



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA
INSTITUTO NACIONAL DE ASTROFÍSICA, ÓPTICA Y ELECTRÓNICA

ARREGLOS DE SENSORES INTEGRADOS DE IONES DE
HIDRÓGENO PARA SECUENCIACIÓN GENÉTICA MASIVA DE ADN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN TECNOLOGÍA

P R E S E N T A
ARACELI GÓMEZ REBOLLEDO

DIRECTOR DE TESIS
DR. JOEL MOLINA REYES



JURIQUILLA, QUERÉTARO

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Votos Aprobatorios

**COMITÉ ACADÉMICO DE LA
 LICENCIATURA EN TECNOLOGÍA**

Presente

En cumplimiento del Artículo 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis de título

Arreglos de sensores integrados de iones de hidrógeno para secuenciación genética masiva de ADN

que realizó el (la) pasante

Araceli Gómez Rebolledo

con número de cuenta: 412059508, bajo la opción de titulación por Tesis y Examen profesional en la Licenciatura en Tecnología.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Víctor Manuel Castaño Meneses	
VOCAL	Dr. Pedro Salas Castillo	
SECRETARIO	Dra. Luz María López Marín	
1er. SUPLENTE	Dr. Domingo Rangel Miranda	
2º SUPLENTE	Dr. Fidel Alejandro Sánchez	

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

UNAM, Campus Juriquilla, Oro. a 3 de Octubre de 2018.

A mi hermana y mejor amiga, Eleonor, por haber llegado a revolucionar mi vida.

A mi hermano, Guillermo, por siempre estar y ser mi ejemplo de resiliencia.

A mi mamá, Reyna Araceli, por impulsarme siempre a seguir adelante.

A mi papá, Guillermo Esteban, por apoyarme a conseguir este sueño.

*A mis abuelitos, Leonor y Guillermo, por todo el cariño y soporte en los momentos más
difíciles de mi vida.*

A mis sobrinos Fátima Sofía y Guillermo Esteban, porque verlos crecer me da esperanza.

A mi cuñada, Mariel, por su apoyo en todo momento.

A Anik M, Alf, Curie, Bartolita, Anik y Alfredo mis compañeros peludos o emplumados.

Gracias a todos por siempre estar cerca sin importar la distancia.

Agradecimientos

Al Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica por todo el apoyo recibido durante los meses de realización de esta tesis.

Al Dr. Joel Molina, mi asesor de tesis, por regalarme su tiempo y compartir conmigo su conocimiento.

Al apoyo y guía del Dr. José Luis Sánchez del Laboratorio de Investigación en Microbiología Médica y Biotecnología de la UDLAP.

A Alejandra, Héctor, Manolo, Yahir, Jesús, Betty, René, Uriber, Omar, Axel y Maricruz por hacer un espacio en sus actividades para capacitarme o apoyarme.

A Óscar Pestaña e Ignacio Juárez, por su apoyo técnico en los Laboratorios de Nanoelectrónica y Microelectrónica del INAOE.

Al Dr. Javier de la Hidalga y al Dr. Mario Moreno por aceptarme como oyente en cursos que impartieron en el periodo de primavera 2017 para la maestría en electrónica del INAOE. A Marisol, Greg, Álvaro y Luis, mis compañeros de equipo y apoyo en los cursos.

Al Dr. Víctor Manuel Castaño por su revisión y comentarios sobre el trabajo, así como su consejo para conformar al jurado.

Al Dr. Domingo Rangel del Laboratorio de Instrumentación y Desarrollo del CFATA-UNAM por la revisión técnica y comentarios de este trabajo.

Al Dr. Pedro Salas por su participación como revisor de este trabajo.

Al Dr. Alejandro Sánchez de la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática IBT-UNAM por sus comentarios y sugerencias.

A la Dra. Luz María López por sus sugerencias y la revisión detallada de este trabajo.

A mis maestros y compañeros de la licenciatura, especialmente a Clausen por su gran amistad y todo el apoyo para realizar los trámites de titulación.

A todos mil gracias.

Contenido

Contenido.....	4
Lista de abreviaturas.....	7
Resumen	9
Abstract	10
1. Introducción	11
1.1 Estado-del-arte.....	15
1.2 Justificación.....	17
1.3 Hipótesis	19
1.4 Objetivos	20
1.4.1 Objetivo general	20
1.4.2 Objetivos específicos	20
2. Ion-Sensitive Field-Effect Transistor como elemento sensible a pH	21
2.1 Fundamentos de semiconductores.....	22
2.2 El transistor, un dispositivo semiconductor	24
2.2.1 Conceptos básicos del transistor.....	25
2.3 Ion-Sensitive Field-Effect Transistors (ISFET)	27
2.3.1 Mecanismo de sensado de un ISFET	28
2.3.2 Respuesta al pH de los ISFET	29

3.	Metodología	31
3.1	Fabricación de EG-ISFETs	32
3.1.1	Limpieza inicial	32
3.1.2	Metalización, depósito por evaporación e-beam	33
3.1.3	Depósito de Al ₂ O ₃ y TiO ₂ por capas atómicas	34
3.1.4	Encapsulado de superficie sensible	35
3.2	Caracterización electro-química (I-V-pH)	36
3.2.1	Mediciones I-V	36
3.2.2	Mediciones I-V-pH	38
3.2.3	Sensibilidad	40
3.2.4	Mediciones I-V-tiempo.....	41
3.2.5	Efecto de la temperatura e iluminación en la respuesta de EG-ISFET basado en ALD-TiO ₂	41
3.2.6	Mediciones I-V-tiempo para cambios de 0.1 en pH	42
3.3	Pruebas de hibridación/desnaturalización de cadenas sencillas de ADN	45
3.3.1	Resuspensión de oligonucleótidos en solución buffer TE	45
3.3.2	Comprobación de hibridación	46
3.3.3	Caracterización (pH e I _{drain}) del buffer TE con cambios en temperatura.....	48
3.3.4	Medición pH e I _{drain} durante la hibridación de poly-A & poly-T y poly-C & poly-G	49
4.	Resultados experimentales y discusión	50
4.1	Mediciones I-V-pH	51

4.1.1 ISFET basado en Si_3N_4 como dieléctrico sensible a pH	51
4.1.2 EG-ISFET basado en ALD- Al_2O_3	52
4.1.3 EG-ISFET basado en ALD- TiO_2	53
4.2 Mediciones I-V-tiempo para detectar cambios de 0.1 en pH	55
4.3 Mediciones I-V-pH-temperatura e I-V-pH-iluminación	56
4.4 Eventos de hibridación/desnaturalización de cadenas sencillas de ADN	61
4.5 Detección de eventos de desnaturalización de cadenas sencillas de ADN usando EG-ISFET con ALD- TiO_2	65
5. Conclusiones.....	68
5.1 Trabajo a futuro	69
Bibliografía y referencias	71

Lista de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
PNA	Ácido peptidonucleico
ssDNA	Cadena simple de ADN
dsDNA	Cadena doble de ADN
CMOS	Semiconductor complementario de óxido metálico
TFT	Transistor de película delgada
MOSFET	Transistor de efecto de campo metal-óxido-semiconductor
ISFET	Transistor de efecto de campo sensible a iones
EG-ISFET	Transistor de efecto de campo sensible a iones con compuerta extendida
OTFT	Transistor orgánico de película delgada
R-GOFET	Transistor de efecto de campo de óxido de grafeno
SiNW-FET	Transistor de efecto de campo de nanocables de silicio
INAOE	Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica
UDLAP	Universidad de las Américas Puebla
A	Adenina
poly-A	Oligonucleótido conformado de repeticiones de nucleótidos adenina
T	Timina
poly-T	Oligonucleótido conformado de repeticiones de nucleótidos timina
C	Citosina
poly-C	Oligonucleótido conformado de repeticiones de nucleótidos citosina
G	Guanina
poly-G	Oligonucleótido conformado de repeticiones de nucleótidos guanina
Tris-Cl	Tris(hidroximetil)aminometano
EDTA	Sal disódica del ácido etilendiamino tetraacético
Buffer TE	10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial hidrógeno
Si	Silicio
SiO ₂	Óxido de silicio
ALD	Depósito por capas atómicas
Al	Aluminio
Al ₂ O ₃	Óxido de aluminio
ALD-Al ₂ O ₃	Óxido de aluminio depositado por capas atómicas
Ti	Titanio
TiO ₂	Óxido de titanio
ALD-TiO ₂	Óxido de titanio depositado por capas atómicas

Si ₃ N ₄	Nitruro de silicio
Ta ₂ O ₅	Pentóxido de tantalio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
NH ₄ OH	Hidróxido de amonio
HCl	Ácido clorhídrico
HF	Ácido fosfórico
N ₂	Nitrógeno molecular
NaOH	Hidróxido de sodio
PO ₄	Fosfato
Ag	Plata
AgCl	Cloruro de plata
TMA	Trimetil-aluminio
TDMAT	Tetrakis(dimetilamino)titanio
S	Fuente de un transistor MOSFET
D	Drenaje de un transistor MOSFET
G	Compuerta de un transistor MOSFET
B	Sustrato de un transistor MOSFET
I	Corriente
V	Voltaje
I _{drain}	Corriente de drenaje
V _{th}	Voltaje de umbral
V _{gs}	Voltaje aplicado a la compuerta
V _{ref}	Voltaje de referencia
V _{ds}	Voltaje aplicado al drenaje
EDLC	Capacitancia eléctrica de doble capa
IHP	Plano interno de Helmholtz
OHP	Plano externo de Helmholtz
PCB	Placa fenólica de baquelita
SPA	Analizador de parámetros de semiconductores
UV	Radiación ultravioleta
CNM	Centro Nacional de Microelectrónica, Barcelona
T _m	Temperatura de melting
μA	Microamperios
mtorr	Militorr
μM	Micromolar
μl	Microlitro
°C	Grados Celsius
nm	Nanometro
mV	Milivolt
CI	Circuito integrado

Resumen

La detección de una cadena de ADN específica se basa en la detección del evento de desnaturalización o hibridación del ADN. Existen muchos principios diferentes para detectar la reacción de hibridación, pero la mayoría de estas técnicas necesitan un paso de marcaje de las hebras de ADN objetivo. Por tanto, un conveniente principio de detección de hibridación de ADN sería el que no necesite de pasos intermedios. Esto puede cumplirse mediante la implementación de sensores basados en transistores de efecto de campo (usando la tecnología CMOS) y cuya superficie sensible de óxidos metálicos de alta calidad, sea lo suficientemente sensible para convertir un cambio de pH (asociado al evento de hibridación o desnaturalización de ADN) a un cambio electrónico que pueda ser procesado por un dispositivo MOSFET.

Se fabricaron EG-ISFETs (transistores de efecto de campo sensibles a iones con compuerta extendida) con óxido de aluminio (Al_2O_3) y óxido de titanio (TiO_2), como superficies sensibles a iones de hidrógeno, en los laboratorios de Nanoelectrónica y Microelectrónica del INAOE. Se obtuvieron sensibilidades de 68 mV/pH para la estructura Glass/Al/ Al_2O_3 , 54 mV/pH para la estructura Si/ SiO_x /Ti/ TiO_2 y 51 mV/pH para Glass/Ti/ TiO_2 . Todos siendo sensibilidades altas comparadas con un ISFET comercial basado en nitruro de silicio (Si_3N_4), como superficie sensible, cuya sensibilidad medida fue de 46.5 mV/pH .

Con estructuras EG-ISFET se lograron detectar los eventos de desnaturalización de ADN sin necesidad de usar un paso de marcaje o inmovilización de las hebras de ADN. Para ello, dentro del laboratorio de Investigación en Microbiología Médica y Biotecnología de la UDLAP se resuspendieron cadenas de 20 pares de bases con secuencias repetidas de cada oligonucleótido (poly-A, poly-T, poly-C y poly-G). Posteriormente se detectaron los eventos de desnaturalización de cadenas sencillas de ADN, suspendidas en solución buffer TE (pH=8), usando estructuras EG-ISFET ([Si/ SiO_x /Ti/ TiO_2]+MOSFET comercial [ALD110804]). Realizando una medición constante de corriente de drenaje durante rutinas de calentamiento ($25 - 55^\circ\text{C}$) por 11 minutos, se obtuvo un cambio en la tendencia de la corriente de drenaje de $47 \mu\text{A}$ para las cadenas de Adenina y Timina cuando la temperatura era de 45°C . Para la Citosina y Guanina, se obtuvo un cambio de $41 \mu\text{A}$ a 48°C . Estas temperaturas corresponden a las temperaturas de fusión de las cadenas A-T y C-G, las cuales se obtuvieron por mediciones espectrofotométricas de absorbancia.

En trabajo futuro se diseñarán y fabricarán arreglos bi-dimensionales integrados que utilicen este tipo de EG-ISFET, los cuales habilitarán un bajo consumo de potencia y un procesamiento de señal sencillo lo que posiblemente los convertirá en herramientas de identificación molecular en campo, importantes para poder identificar epidemias emergentes, secuenciación genética de especies de interés o para identificar de manera precisa y altamente reproducible, los mecanismos principales durante los eventos de hibridación y desnaturalización de cadenas de ADN a partir de una transducción de señales electroquímicas a electrónicas.

Abstract

The detection of a specific DNA chain is based on the detection of DNA hybridization and denaturalization events. There are many different principles for detecting the hybridization reaction, most of these techniques require a step for labeling target DNA strands. Therefore, a convenient principle of detection of DNA hybridization would be one that does not need intermediate steps. This can be achieved through the implementation of sensors based on field effect transistors (using CMOS technology) whose sensitive surface of high quality metal oxides, is sensitive enough to convert a pH change (associated with the event of hybridization or denaturation of DNA) to an electronic change that can be processed by a MOSFET device.

EG-ISFETs (Ion-Sensitive Field Effect Transistors with Extended Gate) were fabricated with aluminum oxide (Al_2O_3) and titanium oxide (TiO_2), as surfaces sensitive to hydrogen ions. This was done at the Nanoelectronics and Microelectronics laboratories, INAOE. Sensitivities of 68 mV/pH were obtained for Glass/Al/ Al_2O_3 structure, 54 mV/pH for the Si/ SiO_x /Ti/ TiO_2 structure and 51 mV/pH for Glass/Ti/ TiO_2 . These are high sensitivities for pH detection as compared to a commercial ISFET based on silicon nitride (Si_3N_4), as a sensitive surface, whose measured sensitivity was 46.5 mV/pH .

Using EG-ISFET structures, it was possible to detect the DNA denaturation events without a step of labeling or immobilization of DNA strands. For these measurements, chains of 20 base pairs with repeated sequences of each oligonucleotide (poly-A, poly-T, poly-C and poly-G) were resuspended within the Research Laboratory in Medical Microbiology and Biotechnology, UDLAP. Subsequently, denaturing events of single DNA strands, suspended in TE buffer solution ($\text{pH} = 8$), were detected using EG-ISFET structures ([Si/ SiO_x /Ti/ TiO_2] + commercial MOSFET [ALD110804]). Performing constant measurements of drain current during heating routines ($25 - 55^\circ\text{C}$) for 11 minutes, a change of $47 \mu\text{A}$ in the monotonic trend of drain current was obtained for the Adenine and Thymine chains when the temperature reached 45°C . For Cytosine and Guanine chains, a change of $41 \mu\text{A}$ at 48°C was obtained. These temperatures correspond to the melting temperatures of the A-T and C-G chains, which were obtained by spectrophotometric absorbance measurements.

In future work, bi-dimensional integrated arrays using this type of EG-ISFET will be designed and manufactured. These will enable low power consumption and simple signal processing, with the potential to turn them into on-field molecular identification tools. That is important since they could be able to identify emerging epidemics, they could also enable genetic sequencing of species of interest or even identify (with a precise and highly reproducible manner), the main mechanisms during the hybridization and denaturation of DNA chains events from a transduction of electrochemical to electronic signals.

1

Introducción

Esta propuesta es interdisciplinaria y se enfoca al desarrollo y aplicación de estructuras semiconductoras para la detección de la hibridación de secuencias genéticas cortas de las bases nucleotídicas de ADN.

La especificidad en la detección de una cadena de ADN se basa en la detección de su hibridación. De acuerdo con el modelo del ADN presentado por Watson y Crick [1] en 1953, el ADN consiste en dos cadenas polinucleotídicas enrolladas alrededor de un eje central, formando una doble hélice. Los nucleótidos son las piezas repetidas y apiladas que forman cada hélice, constan de tres componentes esenciales: una base nitrogenada, un azúcar pentósido (un azúcar con cinco carbonos) y un grupo fosfato, ver Figura 1-1 (a). La unión entre dos nucleótidos consiste en un grupo fosfato unido a dos azúcares, formando un enlace

fosfodiéster¹. La unión de dos nucleótidos forma un dinucleótido; la de tres, un trinucleótido, y así sucesivamente. Cadenas cortas formadas por hasta aproximadamente 30 nucleótidos unidos reciben el nombre de oligonucleótidos (Figura 1-1 (b)); cadenas más largas se denominan polinucleótidos. En la molécula del ADN las bases nitrogenadas son: adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G), en la Figura 1-1 (c) se muestra su estructura química.

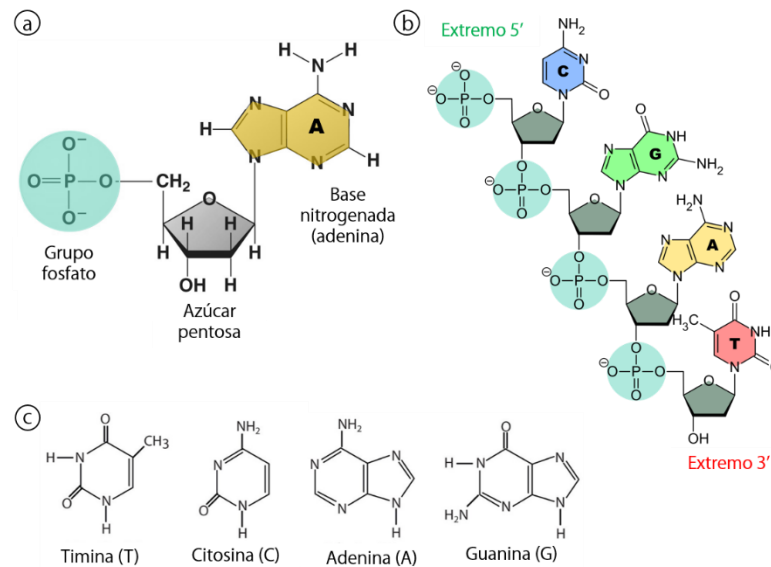


Figura 1-1 (a) Estructura general de los nucleótidos. (b) Oligonucleótido. (c) Bases nitrogenadas del ADN.

La doble hélice permanece unida debido a la formación de puentes de hidrógeno² entre las bases nitrogenadas, como se muestra en la Figura 1-2. El apareamiento³ entre las bases es específico, únicamente los enlaces dobles de A=T y triples de G=C dan estabilidad termodinámica a la estructura de doble hélice. Por lo tanto, una hebra de ADN se apareará completamente con otra que contenga exactamente los pares de bases complementarios. A este proceso de apareamiento se le conoce como hibridación.

¹ Enlace fosfodiéster: el ácido fosfórico se une a dos alcoholes (grupos hidroxilo de los dos azúcares) mediante una unión éster en ambos lados.

² Puente de hidrógeno: atracción electrostática muy débil entre un átomo de hidrógeno unido covalentemente y un átomo con un par de electrones no compartidos.

