfrente de las puntas de los castellados y sobre el centro de la superficie de los mismos, es decir que las partículas fueron conducidas hacia y aglomeradas en los mínimos del campo eléctrico. La Figura 13 muestra levaduras afectadas por n-DEP.

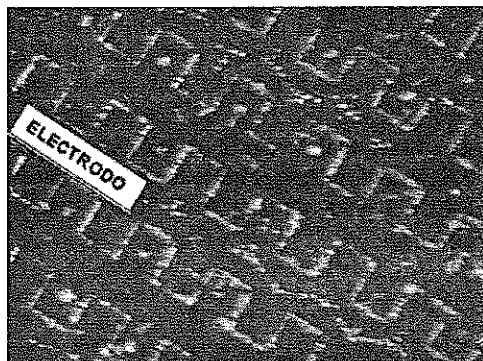


Figura 13. Agregados de *S. cerevisiae* diluidas en agua desionizada ($sm = 26 \text{ mS cm}^{-1}$), afectadas por n-DEP. Se aplicó una señal sinusoidal de 8 V y 20 MHz. Las levaduras (puntos claros) han sido repelidas hacia el espaciado interelectródico y hacia las bahías de los electrodos, lugares donde el campo eléctrico es mínimo.

Al bajar la frecuencia manteniendo constante la amplitud, se llega a un punto en que se observa el movimiento y aglomeración de partículas en las puntas de los electrodos, como se ilustra en la Figura 14. Las células que inicialmente se ubicaron en la parte central de la superficie de los electrodos no fueron afectadas por los cambios en frecuencia.

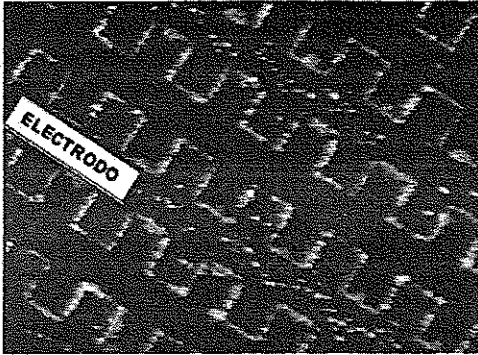


Figura 14. Agregados de *S. cerevisiae* diluidas en agua desionizada ($\sigma = 26 \text{ mS cm}^{-1}$), afectadas por p-DEP. Se aplicó una señal sinusoidal de 8 V y 1.5 MHz. Las levaduras (puntos claros) han sido atraídas hacia los bordes de los electrodos, lugares donde el campo eléctrico es máximo.

En vista de los resultados obtenidos se puede decir que se verificó experimentalmente la n- y p-DEP en levaduras, sobre electrodos de platino crecidos sobre un substrato de silicio. Esto demuestra el potencial que posee la dielectroforésis como fenómeno físico para la manipulación de biopartículas.

CONCLUSIONES

- Los fenómenos electrocinéticos como la dielectroforésis común (DEP), dielectroforésis de onda viajera (TWD) y la electrorrotación (ROT) presentan una excelente alternativa para la manipulación de micropartículas, especialmente cuando estas son de tipo biológico y se debe evitar su contacto con el elemento que las mueve. De otro lado, el proceso de fabricación de herramientas para manipular micropartículas es compatible con la tecnología microelectrónica, ya que estos dispositivos requieren de la integración de electrodos de diversas geometrías para generar los campos eléctricos requeridos.
- En la parte experimental se pudo verificar la funcionalidad de una estructura CMOS para aplicaciones de TWD con partículas de poliestireno de 6 μm de diámetro. Sin embargo, la conductividad de la solución debe mantenerse baja, al igual que el voltaje utilizado, para evitar la electrólisis del fluido.
- Adicionalmente se diseñó y fabricó un circuito integrado con electrodos de platino, para la manipulación de objetos biológicos. Una ventaja de los metales nobles es que su utilización reduce los problemas de biocompatibilidad, evitando alteraciones en las partículas bajo estudio.
- El hecho de haber utilizado una resina fotosensible para fabricar la cavidad que contiene las partículas fue de

enorme ayuda, ya que es posible automatizar el proceso de encapsulado a nivel de oblea y reducir a la vez la intervención de los operarios en la fabricación del circuito.