³ Apareamiento de bases: interacción entre bases nitrogenadas que da origen a las formas hibridadas o plegadas de los ácidos nucleicos.

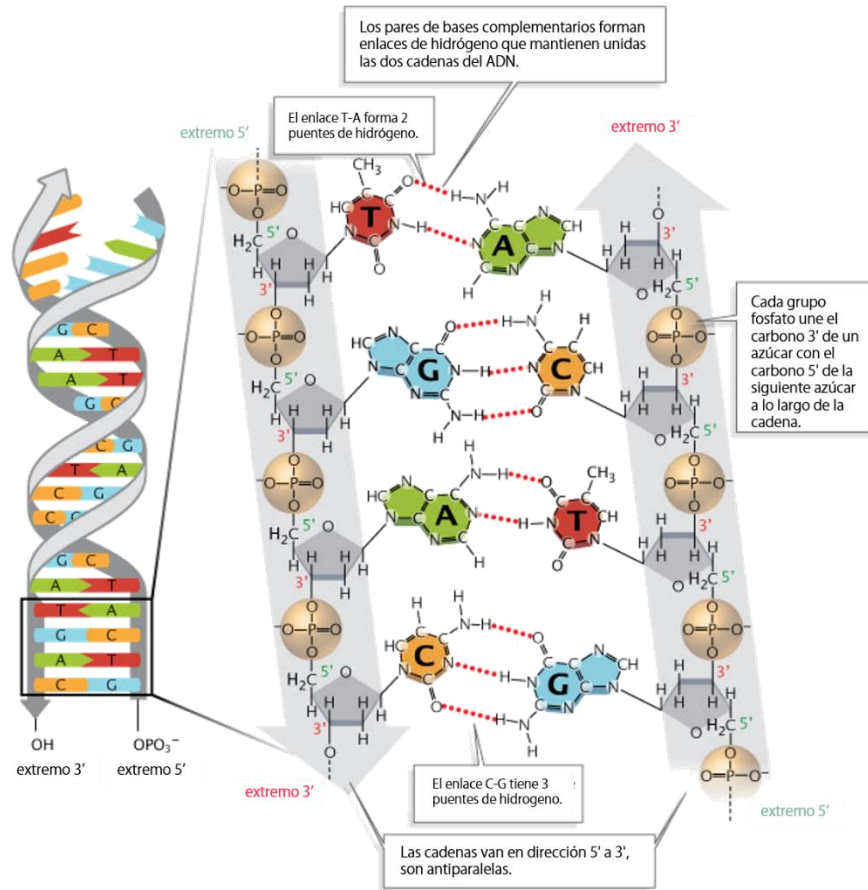


Figura 1-2 Estructura del ADN. Figura traducida al español de la referencia [2], Nature Education.

A pesar de que la estructura del ADN es bastante estable, una elevada temperatura (80-90°C) o un elevado pH pueden hacer que su estructura tridimensional se desenrolle y las cadenas se separen, es decir, que pierda su función al desnaturalizarse. Cuando se produce la desnaturalización, los puentes de hidrógeno se rompen pero los enlaces covalentes permanecen, ver Figura 1-3. La temperatura a la cual se desnaturaliza una cadena específica depende de su composición de bases, un ADN con una mayor proporción de pares G=C que de pares A=T requiere una mayor temperatura para desnaturalizarse completamente, debido a la cantidad de puentes de hidrógeno [3].

Existen muchos principios diferentes para detectar la reacción de hibridación, como los métodos radiactivos, fluorescentes, electroquímicos, microgravimétricos, enzimáticos y electroluminiscentes [4]. Para la mayoría de estas técnicas es necesario un paso de marcaje de las hebras de ADN objetivo. Por ejemplo, en la Figura 1-4 se presenta la técnica más utilizada

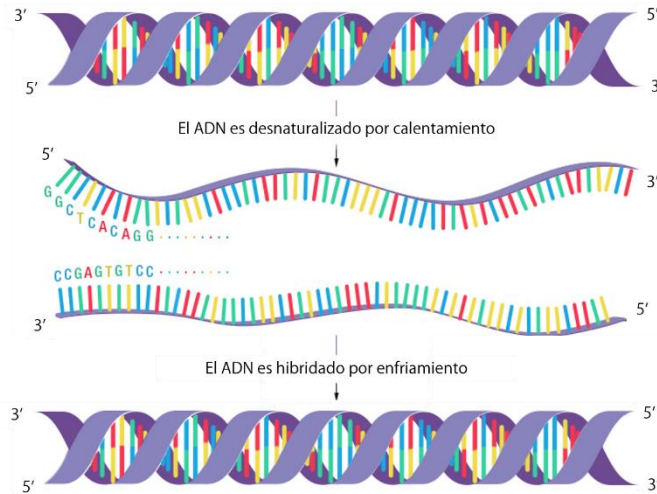


Figura 1-3 Desnaturalización e hibridación de ADN. Figura adaptada de la referencia [5], Fondation Mérieux.

en la industria, está basada en sistemas de lectores ópticos, donde es necesario el etiquetado de la hebra objetivo con compuestos fluorescentes, después de realizada la hibridación la celda es expuesta a la luz y dependiendo de la detección o no detección de la luz, se determina si la hibridación fue exitosa.

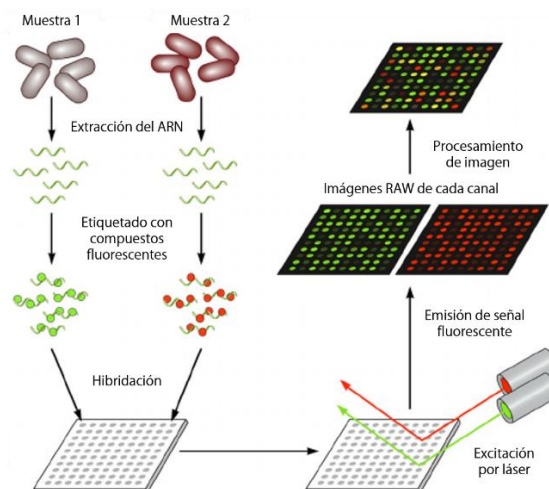


Figura 1-4 Detección de hibridación de ARN por medio de sistema de lectores ópticos.

Debido a que los ensayos de detección de patógenos y expresión génica necesitan del análisis de varios cientos de coincidencias genéticas, realizar esta prueba de manera secuencial en diferentes dispositivos sería muy ineficiente por lo que se requiere de la detección en paralelo dentro de un mismo dispositivo.

1.1 Estado-del-arte

Desde que se completó el proyecto que logró secuenciar el genoma humano en 2003, ha habido un avance extraordinario en tecnologías de secuenciación, esto ha abaratado el proceso logrando un incremento en número y diversidad de genomas secuenciados. En 2008 comenzaron a aparecer las tecnologías de secuenciación de nueva generación en las cuales la detección y secuenciación del ADN ocurren en paralelo [6].

La tecnología basada en CMOS tiene claras ventajas para la implementación en este tipo de sistemas. Su portabilidad, bajo costo, alta sensibilidad, alta densidad, alta velocidad y facilidad de uso lo posicionan en una de las opciones con mayor impacto en la atención médica de los años venideros [7]. En los últimos años, se han venido desarrollando dispositivos semiconductores que permiten la secuenciación [7 - 8] y la detección de ADN de forma no óptica. Estos dispositivos se basan en sensores de efecto de campo, como transductores, para el bioreconocimiento de ácidos nucleicos. El cambio en el contenido de ADN, ya sea debido a la hibridación o a reacciones enzimáticas, producen una variación local de pH/carga y una reorganización de las especies iónicas cerca de la superficie del sensor modulando su respuesta. Este tipo de tecnología ofrece un enorme potencial para el diagnóstico médico, la detección de patógenos, la realización de experimentos de expresión génica, el desarrollo de fármacos específicos para el paciente y la investigación genómica [10].

El método más conocido que utiliza tecnología CMOS para secuenciación genética es el presentado por Ion Torrent/Thermo Fisher [8], ver Figura 1-5. En este método, cadenas específicas de ADN son inmovilizadas sobre microesferas, estas son distribuidas cuidadosamente en arreglos de microcavidades, donde cada cavidad contiene una sola esfera. Los nucleótidos son añadidos uno por uno, si es complementario a la hebra molde una enzima, conocida como ADN polimerasa, lo incorpora a la cadena y libera un ion H^+ , generando un cambio de 0.02 unidades de pH que es detectado con estructuras ISFET; si más de una base es incorporada durante el ciclo, se presenta un incremento proporcional en la lectura. Después de presentarse esta reacción, la microcavidad es lavada para eliminar a los nucleótidos que no reaccionaron.

La mayoría de las técnicas de detección de ADN, utilizando tecnología CMOS, se basan en el proceso de hibridación, donde una cadena sencilla de ADN es reconocida únicamente por su cadena complementaria. La detección de la hibridación se lleva a cabo mediante la

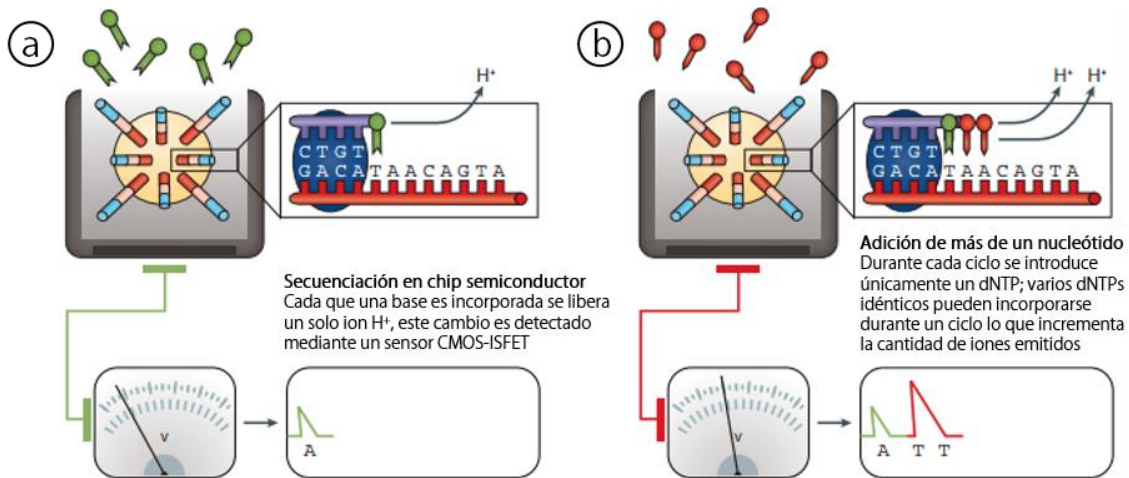


Figura 1-5 CMOS para secuenciación genética (Ion Torrent/Thermo Fisher). (a) Incorporación de un nucleótido a la cadena. (b) Adición de más de un nucleótido. Figura adaptada de la referencia [6], Nature Publishing Group.

inmovilización de cadenas sencillas sobre la superficie sensible de dispositivos ISFET. El ADN es una molécula cargada intrínsecamente, debido al grupo fosfato, cuando es hibridado la densidad de carga aumenta y se genera una reorganización de especies iónicas cerca de la superficie del sensor, lo que modula la respuesta del sensor, ver Figura 1-6.

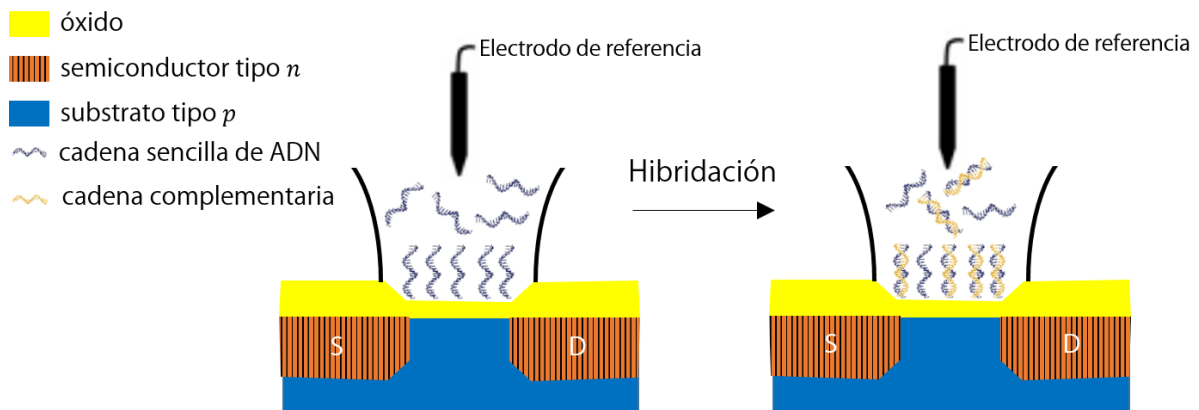


Figura 1-6 Estructura esquemática de un ISFET como sensor de hibridación de ADN.

Existen dos métodos de detección de hibridación de cadenas de ADN utilizados con sensores de efecto de campo [11]. El método que se muestra en la Figura 1-7 (a) se basa en la adhesión electrostática de una hebra de ADN, conocida como sonda [12]. En este método, los eventos de hibridación se presentan, principalmente, dentro de la doble capa eléctrica, delimitada por la línea punteada, y normalmente se observa un cambio de potencial claro una vez realizada la inmovilización. Sin embargo, la hibridación generalmente es mala debido a que la cadena

de ADN complementaria debe rodear la sonda. El segundo método se muestra en la Figura 1-7 (b) y se basa en una sonda con un extremo unido covalentemente a la superficie, varios estudios con este tipo de inmovilización han sido reportados [4, 28, 29]. La hibridación por este método se puede realizar sin ningún problema. La desventaja es que solo una porción de las cadenas se encuentran dentro de la doble capa eléctrica, lo cual es un grave problema ya que los eventos de bio-reconocimiento, como la hibridación o desnaturalización de ADN, deben ocurrir dentro de la longitud de Debye para generar una correcta detección del ADN [19], después de realizar la transducción de una secuencia electroquímica a una señal electrónica (procesable por sensores EG-ISFET).

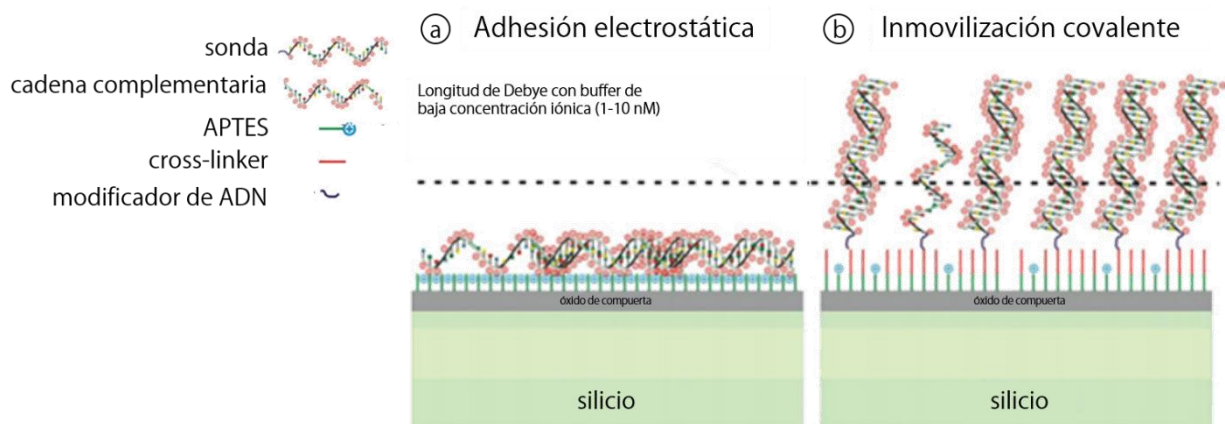


Figura 1-7 Estrategias principales para inmovilizar hebras de ADN a óxidos de compuerta (a) Inmovilización por adhesión electrostática (b) Inmovilización covalente. Figura adaptada de la referencia [12], Portland Press.

1.2 Justificación

A partir del primer desarrollo de sensores tipo ISFET en el INAOE [14 - 15], esta tecnología de sensores integrados para la medición de pH se ha venido madurando y optimizando al aprovechar las posibles variaciones introducidas a un proceso estándar de fabricación de circuitos integrados tipo CMOS. Este trabajo es la prueba de concepto de la aplicación de estructuras EG-ISFET fabricadas y caracterizadas en el INAOE para la detección de secuencias cortas de ADN específico, sin un paso de marcaje y/o inmovilización.

Después del primer estudio exitoso de detección de hibridación de ADN mediante sensores de efecto de campo reportado en 1997 [17] se han presentado más de 100 estudios para

Tabla 1 Resumen de sensores de efecto de campo usados para la detección de ADN por hibridación. Tabla adaptada de [18].

Tipo de sensor	Superficie sensible	Tipo de inmovilización	Sonda de ADN	Target ADN	Electrodo de referencia	Ref.
EIS; FET p-Si-SiO ₂	SiO ₂	Covalente	Oligo(dT20);poly(dT1000bp)	Oligo(Da18);poly(dA1000bp)	Ag/AgCl	[17]
FET canal <i>p</i>	SiO ₂	Silanización con APTES	Adsorción $\sim 4 \times 10^{11}$ molecules/cm ²	(20,45)-mer ssDNA	Ag/AgCl	[19]
FET canal <i>p</i>	SiO ₂	Electrostática con poly-lisina	20-mer dsDNA	dsDNA	Ag/AgCl	[20]
FET canal <i>p</i>	SiO ₂	Silanización con APTES	10-mer ssDNA	20-mer ssDNA	Ag/AgCl	[21]
FET de compuerta flotante canal <i>p</i>	SiO ₂	Electrostática	(12,15)-mer ssDNA modificado con tiol	ssDNA	Ag/AgCl	[22]
TFT canal <i>p</i>	Au/SiO ₂ /Si	Electrostática	18-mer ssDNA	18-mer ssDNA	Ag/AgCl	[23]
a-Si:H ISFET	SiO ₂ /SiN _x	Covalente	19-mer ssDNA	19-mer ssDNA	Ag/AgCl	[24]
FET canal <i>n</i>	Si ₃ N ₄ /SiO ₂	Silanización con APTES	(15,25)-mer ssDNA modificado con tiol	(15,25)-mer ssDNA	Ag/AgCl	[25], [26]
FET canal <i>p</i>	Au/Cr/Si ₃ N _x	Electrostática	17-mer ssDNA modificado con tiol	17-mer ssDNA	-	[27], [28]
FET canal <i>n</i>	Si ₃ N ₄	Electrostática con poly-lisina	20-mer dsDNA	400bp cDNA	Ag/AgCl	[29]
OTFT canal <i>p</i>	Au/SiO ₂	Electrostática	(20,21)-mer dsDNA	ssDNA	-	[30], [31]
CMFET	SiO ₂	Silanización con APTES	13-mer poly-dT, 18-mer ssDNA	18bp ssDNA	-	[32]–[34]
SiNW- FET	SiNW	Covalente	(10-23)-mer PNA	(16-32)-mer ssDNA	-	[35]–[44]
R-GO FET	Grafeno	Covalente	22-mer PNA	22-mer ssDNA	-	[45]
EG-FET	Au	Electrostática	16-mer PNA	(16,23)-mer ssDNA	Ag/AgCl	[14]

desarrollar este tipo de sensores. Algunos de estos se sintetizan en la Tabla 1, observando que pocos trabajos reportados han realizado la detección de ADN por hibridación usando dispositivos EG-ISFET, y ninguno utilizando óxido de titanio depositado por capas atómicas como elemento sensible. La ventaja de las estructuras EG-ISFET es que permiten que la superficie sensible este aislada del transistor lo que genera resultados con menor variación inducida por factores externos a la medición esperada y abarata el proceso. Utilizar TiO_2 como elemento sensible al pH es ventajoso ya que se han reportado altas sensibilidades $57 - 61.44 \text{ mV/pH}$ [20–22].

Realizar la detección de una cadena específica de ADN mediante hibridación/desnaturalización de las cadenas, usando variaciones termodinámicas, logra que este método no ocupe enzimas, nucleótidos (dNTP) o marcaje radiactivo para su operación. De esta forma, son necesarios menos pasos de pre-procesamiento de la muestra de ADN que varias tecnologías de secuenciación de última generación [6] y no se necesita de marcaje en la sonda como algunos biosensores de diagnóstico molecular [23, 24].

Finalmente, en este trabajo no se utilizará ningún método de inmovilización de las cadenas sencillas de ADN, las mediciones se realizan con una concentración baja tal que permite su detección dentro de la longitud de Debye¹, debido a que la longitud de Debye λ_D es inversamente proporcional a la concentración iónica de la solución [19, 28, 29].

1.3 Hipótesis

Por medio de una combinación de materiales dieléctricos² altamente sensibles al pH, así como de un proceso adecuado de fabricación compatible con un proceso CMOS, puede obtenerse una tecnología no-óptica para la detección de cadenas cortas de ADN específicas, mediante el monitoreo de la hibridación de cadenas sencillas de ADN no inmovilizadas. Lo anterior es posible empleando técnicas estándar y avanzadas de fabricación de circuitos integrados y de

¹ Longitud de Debye: distancia física sobre la que es posible detectar interacciones electrostáticas tales como los eventos de hibridación/desnaturalización de cadenas de ADN a partir de sus enlaces dobles (A=T) o triples (G≡C) de hidrógeno.

² Materiales dieléctricos: material que no permite movimiento de cargas eléctricas en su interior.

sistemas micro-electro-mecánicos (MEMS), con las ventajas inherentes a dispositivos electrónicos integrados en silicio.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Explotando los múltiples beneficios de tecnologías modernas de semiconductores, obtener sensores de iones de hidrógeno [H⁺] suficientemente sensibles usando procesos, materiales y estructuras de dispositivo que permitan detectar la hibridación/desnaturalización de cadenas sencillas de ADN.

1.4.2 Objetivos específicos

- 1) Diseñar y fabricar estructuras integradas sensibles a iones de hidrógeno.
- 2) Investigar las propiedades fundamentales (físicas, químicas, morfológicas, etc.) de óxidos metálicos ultradelgados de compuerta que presenten sensibilidades altas, cercanas al teórico permitido, para la detección de pH.
- 3) Promover y detectar la hibridación/desnaturalización de cadenas sencillas de ADN usando estructuras EG-ISFET (Transistor de efecto de campo sensible a iones de compuerta extendida).

2

Ion-Sensitive Field-Effect Transistor como elemento sensible a pH

Desde su introducción para monitoreo neurofisiológico³ por Piet Bergveld en 1970 [52], el transistor de efecto de campo sensible a iones (ISFET, por sus siglas en inglés) ha sido uno de los biosensores electrónicos más populares. Es conocido principalmente por su uso como sensor de pH, es decir para medir las concentraciones de iones H^+ u OH^- en una solución, por medio de un potencial interfacial en el óxido de la compuerta. El ISFET es un dispositivo que funciona de manera muy similar a los transistores de efecto de campo metal-óxido-

³ Monitoreo neurofisiológico: monitoreo de los potenciales eléctricos generados por el sistema nervioso.

semiconductor (MOSFET, por sus siglas en inglés). Por lo tanto, primero se comprenderán los principios de operación general de un MOSFET, los cuales permitirán presentar el concepto de ISFET. Finalmente, se explicarán las interacciones químicas que convierten a los ISFETs en elementos sensibles a pH.

2.1 Fundamentos de semiconductores

Los materiales electrónicos de estado sólido se clasifican en función de sus bandas de energía y de la manera en que los electrones ocupan las bandas permitidas. La característica más importante de un semiconductor es su concentración de portadores de carga⁴. En un semiconductor cristalino intrínseco existe la misma cantidad de electrones libres (portadores negativos) y de huecos libres (portadores positivos), creados por la excitación térmica de los electrones desde su banda de valencia, hacia la primera banda de estados excitados, llamada banda de conducción (Figura 2-1). Esto crea estados desocupados que son considerados como portadores de carga cargados positivamente, llamados huecos.

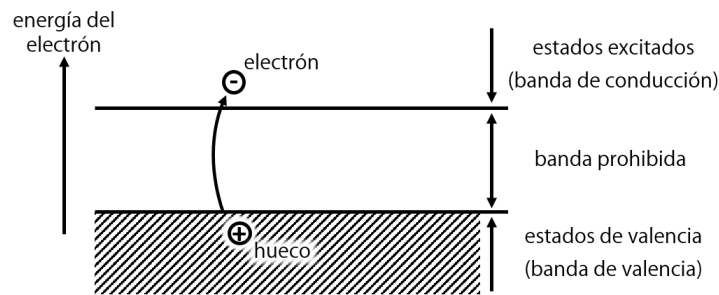


Figura 2-1 Bandas de energía características de un semiconductor cristalino. Electrones libres son excitados a la banda de conducción. Los huecos corresponden a la falta de electrones en la banda de valencia y se comportan como una carga libre positiva.

La concentración de los portadores de carga está controlada por la ley de acción de masas aplicada a la reacción $h^+ + e^- \rightleftharpoons \text{cristal}$:

$$np = n_i^2$$

⁴ Portador de carga: partícula móvil y no enlazada que es portadora de una carga eléctrica.

Donde n y p son las concentraciones de electrones y huecos, respectivamente, y n_i es una constante. En un semiconductor intrínseco $n = p$, debido a que es eléctricamente neutro; así que n y p son iguales a n_i , concentración de portadores intrínseca [53].

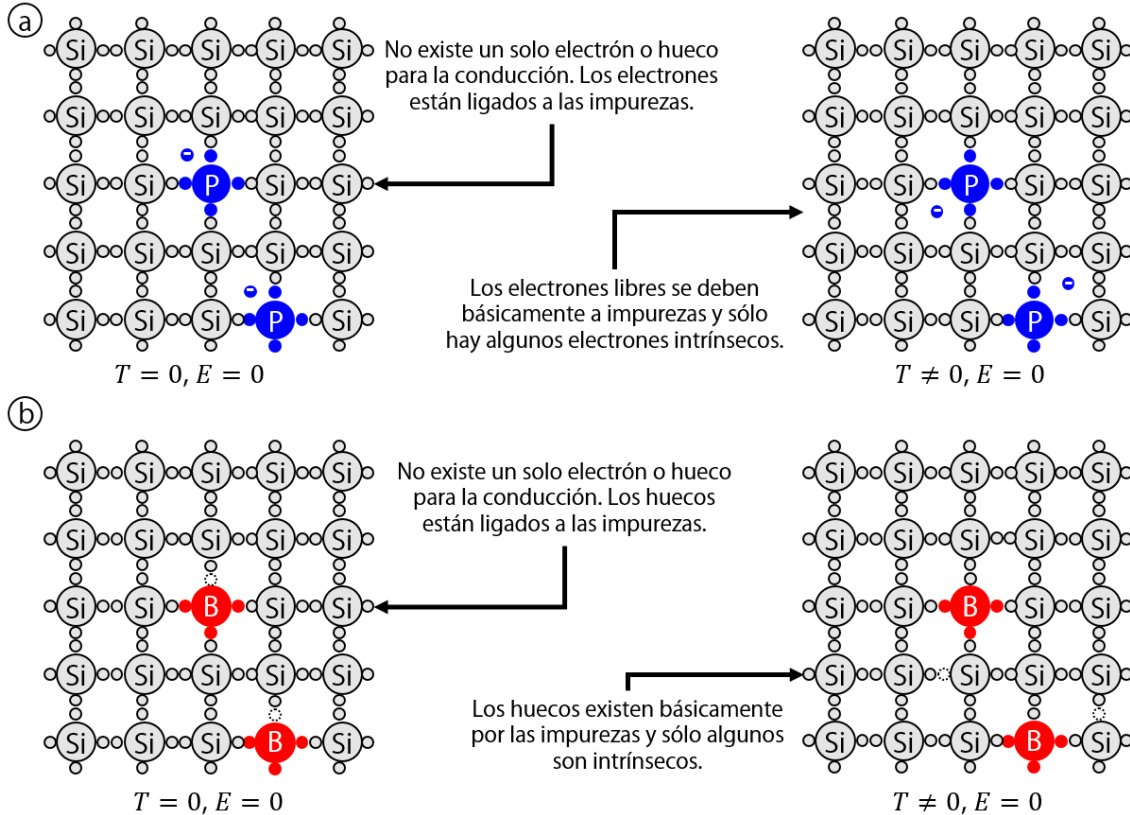


Figura 2-2 Estructura de enlaces químicos del silicio dopado con fósforo (a) y boro (b). Para ambos casos, T =temperatura, E =campo eléctrico.

La concentración de portadores en silicio intrínseco es muy baja, cerca de 10^9 cm^{-3} a temperatura ambiente. Es posible controlar la concentración de portadores de carga y elegir el tipo de portador de manera bastante sencilla: introduciendo impurezas en el cristal. Las impurezas son átomos del mismo tipo introducidos a la red cristalina del semiconductor. Si se introducen átomos del grupo V (con cinco electrones de valencia) de la tabla periódica, en un sólido cristalino de silicio, cuatro de los electrones de la impureza son empleados en los enlaces covalentes hacia la red y el quinto electrón se mantiene ligado a la impureza por fuerzas de atracción coulombicas. Siendo esta una fuerza muy débil, al aumentar la temperatura se desprende de la red y queda libre, aumentando el número de electrones de conducción. Así, la impureza queda ionizada con carga positiva, pero se mantiene fija; un

semiconductor dopado con este tipo de impureza se llama semiconductor tipo n , y la impureza se conoce como donadora, ver Figura 2-2 (a).

Si en lugar de átomos del grupo V de la tabla periódica se introducen impurezas del grupo III, se obtiene un comportamiento distinto ya que estos átomos tienen solo tres electrones de valencia, empleados para formar tres enlaces covalentes, el cuarto enlace de la red cristalina de silicio carece de un electrón (únicamente cuando $T = 0$). Cuando la temperatura aumenta, captura fácilmente a los electrones que se están formando térmicamente en el silicio, dando lugar a la formación de enlaces incompletos que pueden ser empleados para el movimiento de electrones de la banda de valencia. Este tipo de impurezas reciben el nombre de aceptoras y favorecen la donación de huecos, están presentes en semiconductores tipo p , ver Figura 2-2 (b).

2.2 El transistor, un dispositivo semiconductor

Actualmente los semiconductores son ampliamente utilizados para la fabricación de dispositivos electrónicos, como los transistores. Los MOSFETs han jugado un rol muy importante en el desarrollo de circuitos integrados a muy gran escala. Los transistores tienen la capacidad de amplificar señales eléctricas pequeñas en orden de cientos a miles de veces su valor original volviéndolos altamente sensibles a señales de entrada muy pequeñas.

Un MOSFET consiste en cuatro terminales: fuente S , drenaje D , compuerta G y sustrato B . La Figura 2-3, presenta un MOSFET canal n fabricado en un sustrato tipo p , el cual normalmente es un una oblea de silicio cristalino que provee el soporte físico del dispositivo y/o del circuito en general, en caso de ser un circuito integrado. Se crean dos regiones tipo n altamente dopadas, indicadas en la figura como fuente y drenaje. Después, una capa delgada (2-50 nm) de dióxido de silicio (SiO_2) es crecida sobre el sustrato cubriendo el área entre la fuente y el drenaje. Finalmente, el metal es depositado sobre el óxido formando el contacto a la compuerta. Los contactos metálicos también son realizados en las regiones de fuente, drenaje y sustrato. Usualmente, el sustrato y la fuente se conectan eléctricamente, lo que forma un dispositivo de tres terminales.

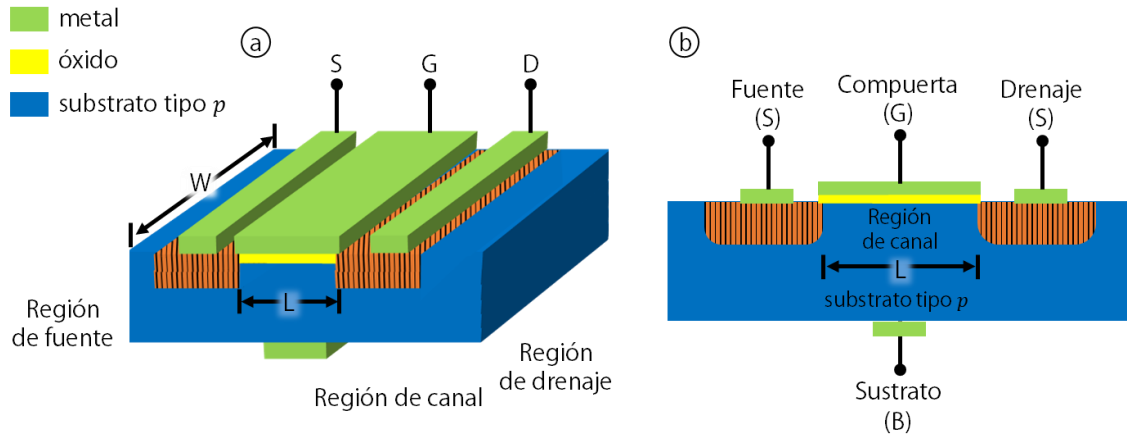


Figura 2-3 Diagrama esquemático (a) vista tridimensional y (b) corte transversal de un MOSFET canal n.

2.2.1 Conceptos básicos del transistor

Un MOSFET es básicamente un switch donde el mecanismo de control de corriente se basa en un campo eléctrico generado por el voltaje aplicado en la compuerta. La corriente es conducida por un solo tipo de portador (electrones o huecos) dependiendo del tipo de canal (canal n o canal p). En el caso de un semiconductor de tipo p (Figura 2-4 (a)), cuando se aplica un voltaje positivo moderado en la compuerta, los huecos del silicio son repelidos de la interfaz óxido-semiconductor creando una región que actúa como aislante (capa de agotamiento), por lo tanto, fluye una corriente casi nula entre la fuente y el drenaje. Cuando se incrementa este voltaje positivo la región cercana a la interface óxido-silicio es completamente agotada de huecos y se genera una inversión de carga. Es a partir de este incremento en voltaje de compuerta que se invierte la carga y en consecuencia, los electrones son atraídos a la superficie del semiconductor. Cuando se acumulan suficientes electrones en esta región se crea un canal conductivo en la interfaz óxido-semiconductor que permite un flujo de corriente entre la fuente y el drenaje. Al voltaje de compuerta mínimo para invertir la carga en la interface óxido-semiconductor, se le conoce como voltaje de encendido del transistor, V_{th} . El efecto opuesto ocurre en los semiconductores de tipo n [18].

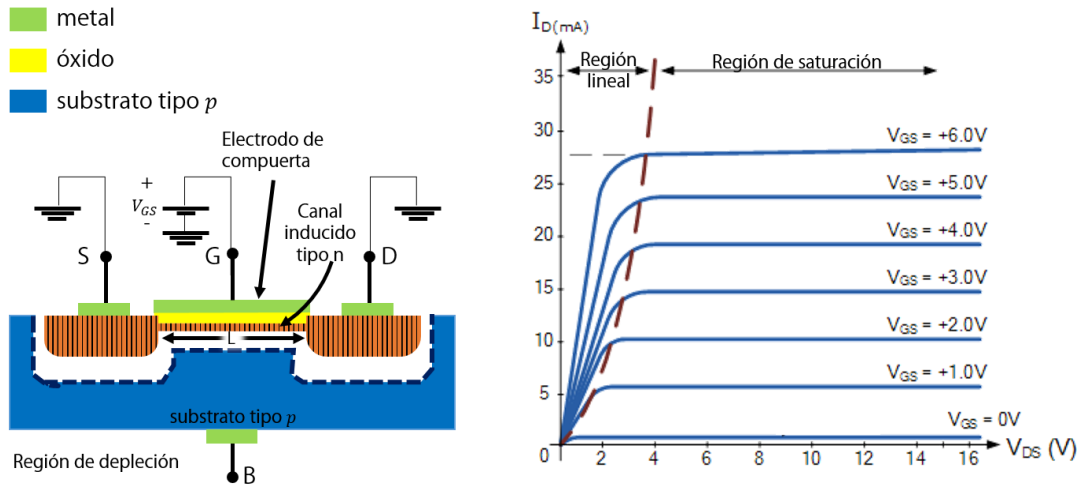


Figura 2-4 (a) MOSFET tipo n con un voltaje positivo aplicado a la compuerta. Un canal tipo n es inducido en la superficie del sustrato debajo de la compuerta. (b) Corriente en el drenaje I_d contra voltaje de drenaje a fuente V_{ds} para un MOSFET tipo n operado con $V_g > V_{TH}$.

El voltaje de compuerta modula la conductancia⁵ del canal y, a medida que aumenta, el MOSFET pasa de estado *apagado* a *encendido*. En el estado encendido la corriente entre drenaje y fuente (I_{ds}) varía dependiendo tanto del voltaje aplicado a la compuerta (V_{gs}) como al voltaje aplicado al drenaje (V_{ds}). Dependiendo del voltaje de drenaje, se pueden distinguir dos regiones de operación del transistor: lineal y saturación (Figura 2-4(b)). En la región de saturación, cualquier aumento en V_{ds} no afectará el valor de la I_{ds} y si V_{gs} aumenta, incluso en pequeña cantidad, la I_{ds} aumentará significativamente.

Existen dos set de curvas que nos brindan información del comportamiento del transistor, estas se obtienen manteniendo un voltaje (V_{gs} o V_{ds}) constante y el otro variable. En la familia de curvas $I_{ds} - V_{ds}$ se fija V_{gs} y se realiza un barrido en V_{ds} como se muestra en la Figura 2-5 (a). Para obtener la familia de curvas $I_{ds} - V_{gs}$ ahora se fija V_{ds} y se realiza un barrido en V_{gs} , al visualizar estas curvas en formato lineal se puede ver que antes del voltaje de encendido V_{th} la corriente se mantiene en cero, sin embargo si la visualizamos en formato semi-logarítmico se ve que ya existe un flujo de corriente incluso antes del encendido, ver Figura 2-5 (b).

⁵ Conductancia: facilidad que ofrece un material al paso de la corriente eléctrica, es inversamente proporcional a la resistencia.