- Se ha verificado experimentalmente la viabilidad del fenómeno dielectroforético (n- y p-DEP), con levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*). Así, se observó que a bajas frecuencias las levaduras son atrapadas en los bordes de los electrodos, como consecuencia de la p-DEP. A frecuencias altas, las partículas son repelidas hacia los sitios de menor intensidad del campo eléctrico como consecuencia de la n-DEP.
- Por último, el hecho de disponer de una herramienta para la manipulación de micropartículas que aprovecha los procesos de fabricación basados en tecnología microelectrónica, y la cual es sensible a las variaciones en frecuencia de una señal eléctrica, indica que estos dispositivos poseen un enorme potencial para desarrollar soluciones eficientes y de bajo costo, en situaciones que impliquen la manipulación de biopartículas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Samitier J., 1995. Biomedical applications of microsystems. Proceedings of Industrial Applications of Sensors and Microsystems, September 18 - 21, 1995. Barcelona, Spain.
- [2] Nishioka M., Katsura S., Hirano K. and Mizuno A.. 1997. Evaluations of cell characteristics by step-wise orientational rotation using optoelectrostatic micromanipulation. IEEE Trans. on Ind. Appl. 33, 1381 - 1388.
- [3] Pohl H. A.. 1951. The motion and precipitation of suspensions in divergent electric fields. J. of Appl. Phys. 22, 869 - 871.
- [4] Quinn C. M., Archer G. P., Betts W. B. and O'Neill J. G.. 1996. Dose-dependent dielectrophoretic response of *Cryptosporidium* oocysts treated with ozone. Letters in Applied Microbiology 22, 224 - 228.
- [5] Lee S-W, Choi J-H. and Kim Y-K.. 1995. Design of a biological cell fusion device. Transducers'95 - Eurosensors IX. 377 - 380.
- [6] Gascoyne P. R. C., Wang X-B., Huang Y. and Becker F. F.. 1997. Dielectrophoretic separation of cancer cells from blood. IEEE Trans. on Ind. Appl. 33 (3), 670 - 678.
- [7] Pethig R., Huang Y. Wang X-B. and Burt J. P. H.. 1992. Positive and negative dielectrophoretic collection of colloidal particles using interdigitated castellated microelectrodes. J. Phys. D: Appl. Phys. 24, 881 - 888.