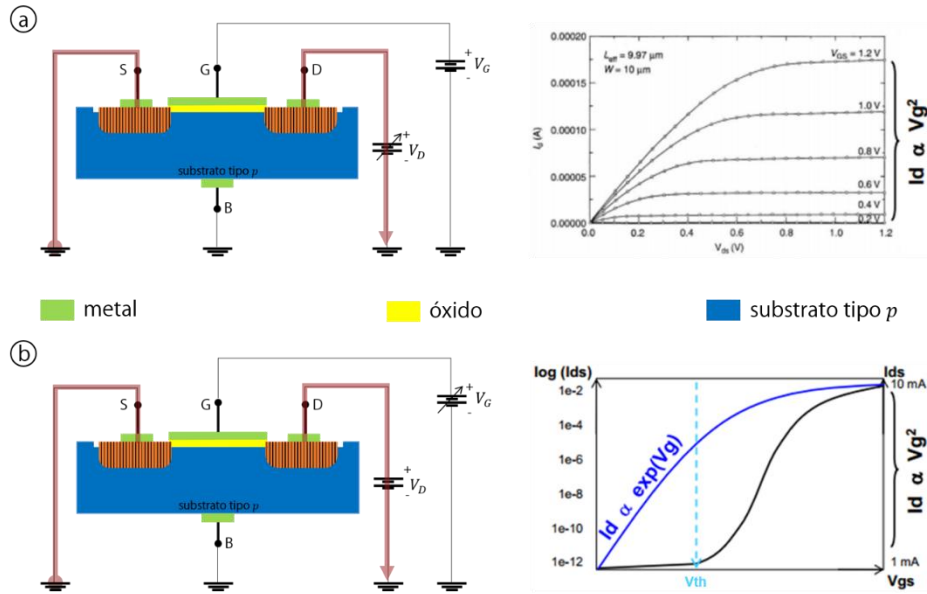


Figura 2-5 Curvas I_{ds} - V_{ds} y I_{ds} - V_{gs} características de un nMOSFET (a) Esquema de polarización necesario para obtener el set de curvas $I_{ds} - V_{ds}$ (b) Esquema de polarización necesario para obtener el set de curvas $I_{ds} - V_{gs}$

2.3 Ion-Sensitive Field-Effect Transistors (ISFET)

Un ISFET no es más que un transistor MOSFET cuya compuerta ha sido removida con el fin de exponer el óxido de compuerta al pH de una solución electrolítica. Un electrodo de referencia externo (de Ag/AgCl) se usa ahora como el electrodo que permite introducir un potencial constante o variable, al óxido de compuerta por medio de la solución electrolítica (cuyo pH a medir es desconocido), ver Figura 2-6.

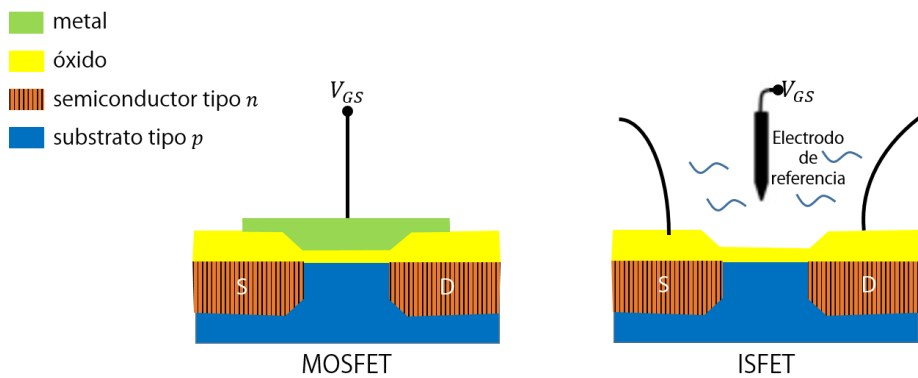


Figura 2-6 Representación esquemática de un (a) MOSFET y un (b) ISFET. Para el ISFET, el dieléctrico de compuerta se expone directamente a la solución electrolítica, generando un potencial en la interface dieléctrico/electrolito.

2.3.1 Mecanismo de sensado de un ISFET

En los ISFET, el óxido de compuerta del transistor se encuentra directamente expuesto a una solución iónica, debido a la redistribución de los iones de la solución en la proximidad de la superficie, se crea una doble capa eléctrica. Ésta ejerce una capacitancia en el canal, llamada capacitancia eléctrica de doble capa (EDLC, *Electrical Double-Layer Capacitance*). Esta capacitancia se puede controlar aplicando un potencial constante mediante un electrodo de referencia como se muestra en la Figura 2-7. En general, se usa un electrodo de referencia electroquímico (por ejemplo, un electrodo de Ag/AgCl) el cual permite generar un potencial de referencia constante y a su vez, permite introducir voltajes de polarización adicionales (constantes ó variables) en las soluciones. El espesor y otras propiedades electrostáticas de la doble capa dependen de la composición iónica de la solución y el voltaje aplicado a la estructura [12].

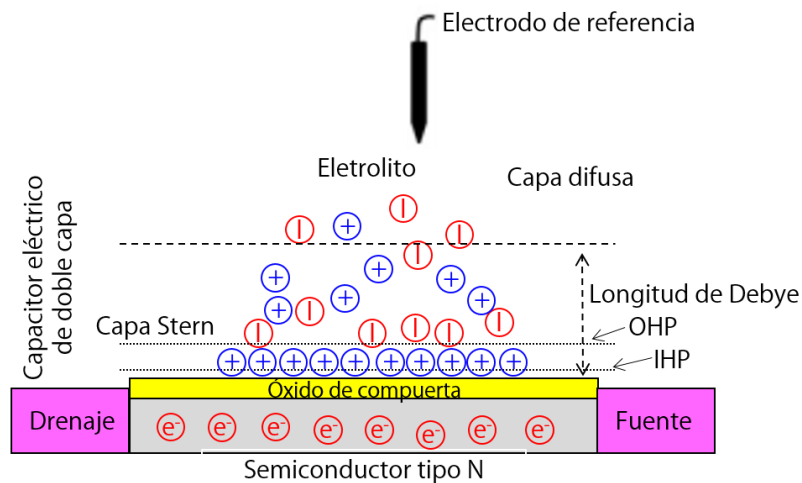


Figura 2-7 Representación microscópica de la formación de la doble capa eléctrica en una interfaz sólido-líquido de un ISFET. IHP, es el plano interno de Helmholtz limita la zona donde se encuentran los centros eléctricos de los iones adsorbidos. OHP, es el plano externo de Helmholtz el cual limita la zona más cercana a la que pueden encontrarse los iones solvatados.

La longitud de Debye se describe como la distancia sobre la cual el campo eléctrico es generado por portadores de carga móvil, tales como electrones o iones en solución. A distancias mayores que esta, las cargas en solución se equilibran con contraiones, lo que resulta en una carga neta cero. Para propósitos de biosensores, esta distancia es muy importante porque únicamente se pueden sensar los eventos que ocurren entre la superficie del sensor y la longitud de Debye [18].

Un ISFET de compuerta extendida (EG-ISFET) es una versión modificada del ISFET en la cual el óxido sensible a pH está desacoplado del óxido de la compuerta del transistor mediante el uso de una capa conductora extendida. Dado que el óxido de la compuerta del transistor está aislada de la solución de electrolito, crea una estructura más robusta para las mediciones a largo plazo dentro del líquido, ver Figura 2-8.

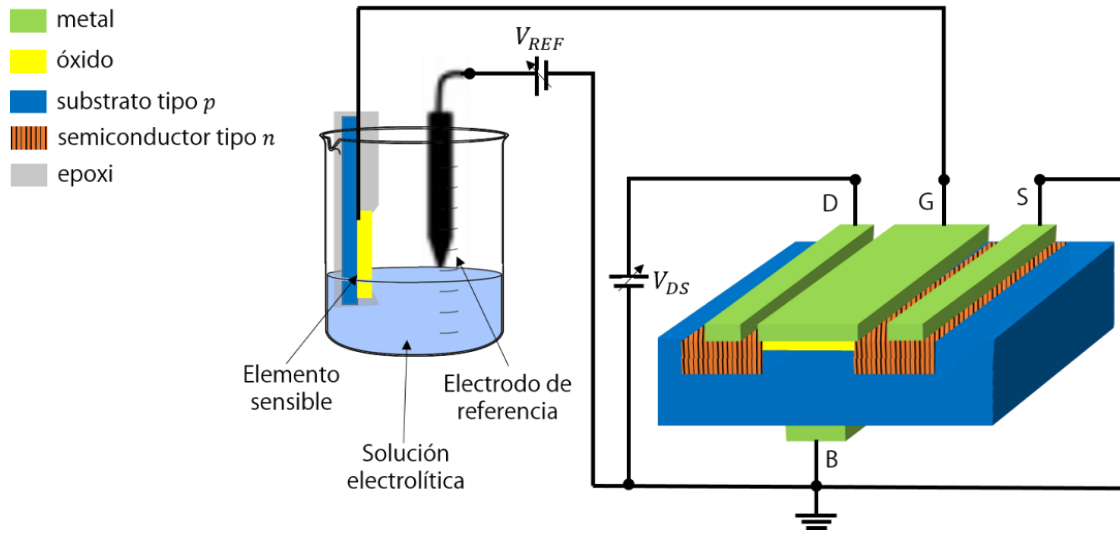


Figura 2-8 Estructura de un dispositivo EG-ISFET

2.3.2 Respuesta al pH de los ISFET

El modelo de sitios de enlazamiento [54] describe la respuesta de los materiales sensibles a iones de hidrógeno H^+ en soluciones acuosas. Los materiales aislantes que se usan como superficies sensibles son típicamente óxidos (por ejemplo, SiO_2 , Al_2O_3 , Ta_2O_5). La superficie de estos óxidos contiene una gran cantidad de sitios activos. Estos sitios son anfóteros, lo que significa que pueden actuar como donadores o aceptores de protones. Las únicas especies iónicas que pueden penetrar en el plano externo de Helmholtz son los hidrógenos $[H^+]$ y los iones hidroxilo $[OH^-]$, debido a sus pequeños tamaños y la falta de capa de solvatación, ver Figura 2-7. Es en esta zona donde los iones de interés $[OH^-]$, pueden generar un potencial en la interface electrolito-dieléctrico y el cual es dependiente de pH $\varphi(pH)$. La relación entre el potencial interfacial y el pH, sensibilidad al pH, está determinada por la capacidad intrínseca de la superficie del óxido para acomodar los iones de hidrógeno enlazadas a su densidad de sitios de enlazamiento [18].

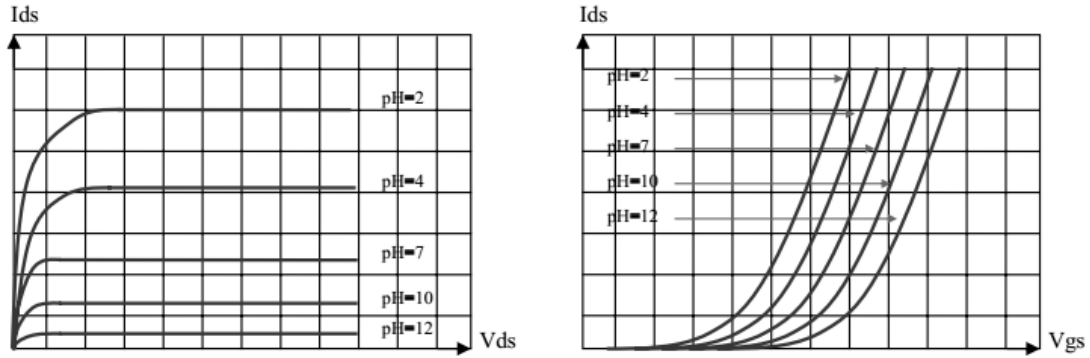


Figura 2-9 (a) Curvas I_{ds} - V_{ds} y (b) I_{ds} - V_{gs} características de un ISFET basado en un MOSFET canal n

Se pueden obtener las curvas $I_{ds} - V_{ds}$ e $I_{ds} - V_{gs}$ con dependencia del pH. Como se muestra en la Figura 2-9 para un ISFET canal N , se obtienen mayores niveles de corriente cuando se expone a soluciones con pH ácido. Estos desplazamientos en las curvas características se logran debido al incremento o disminución en el potencial interfacial electrolito-dieléctrico generado, el cual es dependiente del nivel de pH de la solución a analizar. Para el caso de las curvas $I_{ds} - V_{gs}$, es común obtener la sensibilidad del ISFET para la medición de pH, manteniendo un voltaje constante aplicado en drenaje, y medir el desplazamiento del voltaje de umbral como función de $[H^+]$, es decir:

$$S \rightarrow \Delta V_{th}(pH)$$

Donde S es la sensibilidad del ISFET para medir pH y tiene unidades de mV/pH .

3

Metodología

En este capítulo se presenta la metodología usada dentro de los laboratorios de Nanoelectrónica y Microelectrónica del INAOE y del laboratorio de Investigación en Microbiología Médica y Biotecnología de la UDLAP. Inicialmente se explica el proceso de fabricación de los EG-ISFETs con óxido de aluminio (Al_2O_3) y óxido de titanio (TiO_2) como superficie sensible, con una breve descripción teórica de cada etapa de fabricación. Una vez fabricados los sensores se les realiza un protocolo de caracterización donde se obtienen las curvas corriente-voltaje del transistor dependientes de pH, esto para conocer su sensibilidad. Finalmente se presenta el protocolo utilizado para realizar mediciones para detectar eventos de hibridación/desnaturalización de cadenas sencillas de ADN.

3.1 Fabricación de EG-ISFETs

Se fabricaron dispositivos con dos tipos de superficie sensible, Al_2O_3 y TiO_2 , sobre dos sustratos diferentes, vidrio tipo Corning Glass (2947) y silicio tipo $n <100>$. Inicialmente se realiza una limpieza al sustrato que garantiza su desengrasado y la ausencia de impurezas. Se procede a metalizar utilizando la técnica de metalización por e-beam. Después se deposita el óxido por medio de depósito por capas atómicas. Finalmente se encapsula sobre placas fenólicas de baquelita y se alambra a un transistor comercial MOSFET canal n . A continuación se detalla este proceso.

3.1.1 Limpieza inicial

Los sustratos se someten a un procedimiento de desengrasado y limpieza con tricloroetileno y acetona. Posteriormente se utilizan soluciones denominadas RCA I ($\text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{NH}_4\text{OH}$, 6:1:1) y RCA II ($\text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{HCl}$, 6:1:1) para eliminar la contaminación por metales pesados y por iones metálicos ligeros. En el caso de la oblea de silicio, se graba⁶ el óxido nativo en solución $\text{H}_2\text{O}:\text{HF}$, 7:1. Para comprobar que efectivamente se grabó se realiza prueba de hidrofobicidad. Después se realiza una inmersión en agua de alta resistividad ($\sim 17 \text{ M}\Omega$) para diluir cualquier remanente de impurezas. Para el silicio se graba de nuevo el óxido nativo y se comprueba hidrofobicidad. Finalmente se seca el sustrato mediante flujo de N_2 de alta pureza. En la Figura 3-1 se muestran fotografías de la campana utilizada, el enjuague en agua desionizada, el enjuague en agua de alta resistividad y el secado de una oblea de silicio.

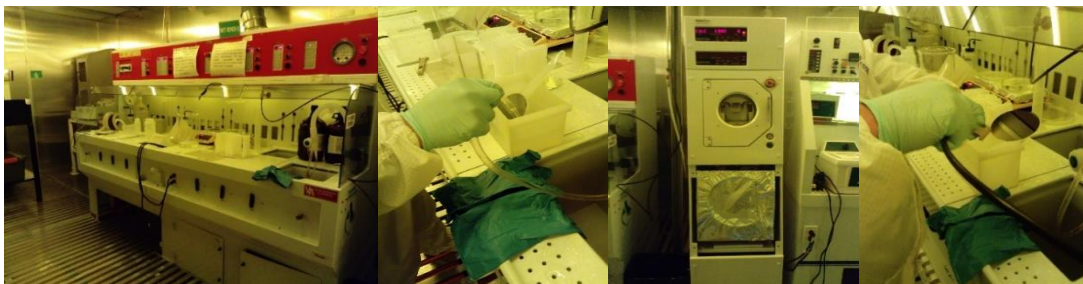


Figura 3-1 Procedimiento de limpieza de sustrato

⁶ Grabado: Proceso mediante el cual se eliminan las capas de SiO_2 , metales y polisilicio delimitados.

3.1.2 Metalización, depósito por evaporación e-beam

El depósito por evaporación es un método físico de depósito en fase vapor de películas delgadas. El depósito se realiza dentro de una cámara de alto vacío con una estructura parecida a la mostrada en la Figura 3-2 (a). El material a ser depositado, en forma de pellets, se coloca en el crisol que es calentado por el bombardeo de un haz de electrones de alta energía. El haz se focaliza al centro del fundente por medio de un control de campo magnético, esto hace que la contaminación sea mínima porque solo el haz de electrones está en contacto con la fuente de evaporación [54].

Cuando el material es calentado, sublima liberando vapor. Debido a que la presión de vacío dentro de la cámara es menor a 1 mtorr, los átomos en forma de vapor viajan en línea recta hasta que impactan sobre la superficie de la oblea, la acumulación de estos átomos sobre la oblea forma la película. Para obtener la mejor uniformidad en la película, se debe de realizar este proceso a bajas razones de depósito, lo que demanda un muy alto vacío que evita la contaminación de la película. Esta técnica presenta algunas desventajas: es muy difícil depositar aleaciones y debido al calentamiento por e-beam, se pueden causar daños por radiación en procesos MOS, sin embargo se pueden eliminar con un posterior tratamiento térmico [55].

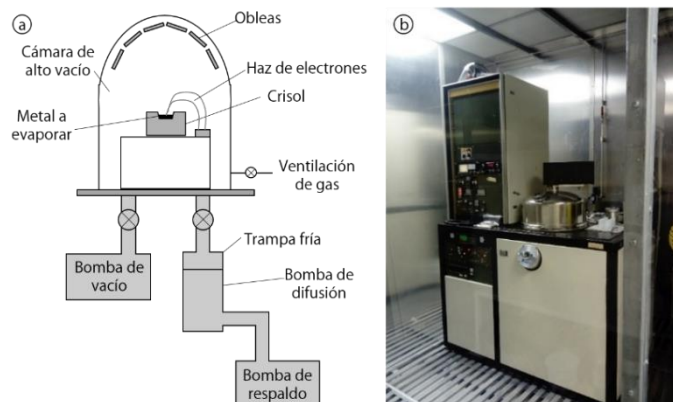


Figura 3-2 (a) Diagrama de un evaporador simple. (b) Evaporadora utilizada para el depósito de aluminio y titanio.

En este trabajo se depositan $\approx 400\text{nm}$ de aluminio sobre vidrio, a una razón de depósito de 2 \AA por minuto en condiciones de ultra alto vacío. También se depositan $\approx 400\text{nm}$ de titanio sobre vidrio y silicio, con las mismas condiciones.

3.1.3 Depósito de Al_2O_3 y TiO_2 por capas atómicas

El depósito por capas atómicas (ALD, por sus siglas en inglés) es un método químico de depósito de capas delgadas que aprovecha la reactividad de la superficie del sustrato sobre la cual se depositarán, de manera secuencial y altamente controlada, las películas de interés. La principal ventaja de ALD es su alta conformalidad sobre casi cualquier morfología. La segunda ventaja es el control del espesor de la película, esto porque el depósito es capa-a-capa logrando control a nivel atómico. Otra ventaja importante es el control en la composición química de la película. El proceso de ALD consiste principalmente en pulsos secuenciales y alternados de los precursores que reaccionan químicamente con el sustrato. Durante cada pulso se introduce un precursor a la cámara sometida a vacío (<1 Torr) durante un tiempo específico que permite que el precursor reaccione completamente con la superficie del sustrato a través de un proceso autolimitado, por lo que solo permite el depósito de una capa. Posteriormente, la cámara se purga con un gas portador inerte (N_2 o Ar) para eliminar cualquier precursor o subproducto que pueda quedar dentro de la cámara. Después se da el pulso del segundo precursor con su respectiva purga. En la Figura 3-3 se ilustra este proceso para un ciclo completo de depósito. El espesor de la película es controlado de manera precisa por el número de ciclos aplicados. Generalmente, el proceso de ALD se lleva a cabo a bajas temperaturas (<350 °C) [56].

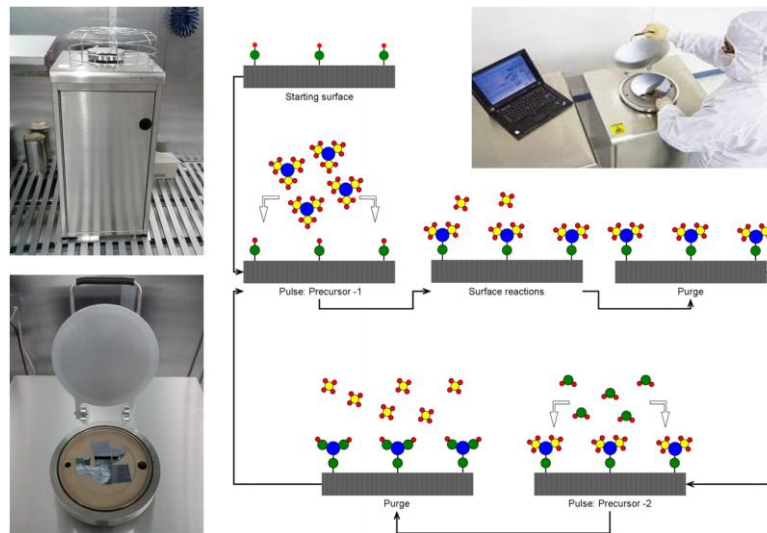


Figura 3-3 Proceso cíclico de Depósito por Capas Atómicas (ALD).

En nuestro caso, para el depósito de Al_2O_3 se utilizaron trimetil-aluminio (TMA) y agua (H_2O) como precursores de aluminio y oxígeno respectivamente, a una temperatura de depósito de

250°C, obteniendo un espesor promedio de 10 nm. El depósito de 10 nm de TiO₂ se realiza usando TDMAT y agua como precursores de titanio y oxígeno, a una temperatura de depósito de 250°C. Las razones de depósito para Al₂O₃ y TiO₂ es de 1 y 0.3 Angstroms por ciclo. Esto significa que para depositar 2 nm de estos óxidos metálicos, se requerirán de 20 y 51 ciclos completos de depósito ALD para Al₂O₃ y TiO₂ respectivamente.

3.1.4 Encapsulado de superficie sensible

El encapsulado⁷ es un paso importante en el proceso de fabricación de un sensor ISFET, ya que la naturaleza de estos sensores es estar inmersos en soluciones electrolíticas por lo que es indispensable que únicamente la superficie sensible esté expuesta.

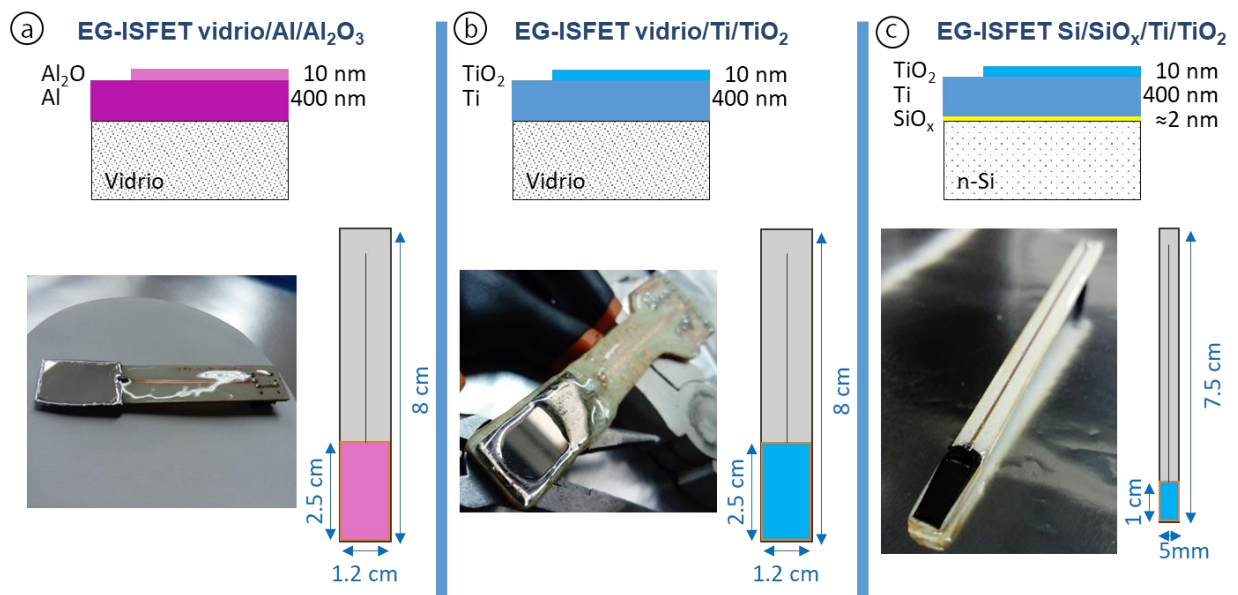


Figura 3-4 Corte transversal de los elementos sensibles, diagrama de PCB y fotografía de los dispositivos (a) Estructura EG-ISFET vidrio/Al/Al₂O₃ (b) Estructura EG-ISFET vidrio/Ti/TiO₂ (c) Estructura EG-ISFET Si/SiO_x/Ti/TiO₂

Las placas individuales se adhieren a placas fenólicas de baquelita (PCB), después se alambran⁸ hacia la terminal de la compuerta de un transistor comercial tipo n (ALD110804,

⁷ Encapsulado: Aplicación de una carcasa de protección a un circuito integrado que evita daños externos

⁸ Alambrear: Conectar

$V_{gs(TH)} = 0.4 V$). Formando transistores de efecto de campo sensibles a iones con compuerta extendida (EG-ISFET). Como último paso, todo el dispositivo es encapsulado con resina epóxica. La resina epóxica empleada endurece en un periodo de tiempo muy corto (aproximadamente 5 minutos) y fragua completamente en una hora.

Después de realizar el proceso descrito anteriormente se obtienen las superficies presentadas en la Figura 3-4, donde se muestra un diagrama del corte transversal de cada dispositivo, el diagrama del alambrado en PCB y una fotografía.

3.2 Caracterización electro-química (I-V-pH)

Después de la fabricación de los sensores químicos tipo EG-ISFET se emplea el siguiente material y equipo de laboratorio para su caracterización:

- J. T. Baker Buffer Solution pH = 10 (potasio K, concentración molar 0.094 – 0.114)
- J. T. Baker Buffer Solution pH = 7 (fosfato PO_4 , concentración molar 0.046 – 0.050)
- J. T. Baker Buffer Solution pH = 4 (biftalato de potasio, concentración molar 0.0498 – 0.052)
- HI-5074 pH = 7.41 Technical Buffer Solution
- HYCEL Buffer de referencia pH = 7.384 ± 0.005 a $25^\circ C$.
- HYCEL Buffer de referencia pH = 7.2 ± 0.02 a $25^\circ C$.
- Electrodo Ag/AgCl sat. con potencial asociado de 0.197 V
- Recipientes varios
- pHmetro Mettler-Toledo (modelo Seven Multi)
- Analizador de parámetros de semiconductores (SPA) modelo HP4155B

3.2.1 Mediciones I-V

La caracterización de los sensores EG-ISFET comienza con la extracción del conjunto de curvas características corriente-voltaje ($I - V$) del transistor n-MOSFET ALD110804, contrastando las curvas con las esperadas según la hoja de datos que proporciona el vendedor

[57], ver Figura 3-5 (a). Tal como se describió en la sección 2.2, para obtener las curvas $I_d - V_d$ (Figura 3-5 (b)) se hace un barrido en el voltaje de drenaje (0 – 10 V en pasos de 100mV) mientras el voltaje de compuerta se mantiene constante, para obtener el set de curvas, el voltaje de compuerta también se barre (0 – 5 V en pasos de 1 V). En el caso de las curvas $I_d - V_g$, el barrido ahora se da en el voltaje de la compuerta (0 – 10 V en pasos de 100mV) manteniendo constante el voltaje de drenaje (0 – 500 mV en pasos de 100 mV), ver Figura 3-5 (c) y (d).

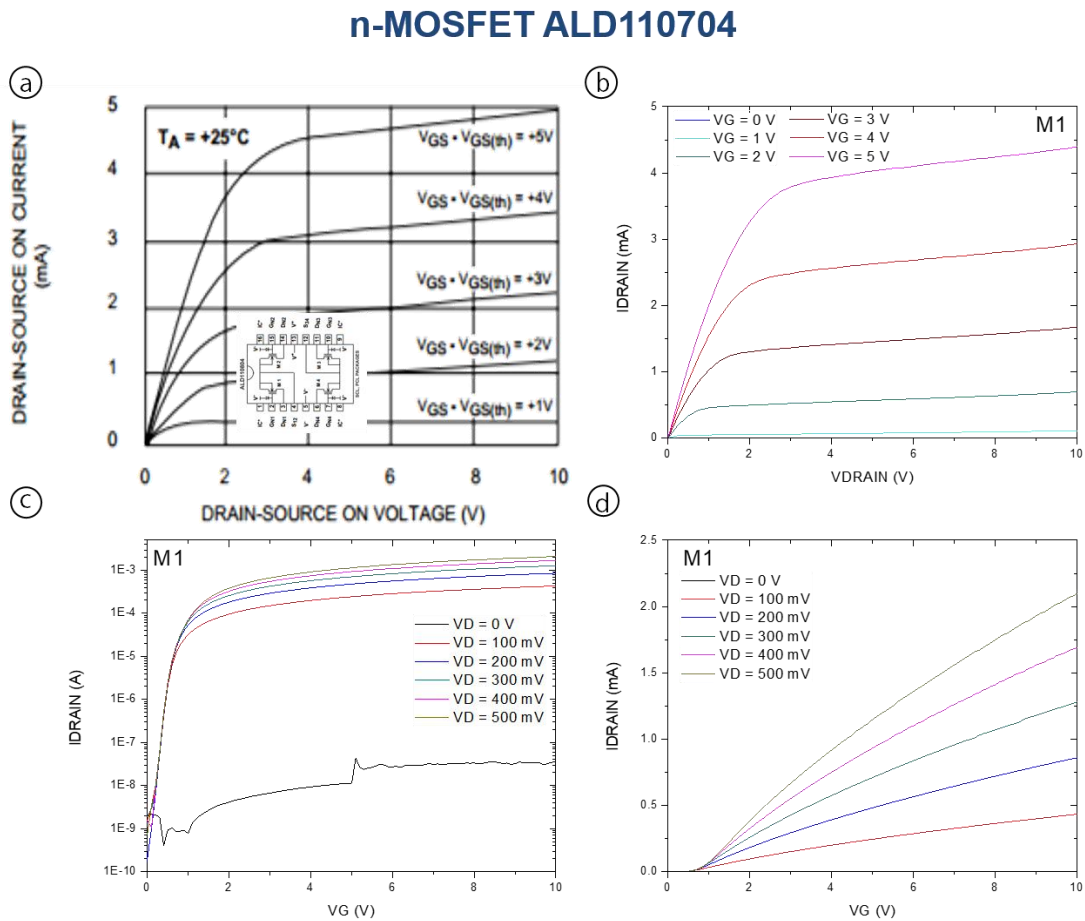


Figura 3-5 Curvas características I-V del nMOSFET ALD110804 (a) Curva $I_d - V_d$ proporcionada por el fabricante [57] (b) Curva $I_d - V_d$ (c) Curva $I_d - V_g$ semi-logarítmica (d) Curva $I_d - V_g$ lineal-lineal

Estas curvas $I - V$ son obtenidas mediante un analizador de parámetros de semiconductores (SPA HP4155B) y presentadas en la Figura 3-5. En la parte superior de la figura se muestra una comparación entre las curvas $I_d - V_d$ esperadas y las curvas medidas, es evidente que en las curvas medidas con el SPA los niveles de corriente de drenaje son menores por aproximadamente 500mV, esto se debe a que el voltaje aplicado en la compuerta en las curvas

dadas por la hoja de datos es mayor, por ejemplo: $V_{gs} = +5V + V_{gs(TH)}$, con $V_{gs(TH)} = 0.4 V$. En la parte inferior de esta misma figura están las curvas $I_d - V_g$ en formato semi-logarítmico y lineal, con esta familia de curvas podemos observar que efectivamente el voltaje de encendido del transistor se encuentra en $0.4 V$ como menciona el fabricante.

3.2.2 Mediciones I-V-pH

Una vez comprobado el correcto funcionamiento del transistor, se realizan ciclos de caracterización electroquímica con el fin de obtener la sensibilidad de los dispositivos. Los dispositivos son sumergidos en $20 ml$ de solución buffer de pH, de J.T. Baker, con valores de pH de 10, 7 y 4. El ciclo de medición empleado va de la solución básica a ácida y de regreso, como puede observarse en la Figura 3-6 (a). El diagrama eléctrico para realizar las mediciones de pH de las soluciones se muestra en la Figura 3-6 (b).

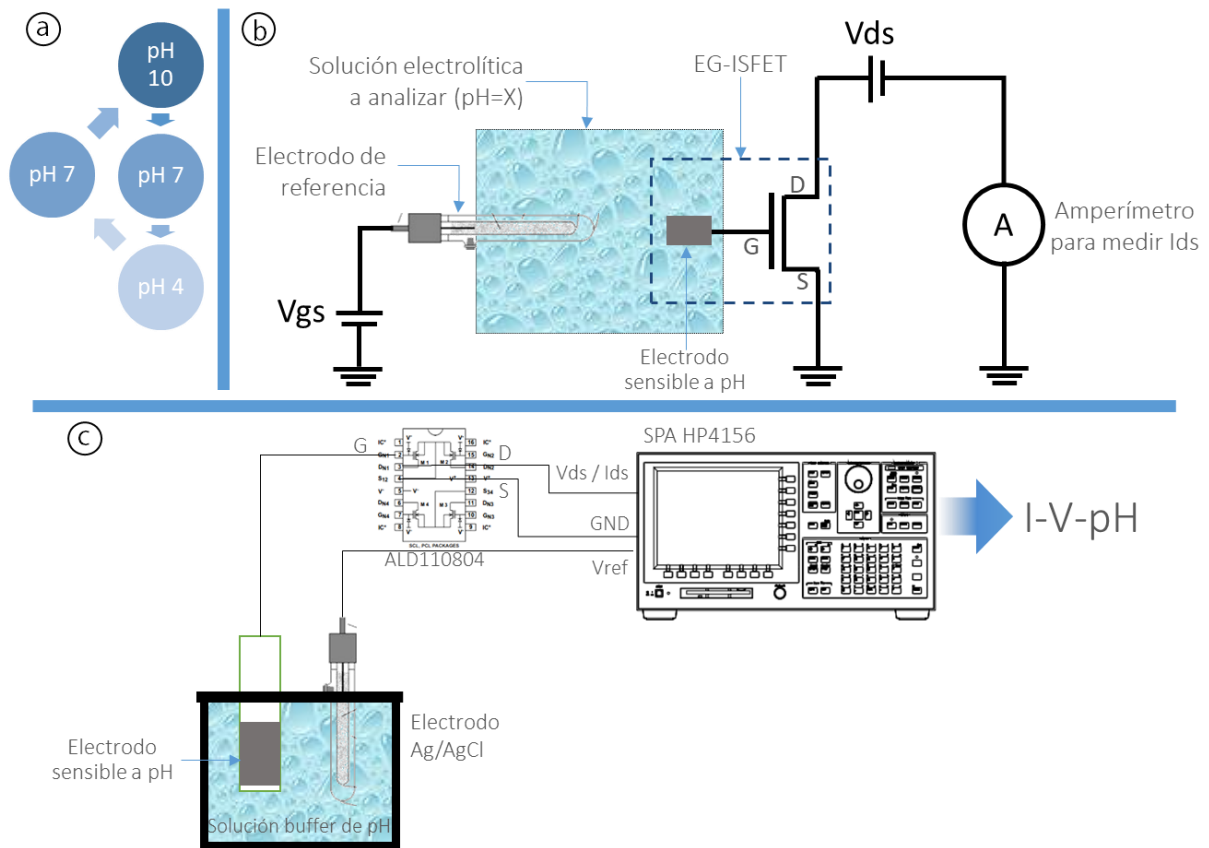


Figura 3-6 (a) Ciclo de pH empleado para la caracterización de los dispositivos. (b) Esquema eléctrico para realizar las mediciones de pH de las soluciones. (c) Diagrama básico de conexiones utilizado para caracterizar

electroquímicamente los electrodos sensibles a pH y conectados a un transistor MOS comercial (EG-ISFET).

Las curvas $I_d - V_d$ e $I_d - V_g$ dependientes de pH son obtenidas mediante un analizador de parámetros de semiconductores (SPA HP4155B) con un esquema de medición como el que se muestra en la Figura 3-6 (c). Se utilizan los siguientes voltajes:

Tabla 2 Voltajes aplicados para obtener las curvas I_d-V_g y I_d-V_d dependientes de pH

	$I_d V_g$	$I_d V_d$
V_g	0-5 V	3 V
V_d	500 mV	0-2 V

Una solución buffer presenta estabilidad en su nivel de pH por un tiempo prolongado, por esto se utilizan durante la caracterización de los EG-ISFET asegurando que mantienen una concentración de iones constante durante toda la medición.

Como se mencionó en la sección 2.3 de este documento, el objetivo del electrodo de referencia es fijar un potencial estable y reproducible a partir del cual pueda generarse un canal de conducción entre la fuente y el drenaje del ISFET. Un electrodo de referencia de plata-cloruro de plata (Ag-AgCl) con potencial asociado de 0.197 V es usado durante todas las mediciones.

Para comprobar que las soluciones buffer mantienen el pH marcado por el fabricante, se midieron sus niveles de pH usando un pHmetro Mettler-Toledo con un electrodo combinado (electrodos de ion selectivo (ISE) unido al electrodo de referencia). Los niveles de pH coincidieron con lo esperado. También se comprobó que el electrodo de referencia mantuviera el potencial asociado midiendo, mediante un voltímetro, la diferencia de potencial que existe entre el electrodo utilizado (Ag/AgCl) y otro del mismo tipo, obteniendo una diferencia de 0.1 mV, este valor pequeño indica que los electrodos mantienen su potencial.

3.2.3 Sensibilidad

Después de obtener las curvas $I_d - V_g$ según el protocolo expuesto anteriormente a diferentes niveles de pH, los datos son graficados y se extrae la sensibilidad en voltaje. La sensibilidad se expresa en términos del desplazamiento del voltaje de umbral V_{th} . El voltaje de umbral es obtenido mediante el método de extrapolación lineal [58]. El cual necesita de la curva $I_d - V_{gs}$ y la curva de la transconductancia. La transconductancia (g_m) está definida por:

$$g_m = \frac{d\sqrt{I_d}}{dV_{gs}}$$

Se obtiene el punto máximo de la curva de la transconductancia, y desde este punto se dibuja una línea horizontal para encontrar el punto en el que intercepta con la curva $I_d - V_{gs}$. Este es utilizado para trazar una línea tangencial a la curva $I_d - V_{gs}$, y finalmente el valor del voltaje V_{th} está dado por el valor de V_g donde intercepta esta línea tangente. Este procedimiento se muestra en la Figura 3-7, donde para ese sistema de polarización el voltaje de umbral obtenido es de $V_{th} = 0.95V$.