- [8] Fuhr G. and Wagner B.. 1994. Electric field mediated cell manipulation in highly conductive culture media. *Micro-system technologies '94 / 4th International Conference on Micro, Electro, Opto, Mechanical Systems and Components*. Berlin, Germany. 407 - 416.
- [9] Washizu M.. 1990. Electrostatic manipulation of biological objects. *Journal of Electrostatics* 25, 109 - 123.
- [10] Wang X-B., Huang Y., Gascoyne P. R. C. and Becker F. F.. 1997. Dielectrophoretic manipulation of particles. *IEEE Trans. on Ind. Appl.* 33 (3), 660 - 669.
- [11] Barrie G., Paul R., Kaler K. and Jones T. B.. 1995. Low-frequency micromotion of DEP-Levitated bioparticles, II: Spectral and stability analysis. *Journal of Colloid and Interface Science* 175, 97 - 107.
- [12] Fuhr G., Müller T., Schnelle T., Hagedorn R., Voigt A. and Fiedler S.. 1994. Radio-frequency microtools for particle and living cell manipulation. *Naturwissenschaften* 81, 528 - 535.
- [13] Cummings E.. 2003. Streaming dielectrophoresis for continuous-flow microfluidic devices. En : *IEEE in Medicine and Biology Magazine* 22, 75 - 84.
- [14] Park J. and Lakes R.. 1992. *Biomaterials: An introduction*. 2nd Edition. Ed. Plenum Press. New York.
- [15] Paul R., Kaler K. V. L. S. and Jones T. B.. 1993. A nonequilibrium statistical mechanical calculation of the surface conductance of the electrical double layer of biological cells and its application to dielectrophoresis. *The Journal of Physical Chemistry* 97 (18), 4745 - 4755.
- [16] Pohl H. A.. 1958. Some effects of nonuniform fields on dielectrics. *J. Appl. Phys.* 29, 1182 - 1188.
- [17] Pohl H. A. and Pethig R.. 1977. Dielectric measurements using non-uniform electric field (dielectrophoretic) effects. *J. Phys. E: Sci. Instrum.* 10, 190 - 193. Corrigendum 883.
- [18] Müller T., Gerardino A., Schnelle T., Shirley S. G., Fuhr G., De Gasperis G., Leoni R. and Bordoni F.. 1995. High-frequency electric-field trap for micron and submicron particles. *Il Nuovo Cimento* 17D. 425 - 432.
- [19] Talary M. S., Burt J. P. H., Tame J. A. and Pethig R.. 1996. Electromanipulation and separation of cells using travelling electric fields. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 29, 2198 - 2203.
- [20] Stephens M., Talary M., Pethig R., Burnett A. Y Mills K.. 1996. The dielectrophoresis enrichment of CD34+ cells from peripheral blood stem cell harvests. *Bone Marrow Transplantation* 18, 777 - 782.
- [21] Pohl H. A. 1978. *Dielectrophoresis: The behavior of neutral matter in nonuniform electric fields*. Ed. Cambridge University Press. London.
- [22] Fuhr G. and Shirley S. G.. 1998. Biological application of microstructures. *Topics in current chemistry* 194, 83 - 116.
- [23] Fuhr G., Schnelle T., Müller T., Glasser H., Lisec T. and Wagner B.. 1995. Positioning and manipulation of cells and microparticles using miniaturized electric field traps and travelling waves. *Sensors and materials* 7, 131 - 146.
- [24] Hughes M. P., Wang X-B., Becker F. F., Gascoyne P-R. C. and Pethig R. 1994. Computer-aided analyses of electric fields used in electrorotation studies. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 27, 1564 - 1570.
- [25] Arnold W. M., Schwan H. P. and Zimmermann U.. 1987. Surface conductance and other properties of latex particles measured by electrorotation. *J. Phys. Chem.* 91, 5093 - 5098.
- [26] Huang Y. and Pethig R.. 1991. Electrode design for negative dielectrophoresis. *Meas. Sci. Technol.* 2, 1142 - 1146.
- [27] Griffith A. and Cooper J. 1998. Single-cell measurements of human neutrophil activation using electrorotation. *Anal. Chem.* 70, 2607 - 2612.
- [28] Gascoyne P. R. C., Wang X-B., Huang Y. and Becker F. F.. 1997. Dielectrophoretic separation of cancer cells from blood. *IEEE Trans. on Ind. Appl.* 33 (3), 670 - 678.
- [29] Huang Y., Wang X-B., Tame J. A. and Pethig R.. 1993. Electrokinetic behaviour of colloidal particles in travelling electric fields: studies using yeast cells. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 26, 1528 - 1535.
- [30] Pethig R.. 1984. *Dielectric properties of biological materials: Biophysical and medical applications*. *IEEE Trans. Electr. Insul.* EI-19 (5), 453 - 474.
- [31] Wang X-B., Huang Y., Hötzel R., Burt J. P. H. and Pethig R.. 1993. Theoretical and experimental investigations of the interdependence of the dielectric, dielectrophoretic and electrorotational behaviour of colloidal particles. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 26, 312 - 322.
- [32] Fernández Morales F. H., Duarte J. E. y Samitier J.. "Micro-belt conveyor of latex microspheres". *17th Symposium on Microelectronics Technology and Devices, SBMicro 2002*. Septiembre 9 a 14 de 2002. Porto Alegre, Brasil.