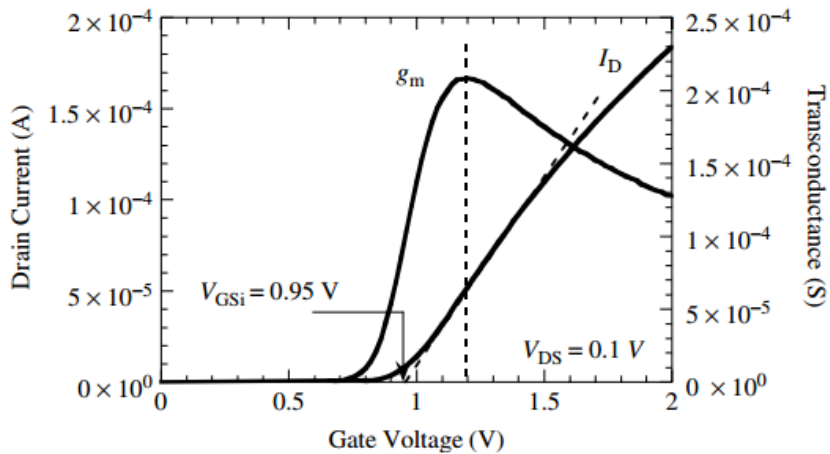


Figura 3-7 Determinación del voltaje de umbral V_{th} del transistor mediante el método de extrapolación lineal.
 $V_{ds} = 0.1V$, $t_{ox} = 17nm$, $W/L = 20\mu m/0.8\mu m$

3.2.4 Mediciones I-V-tiempo

Se realiza una medición de la corriente de drenaje en el tiempo ($I_d = f(t)$), al graficar se espera una tendencia tipo “escalera” donde la corriente sea mayor para soluciones ácidas y menor para soluciones básicas, como se muestra en la Figura 3-8. Como se puede apreciar, la medición se realiza con una polarización V_{ds} constante (de manera que se logre saturación en las curvas $I_d - V_d$). Entonces, para las mediciones se utiliza un voltaje de referencia constante, $V_{ref} = 3 V$, con $V_{ds} = 500 mV$. Manteniendo V_{ref} y V_{ds} constantes, es posible monitorear el cambio de I_{ds} en función de pH y tiempo: $I_{ds} = f(pH, time)$, tal y como se observa en la Figura 3-8.

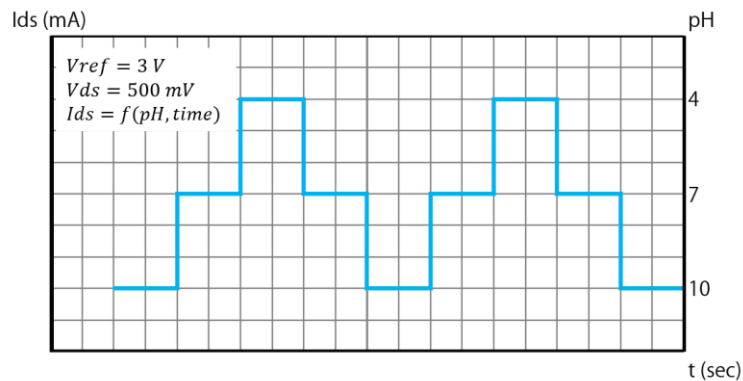


Figura 3-8 Medición de la corriente de drenaje en el tiempo (V_{ref} y V_{ds} se mantienen constantes).

3.2.5 Efecto de la temperatura e iluminación en la respuesta de EG-ISFET basado en ALD-TiO₂

Existen factores ambientales, tales como la temperatura y la iluminación, que modifican la respuesta de los EG-ISFET. Lo anterior es debido a que estos factores pueden generar portadores de carga en exceso, que deben de sumarse o restarse a la carga generada únicamente por las condiciones de polarización. Para comprobar el efecto que estos factores tienen en los dispositivos con TiO₂ como elemento sensible se realizaron mediciones $I_d - V_g$, $I_d - V_d$ e $I - V - tiempo$ de las soluciones buffer con una temperatura de 10°C, 20°C y 40°C (Figura 3-9 (a)); y con luz natural dentro del laboratorio (luz solar más luz de luminaria

incandescente) y utilizando una caja negra que no permite el paso de la luz. Se utilizó la misma configuración y parámetros de barrido mostrados en la sección 3.2.

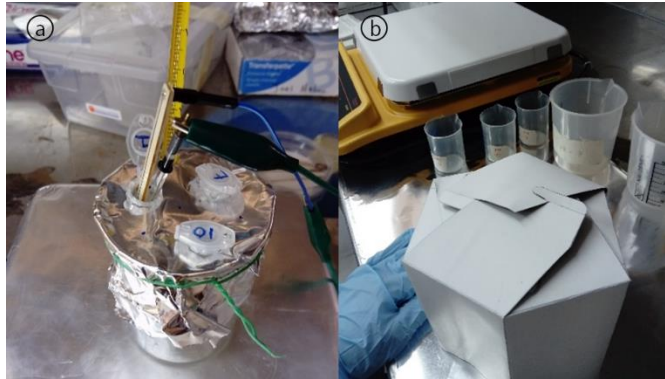


Figura 3-9 Medición del efecto de cambio de (a) temperatura y (b) iluminación en sensores TiO_2 EG-ISFET

3.2.6 Mediciones I-V-tiempo para cambios de 0.1 en pH

Ya que el principal objetivo de este trabajo es aplicar estos dispositivos para la detección de la hibridación o desnaturalización de cadenas cortas de ADN, y según algunos estudios reportados anteriormente [11-12], la hibridación de un par de bases genera un cambio en la corriente de drenaje de menos de 0.01 pH/base . Se realizan mediciones de I-V-pH-tiempo con cambios en pH de 0.1 para determinar la sensibilidad y repetibilidad en la respuesta de los dispositivos EG-ISFET con cambios pequeños de pH, siguiendo el ciclo de medición mostrado en la Figura 3-10.

Se utilizan los mismos valores en voltaje de referencia y voltaje de drenaje, es decir $V_{ref} = 3 \text{ V}$ y $V_{ds} = 500 \text{ mV}$, realizando monitoreo de la corriente de drenaje con cada solución por un minuto. Después, se realiza un enjuague con agua desionizada tanto del EG-ISFET como del electrodo de referencia, en paralelo se añade cierta cantidad de solución ácida o básica a la solución para lograr el cambio en 0.1 de pH, como se explica a continuación. Para asegurar que el incremento o disminución en pH obtenido es el deseado, se realiza una medición del pH usando un pHmetro Mettler-Toledo (modelo Seven Multi).

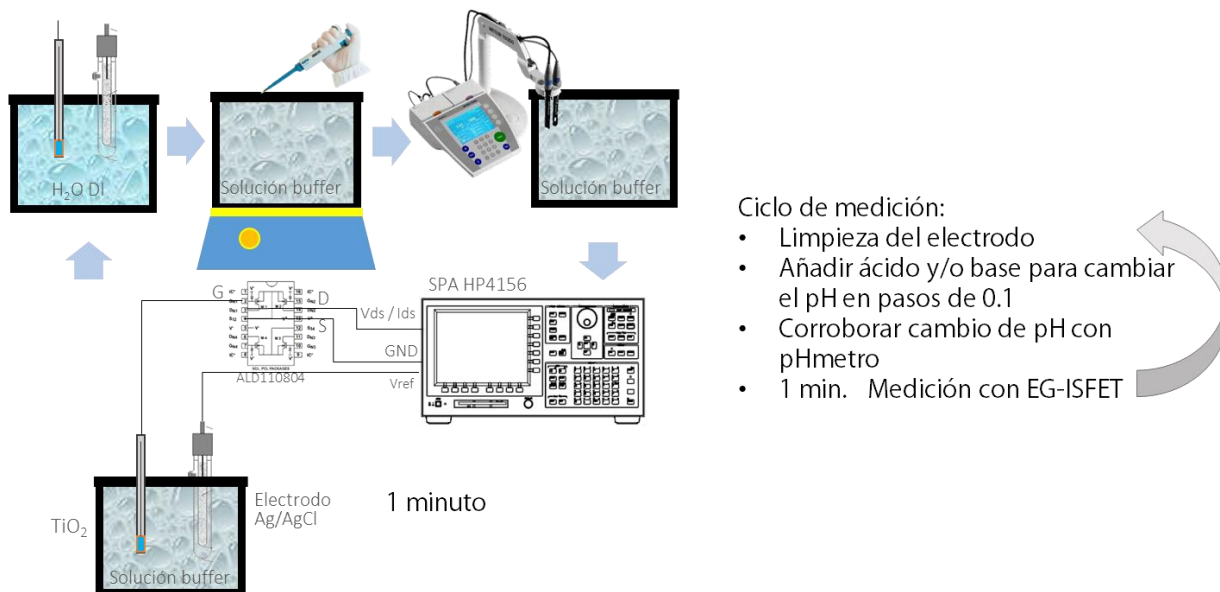


Figura 3-10 Ciclo de medición I-V-pH-tiempo con cambios en pH de 0.1

Para preparar la solución buffer (250 mL) desde un pH ácido hasta uno más básico y viceversa se utiliza ácido fosfórico (H_3PO_4) e hidróxido de sodio (NaOH). De pH 6.8 a 7.3 se mantiene una concentración del H_3PO_4 de 10 mM y utilizando la ecuación de Henderson-Hasselbach [59], la cual se muestra a continuación, se calcula la concentración de NaOH.

$$pH = pK_A + \log_{10} \frac{[base\ conjugada]}{[ácido]}$$

Donde: pK_A es el logaritmo natural de la constante de disociación ácida de un ácido débil.

Como las soluciones stock⁹ del ácido y base están en estado líquido se realiza la conversión a volumen. Finalmente se resta el volumen de NaOH presente en la solución al que se necesita para mantener el siguiente nivel de pH, se muestra en la última columna de la Tabla 3, este volumen es el que se irá agregando. Del pH 7.3 a 6.8 es necesario incrementar la concentración del ácido y calcular como se explicó anteriormente los volúmenes a agregar de ácido y base. En resumen, para cambiar el pH de la solución buffer preparada de pH 6.8 a 7.3 se agrega únicamente base y para ir de pH 7.3 a 6.8 se incorpora tanto ácido como base.

⁹ Solución stock: Solución con composición concentrada.

Tabla 3 Volumen a agregar para llevar de pH 6.8 a 7.3 y viceversa una solución de ácido fosfórico (H_3PO_4) e hidróxido de sodio (NaOH)

pH	Concentraciones		Volumen		Por pasos
	[H_3PO_4]/mM	[NaOH]/mM	v H_3PO_4 /uL	v NaOH/uL	v NaOH/uL
6.8	10.0	13.8690	500	693.5	
6.9	10.0	14.4270	500	721.4	27.9
7.0	10.0	15.0000	500	750.0	28.7
7.1	10.0	15.5730	500	778.7	28.6
7.2	10.0	16.1320	500	806.6	27.9
7.3	10.0	16.6620	500	833.1	26.5
7.2	11.0	550	887.3	50.0	54.2
7.1	12.0	600	934.4	50.0	47.2
7.0	13.0	650	975.0	50.0	40.6
6.9	14.0	700	1009.9	50.0	34.9
6.8	15.0	750	1040.2	50.0	30.3
[Solución stock]		5.0	M		
Volumen		250	mL		
Capacidad buffer		10	mM		

Para asegurar que la solución mantiene la concentración iónica por, al menos, 5 minutos se mide el pH con un pHmetro de manera discontinua, tomando una medición cada minuto después de agregar el ácido y/o base, y se grafica uniendo estos puntos en la Figura 3-11. Se observa que la solución mantiene el pH en este periodo, lo que garantiza que mientras se realiza la medición con los EG-ISFET la solución se comporta como una solución buffer.

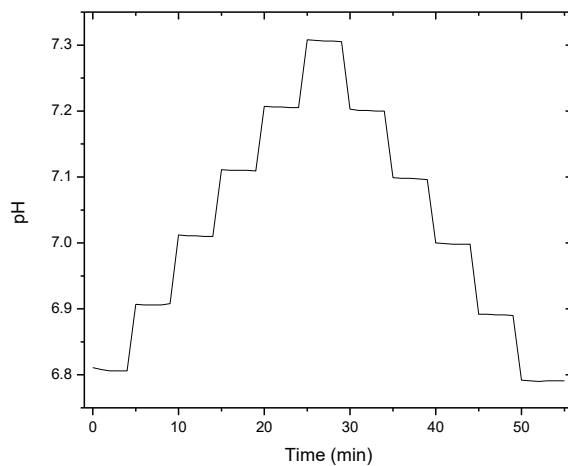


Figura 3-11 Medición del pH de la solución sometida a cambios de 0.1 en pH con pHmetro Mettler-Toledo

3.3 Pruebas de hibridación/desnaturalización de cadenas sencillas de ADN

Se solicitaron oligonucleótidos con una longitud de 20 unidades monoméricas, se resuspendieron en solución buffer TE pH 8. En el laboratorio de Investigación en Microbiología Médica y Biotecnología de la UDLAP se comprobó mediante la medición de la absorbancia a 260 nm que se realizara la naturalización y desnaturalización. Se caracterizó la respuesta de los EG-ISFET del medio donde se encuentran suspendidos los oligos (buffer TE). Y finalmente se midió el pH y la corriente de drenaje del EG-ISFET durante la naturalización y desnaturalización de poly-A & poly-T y poly-C & poly-G. A continuación se detalla este proceso.

3.3.1 Resuspensión de oligonucleótidos en solución buffer TE

Se solicitó la síntesis de cadena sencilla de ADN en escala de 10nm, marca MWG. Se resuspendieron los oligonucleótidos en solución buffer TE pH 8 (10 mM Tris, 1 mM EDTA), hasta alcanzar una concentración de 1 nmol/ μ l en cada oligo con longitud de 20 unidades monoméricas. En la Tabla 4 se muestran las secuencias de los oligos y su concentración inicial.

Tabla 4 Secuencia oligonucleótidos

Oligonucleótido secuencia (5' a 3')	Concentracion inicial [nmol]	Absorbancia a 260 nm
AAAAA AAAAA AAAAA AAAAA	33.1	0.055
TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT	49.7	0.062
GGGGG GGGGG GGGGG GGGGG	45.8	0.066
CCCCC CCCCC CCCCC CCCCC	40.7	0.030

Se preparó el buffer TE de la siguiente forma:

Tris-Cl, 0.5 M Disolver 3.032 g Tris base [tris(hidroximetil)aminometano] en 40 ml de H₂O destilada. Ajustar a pH 8 usando HCl concentrado (32 gotas). Aforar a 50 ml con H₂O destilada.

EDTA, 0.25 M Disolver 1.88 g EDTA [sal disódica del ácido etilendiamino tetraacético] en 15 ml de H₂O destilada. Ajustar a pH 8 usando NaOH concentrado (42 gotas) bajo agitación. Aforar a 20 ml con H₂O destilada.

Buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA) 400 µl 0.5 M Tris-Cl, pH 8 (final 10 mM). 80 µl 0.25 M EDTA, Ph 8.0 (final 1 mM). Aforar a 20 ml con H₂O destilada.

Se diluyó 10 µl de cada oligo con concentración de 1 nmol/µl en 990 µl de buffer TE. Finalmente, la concentración molar de las suspensiones A-T y C-G fue de 1×10^{-6} M

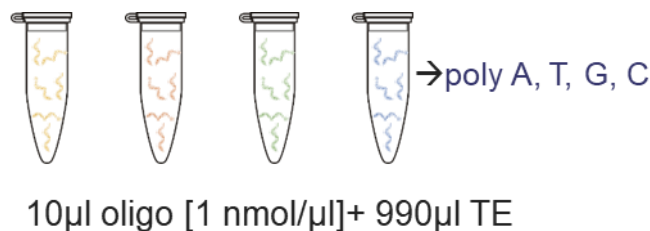


Figura 3-12 Dilución de oligonucleótidos

Todo esto se trabajó con líquidos, puntas y tubos para micro centrífuga de 1.5 ml y 5 ml esterilizados. Se utilizaron tubos para micro centrífuga marca Eppendorf de PCR que garantizan una correcta transferencia de calor.

3.3.2 Comprobación de hibridación

Un método para determinar la naturalización y desnaturalización del ADN se basa en la medición de la absorbancia a 260 nm en función de la temperatura, al graficar estos datos se obtiene la curva de fusión del ADN como la que se muestra en la Figura 3-13. Se observa que la absorbancia permanece constante hasta temperaturas más altas de las fisiológicas, esto significa que el ADN permanece en doble hélice. La absorbancia empieza a aumentar cuando

comienzan a romperse los puentes que mantienen unidas las dos hebras. Este aumento se debe a que las bases apiladas dentro del ADN facilitan el blindaje a la luz, por lo tanto la absorbancia de la luz UV del ADN de doble hélice es mucho menor que el ADN de una sola hebra, conocido como efecto hipocrómico del ADN [3]. Por lo tanto cuando las dos hebras están completamente separadas se obtendrá una absorbancia máxima.

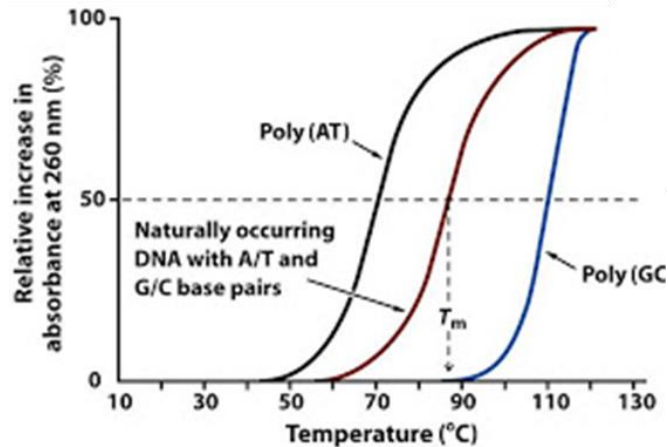


Figura 3-13 Curva de absorbancia para determinar la temperatura de fusión de cadenas de ADN

Se combinaron las pares de bases complementarias (adenina-timina y guanina-citosina) como se muestra en la Figura 3-14. Se colocaron las muestras de A-T y C-G en un bloque de calentamiento dentro de una hielera para comenzar con una temperatura de 11°C. Se fue incrementando la temperatura y midiendo la absorbancia a 260nm en una celda de cuarzo de 1ml con el espectrofotómetro UV – 1800 SHIMADZU. Al mismo tiempo se realizó la medición de la temperatura con un termopar tipo J.

También se hizo la comprobación de la hibridación al pasar de una temperatura baja (10°C), a la cual debe estar hibridado, a una temperatura alta (65°C), donde los pares de bases deben estar desnaturalizados. Estos cambios de temperatura se realizan en tiempos cortos, para corroborar si en dos minutos y medio ya se da la naturalización y desnaturalización de las cadenas.

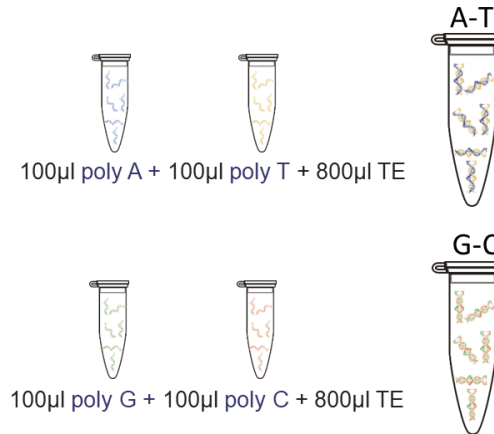


Figura 3-14 Combinación de pares base complementarias

3.3.3 Caracterización (pH e I_{drain}) del buffer TE con cambios en temperatura

Se realizó la caracterización del medio donde se encuentran resuspendidas las cadenas cortas de ADN. Esto es útil para diferenciar la respuesta única del medio de la tendencia que se presenta al naturalizarse o desnaturalizarse el ADN. Se realizó una medición discontinua en el tiempo, incrementado la temperatura y obteniendo las curvas $I_d - V_g$, $I_d - V_d$ e $I - V - tiempo$. Se obtuvo una medición continua en el tiempo calentando el oligonucleótido con ayuda de un *baño maría* de agua desionizada, se realizó la medición de la temperatura con un termopar como se muestra en la Figura 3-15. Inicialmente se incrementó la temperatura de 22°C a 55°C en 4 minutos y se midió la tendencia de la solución buffer, posteriormente se realizó este incremento en 11 minutos de 22°C a 55°C, lo cual nos permite obtener un incremento lineal en temperatura. Todas estas mediciones de corriente de drenaje se realizaron con un EG-ISFET con superficie sensible de TiO₂ depositado sobre Ti/TiO₂/Si, ya que los electrodos de TiO₂/Ti que se encuentran sobre vidrio no pudieron ser cortados en pequeñas dimensiones.

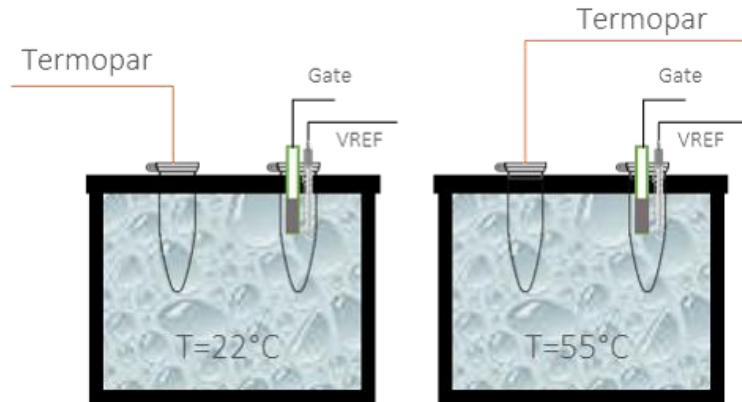


Figura 3-15 Calentamiento buffer TE en baño maría.

3.3.4 Medición pH e I_{drain} durante la hibridación de poly-A & poly-T y poly-C & poly-G

Se realizaron mediciones de la corriente de drenaje manteniendo constante $V_D = 500mV$ y $V_{REF} = 3V$ con un cambio de temperatura rápido, medición por 4 minutos, y con un cambio de temperatura lineal, medición por 11 minutos. Esto con los dispositivos Si/SiO_x/Ti/TiO₂ EG-ISFET. El experimento fue repetido tres veces. Todos estos resultados experimentales se presentan y discuten en el siguiente capítulo.

4

Resultados experimentales y discusión

Se fabricaron EG-ISFETs (transistores de efecto de campo sensibles a iones con compuerta extendida) con óxido de aluminio (Al_2O_3) y óxido de titanio (TiO_2), como superficie sensible a iones de hidrógeno. Consiguiendo una sensibilidad de 68 mV/pH para la estructura Glass/Al/ Al_2O_3 , 54 mV/pH para la estructura Si/ SiO_x /Ti/ TiO_2 y 51 mV/pH para Glass/Ti/ TiO_2 . Estas son sensibilidades altas comparadas con un ISFET comercial basado en nitruro de silicio (Si_3N_4), como superficie sensible, cuya sensibilidad medida fue de 46.5 mV/pH . Usando estas estructuras y un MOSFET comercial (ALD110804) se lograron detectar los eventos de desnaturalización de cadenas de 20 pares de bases de ADN suspendidas en solución buffer TE ($\text{pH} = 8$), sin necesidad de un paso de marcaje o inmovilización de las hebras de ADN. Obteniendo un cambio en la tendencia de la corriente

de drenaje de $47\mu A$ para las cadenas de adenina y timina, cuando la temperatura era de $45^{\circ}C$. Para la citosina y guanina se obtuvo un cambio de $41\mu A$ a $48^{\circ}C$. Esta respuesta no es debida a la unión covalente entre los grupos fosfatos en la estructura del ADN sino a los fenómenos termodinámicos que mantienen unida la doble hélice. En este capítulo se presentan y discuten todos estos resultados.

4.1 Mediciones I-V-pH

4.1.1 ISFET basado en Si_3N_4 como dieléctrico sensible a pH

Se caracterizó un sensor de iones comercial ISFET CNM (Centro Nacional de Microelectrónica, Barcelona), su set de curvas características $I_d - V_g - pH$ e $I_d - V_d - pH$ se muestran en la Figura 4-1 (a) y (b). Obteniendo una sensibilidad de $46.5 mV/pH$ (ver Figura 4-1(c)) este valor es bajo en comparación con el rango reportado por sus fabricantes de $50 - 58 mV/pH$ [60]. Al realizar la medición en oscuridad se lograron obtener valores de sensibilidad dentro de este rango, $58 mV/pH$. Además se aprecia que en condiciones de luz de laboratorio se tienen ventanas iguales entre los diferentes niveles de pH, y cuando se encuentra en oscuridad, pese a que se incrementa la sensibilidad, cambian estas ventanas, cambiando su respuesta en el segundo ciclo de mediciones.

Esta disminución en la sensibilidad cuando hay presencia de iluminación se debe a efectos de fotogeneración del silicio debido a que en este dispositivo, toda la estructura del ISFET (fuente y drenaje) se encuentran aislados del electrolito únicamente por una resina epóxica y en consecuencia, la zona del canal de inversión está completamente expuesta a la luz incidente. Por lo tanto, el canal que conecta fuente y drenaje, ahora también tiene una combinación de portadores fotogenerados, la cual, para términos prácticos, disminuye la sensibilidad final del ISFET.

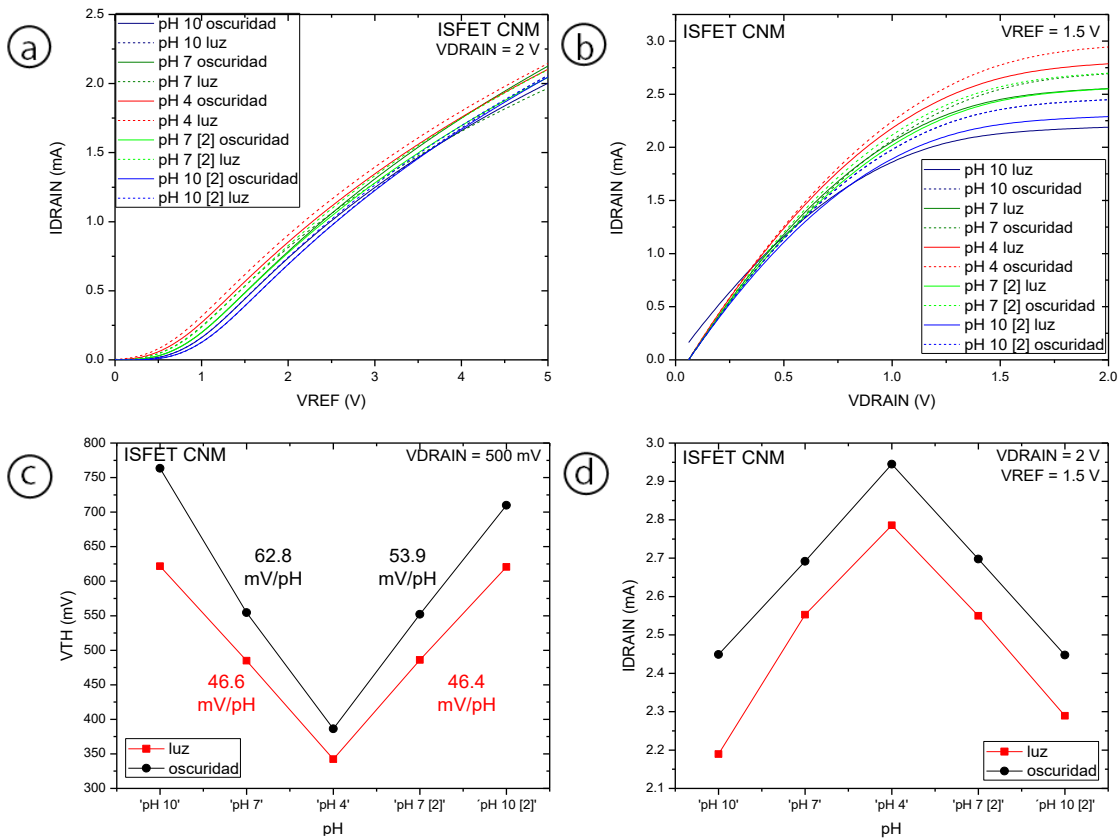


Figura 4-1 Caracterización eléctrica de un ISFET comercial bajo condiciones de luz y oscuridad (a) Curvas $I_d - V_g - pH$ (b) Curvas $I_d - V_d - pH$ (c) Sensibilidad obtenida a partir del voltaje de encendido del transistor (V_{th}) (d) Corriente de drenaje medida cuando $V_d = 2$ V y $V_{ref} = 1.5$ V con los diferentes niveles de pH.

4.1.2 EG-ISFET basado en ALD- Al_2O_3

Se obtuvieron las curvas $I_d - V_g - pH$ de la estructura Glass/Al/ Al_2O_3 conectada a un transistor comercial VN0104 con $V_{th} = 0.8$ V – 2.4 V mostradas en la Figura 4-2 (a). Se observa que se obtiene una sensibilidad con respecto al voltaje de encendido de ≈ 67.5 mV/pH en esta medición.

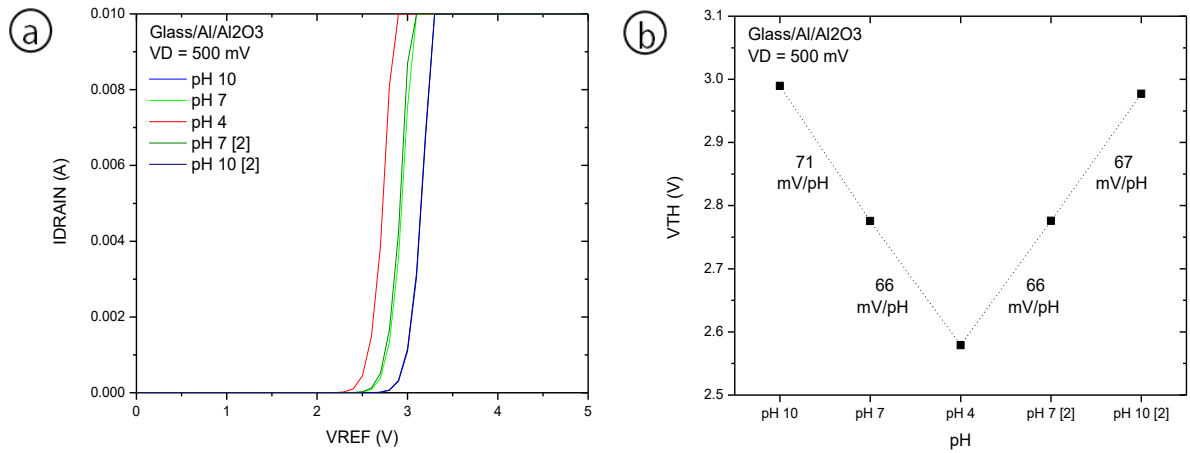


Figura 4-2 (a) Curva I_d - V_g -pH de estructuras Glass/Al/Al₂O₃ MOSFET comercial (VNO104) (b) Sensibilidad con respecto al V_{th}

4.1.3 EG-ISFET basado en ALD-TiO₂

Se trabajó con óxido de titanio como elemento sensible a pH debido a su alta biocompatibilidad, estabilidad química y propiedades antimicrobianas ya que se utilizará como biosensor de cadenas de ADN. En la Figura 4-3 se muestran las curvas más importantes para caracterizar electro-químicamente al TiO₂ depositado sobre dos medios diferentes, del lado derecho se muestran todas las curvas con vidrio como sustrato y del lado izquierdo las del silicio como sustrato. Se utilizó el mismo transistor y la misma configuración descrita en la sección 3.3 de este trabajo para los dos sustratos.

El primer set de curvas (Figura 4-3 (a)) muestra la curva $I_d - V_g - pH$, la curva en negro es el comportamiento únicamente del transistor ALD110804 manteniendo $V_d = 500mV$. Se aprecia que para el silicio esta curva es muy parecida a la que se obtiene con un pH de 7, y se muestran los correspondientes corrimientos hacia la derecha cuando se mide una solución básica y hacia la izquierda con una solución ácida. En el caso del vidrio todas las curvas se encuentran a la derecha de la obtenida únicamente del transistor, esto significa que al medir cualquier solución, siempre será mayor el voltaje de encendido, y estará en función de pH.

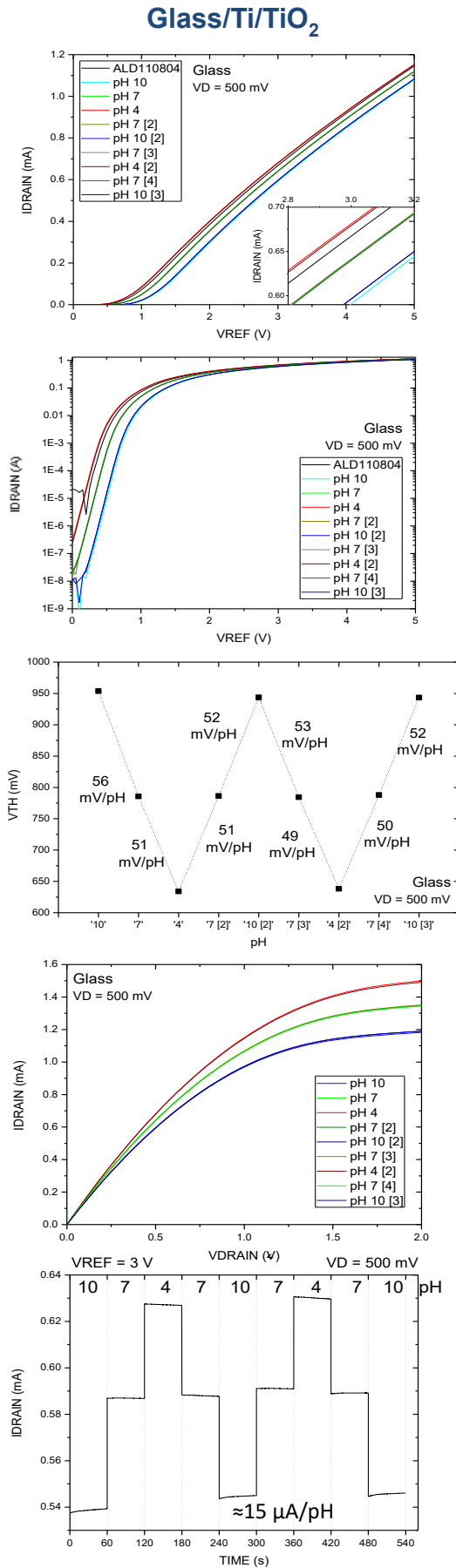
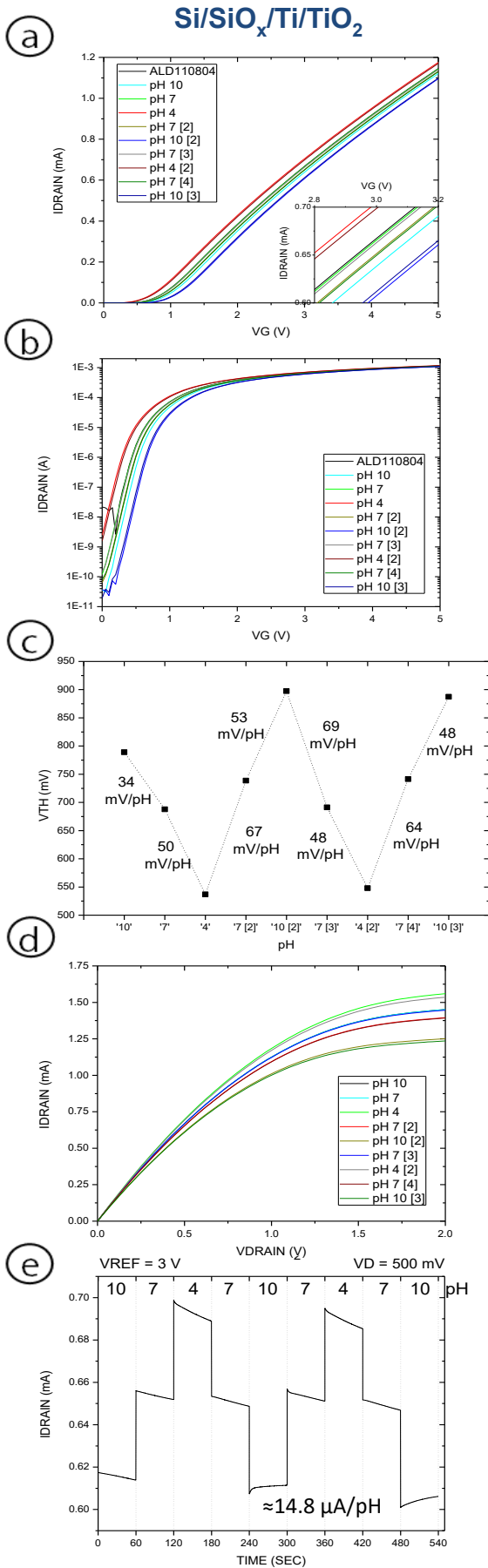


Figura 4-3 Mediciones I-V-pH de EG-ISFET con superficie sensible de TiO_2 sobre dos sustratos diferentes, vidrio (izquierda) y silicio (derecha). (a) Curvas $I_d - V_g - pH$ en formato lineal. (b) Curvas $I_d - V_g - pH$ en formato semi-logarítmico. (c) Sensibilidad con respecto al voltaje de encendido del transistor obtenido mediante el método de la transconductancia (d) Curvas $I_d - V_d - pH$. (e) Mediciones I-V-pH-tiempo a diferentes niveles de pH.

Las curvas $I_d - V_g - pH$ en formato semi-logarítmico se muestran en Figura 4-3 (b). La sensibilidad de las estructuras sobre silicio es de $\approx 54mV/pH$ y sobre vidrio de $\approx 52mV/pH$, estos últimos presentan un comportamiento más lineal que el depositado sobre silicio. En las curvas $I_d - V_d - pH$ se aprecian ventanas más definidas en el dispositivo de vidrio entre los niveles de pH, al repetirse las mediciones varias veces, ver Figura 4-3 (d).

Finalmente se muestran mediciones I-V-pH-tiempo realizadas durante un minuto en cada nivel de pH, se tiene una sensibilidad en corriente de drenaje de $\approx 14.8 \mu A/pH$ para silicio y $\approx 15 \mu A/pH$ para vidrio. Se nota con facilidad que la estructura sobre silicio presenta un mayor decaimiento de la corriente de drenaje al estar inmersa en el electrolito por un minuto, sin embargo parece un decaimiento repetible en cada nivel de pH, excepto en pH 10 donde presenta un ligero incremento. El dispositivo sobre vidrio se mantiene casi constante por el mismo periodo de tiempo para los tres niveles de pH, ver Figura 4-3 (e). Con estos resultados se puede afirmar que el sustrato más conveniente es el vidrio, ya que presenta un comportamiento menos variable después de realizadas varias mediciones en distintos niveles de pH.

4.2 Mediciones I-V-tiempo para detectar cambios de 0.1 en pH

En esta sección se muestra la capacidad de las estructuras de óxido de titanio para sensar cambios en pH de 0.1. En la Figura 4-4 (a) se presenta el decaimiento en corriente de drenaje que presentan los dispositivos al estar inmersos en solución buffer de pH 7 bajo medición por 11 minutos. En el caso del dispositivo sobre silicio, el decaimiento en I_d es de $17\mu A$ y sobre vidrio de $8\mu A$ para el tiempo total de 11 minutos. Para ambas estructuras se obtuvo sensibilidad a cambios de pH de 0.1, mostrados en la Figura 4-4 (b) donde se muestra una tendencia tipo escalera al ir de pH 6.7 a pH 7.2 y de regreso. Se incluye la Figura 4-4 (c) para visualizar los cambios en corriente de drenaje que se obtienen al disminuir el pH de 7.1 a 6.6 en cambios de 0.1, estos cambios se encuentran en un rango de $1\mu A$ a $7.5\mu A$.

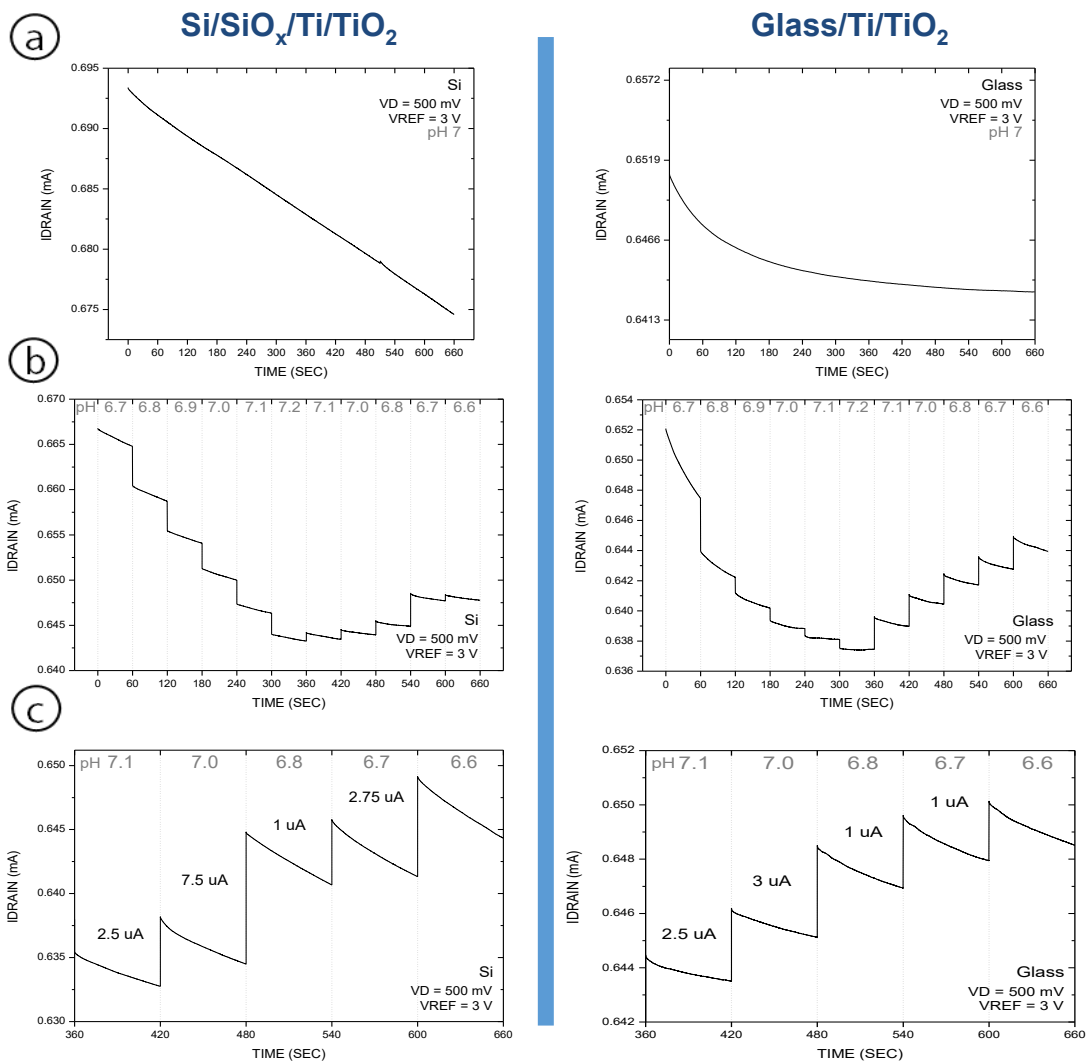


Figura 4-4 Mediciones I-V-pH-tiempo de EG-ISFET con superficie sensible de TiO₂ sobre dos sustratos diferentes, silicio (izquierda) y vidrio (derecha). (a) Corriente de drenaje obtenida en medición continua por 11 minutos a un pH de 7.0. (b) Corriente de drenaje medida por un minuto de pH 6.7 a pH 7.2 y de regreso. (c) Cambios de corriente obtenidos variando hacia un pH ácido (7.1 hacia 6.6).

4.3 Mediciones I-V-pH-temperatura e I-V-pH-iluminación

Ya que se necesitan temperaturas mayores a la temperatura ambiente (20-25°C) para lograr la desnaturalización de cadenas cortas de ADN, se realizaron mediciones para caracterizar el cambio que sufre la respuesta de las estructuras EG-ISFET. Ver Figura 4-5 para TiO₂ depositado sobre silicio y Figura 4-6 para TiO₂ depositado sobre vidrio.

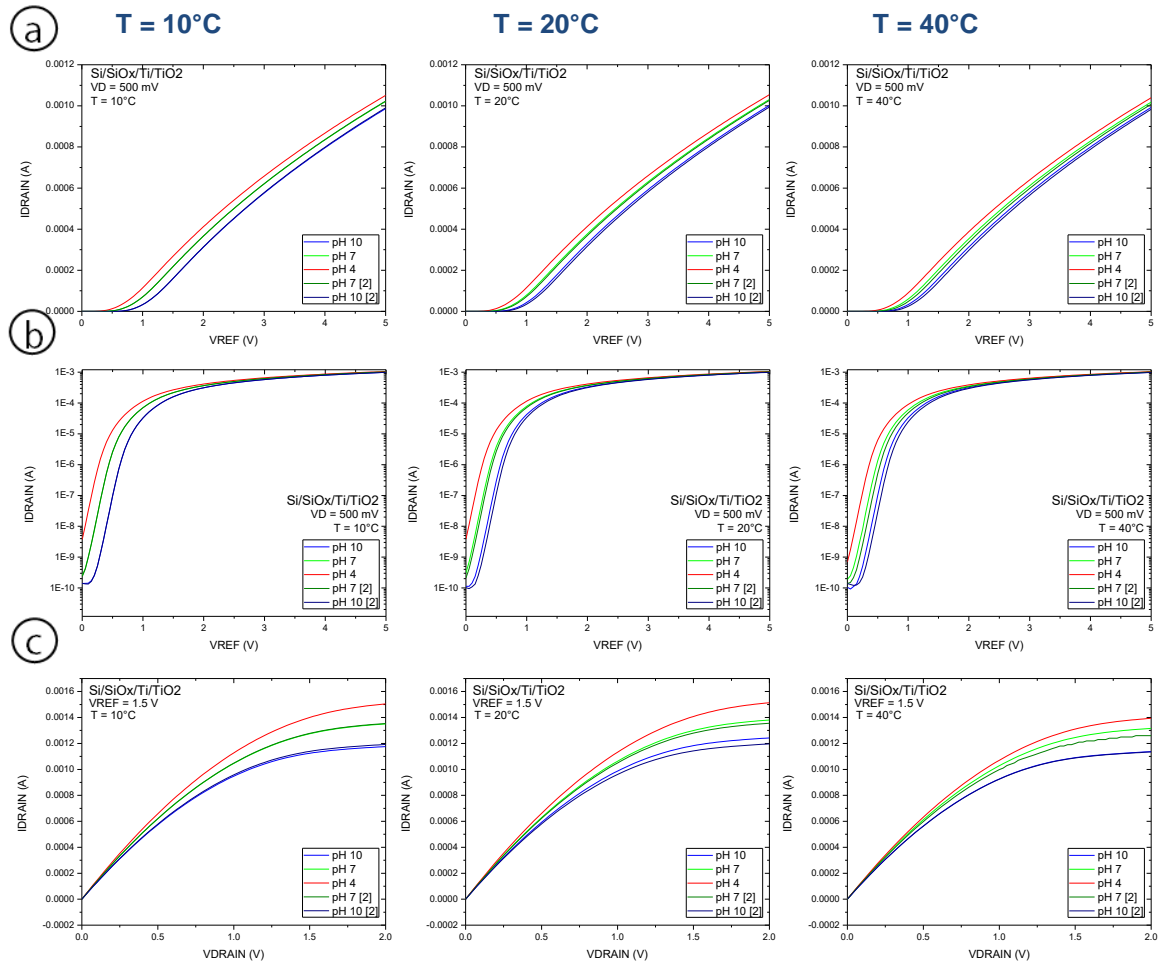


Figura 4-5 Variación de las curvas características $I-V-pH$ debido a la temperatura en estructuras EG-ISFET $Si/SiO_x/Ti/TiO_2$ (a) $I_d - V_g - pH$ lineal-lineal (b) $I_d - V_g - pH$ semi-logarítmica (c) $I_d - V_d - pH$

Se aprecia que a temperaturas altas la respuesta en $I_d - V_g - pH$ e $I_d - V_d - pH$ de la estructura EG-ISFET $Si/SiO_x/Ti/TiO_2$ comienza a estar desplazada ligeramente a la derecha respecto a la primera medición, lo que no sucede a $10^\circ C$ (Figura 4-5 (a) y (b)). En las curvas $I_d - V_d - pH$ también se muestra un corrimiento de las segundas mediciones a $20^\circ C$ y $40^\circ C$, y una disminución general de la corriente de drenaje medida a temperaturas altas. Las estructuras EG-ISFET $Glass/Ti/TiO_2$ no presentan cambios significativos al realizar mediciones a $10^\circ C$, $20^\circ C$ y $40^\circ C$, ya que mantiene la sensibilidad y niveles de corriente, ver Figura 4-6.

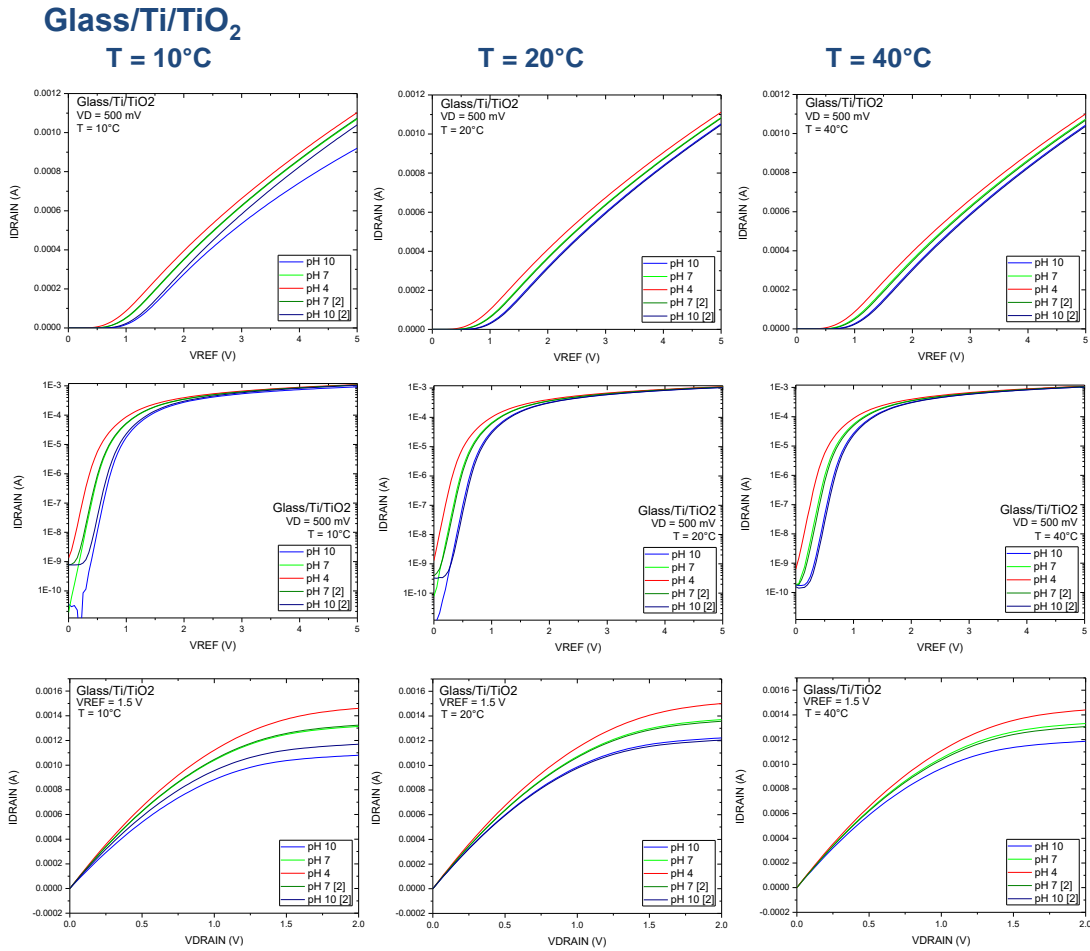


Figura 4-6 Variación de las curvas características I-V-pH debido a la temperatura en estructuras EG-ISFET Glass/Ti/TiO₂

Esto significa que el mayor cambio en la sensibilidad y niveles de corriente I_d con diferentes niveles de temperatura se presenta en la estructura sobre silicio. Esta respuesta es debida a la capacidad del sustrato de generar portadores adicionales. En la Figura 4-7 (a) se muestra la gráfica de la resistividad al aumentar la temperatura para un conductor típico, donde se aprecia que el aumento de la resistividad¹⁰ es lineal a altas temperaturas; y la resistividad a temperaturas bajas se aproxima a una resistencia fija distinta de cero. En el caso de un semiconductor típico, como el silicio, la resistividad disminuye al aumentar la temperatura. Esta propiedad de generar portadores de carga debidos a temperatura, justifica las variaciones obtenidas para la estructura Si/SiO_x/Ti/TiO₂. El vidrio es un material eléctrica y térmicamente

¹⁰ Resistividad: Resistencia de un material conductor proporcional a su longitud y anchura.

aislante que no presenta este tipo de comportamiento, es por ello que no se detectan amplias variaciones $I - V$ dependientes de temperatura en las estructuras Glass/Ti/TiO₂.

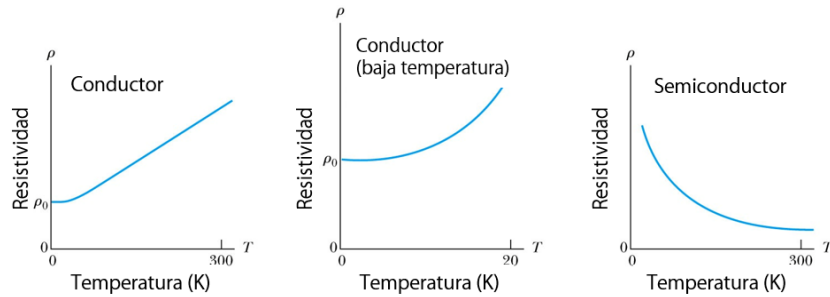


Figura 4-7 (a) Gráfica de la resistividad contra temperatura para un conductor típico. (b) Resistividad contra temperatura para un conductor típico a temperaturas bajas. (c) Resistividad contra temperatura para un semiconductor típico

Como se observó en las mediciones del ISFET comercial (sección 4.1.1), otro parámetro que puede modificar la respuesta de los ISFET es la iluminación. En la Figura 4-8 se observa el

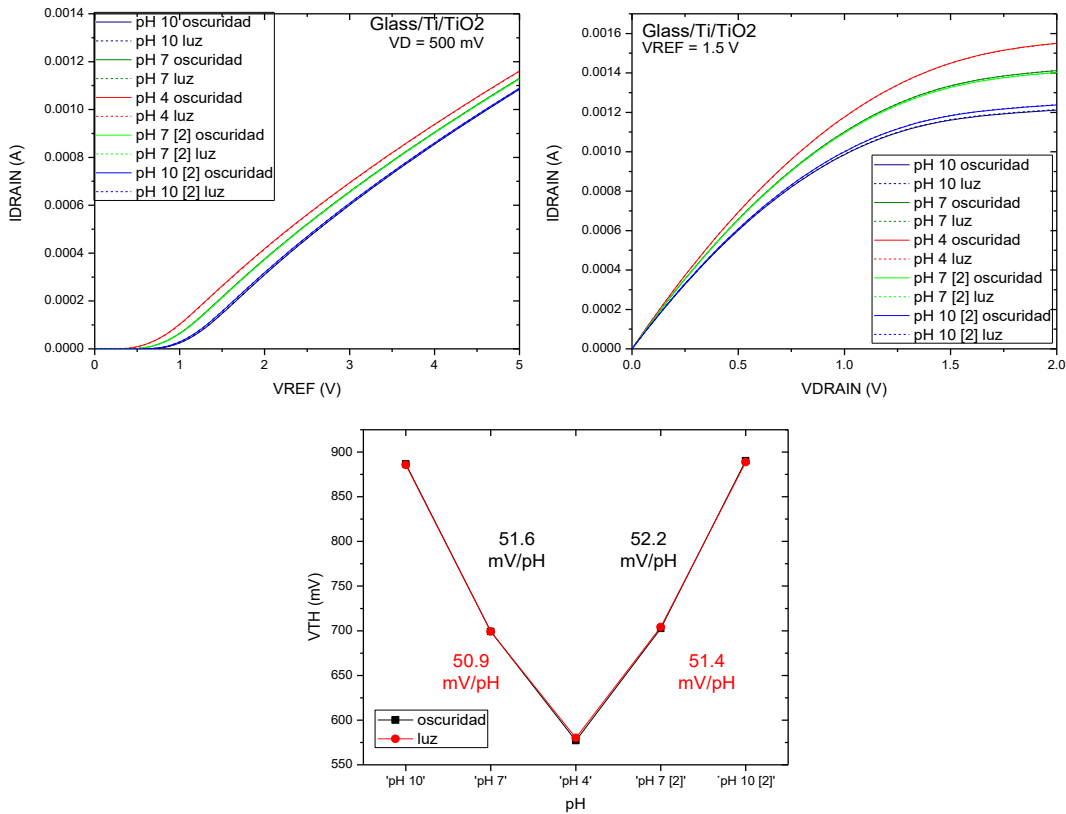


Figura 4-8 Curvas $I_d - V_g - pH$, $I_d - V_d - pH$ y sensibilidad con respecto a V_{th} en condiciones de oscuridad e iluminación de dispositivos EG-ISFET Glass/Ti/TiO₂

comportamiento de los dispositivos que usan como sustrato el vidrio, como se puede apreciar las curvas y sensibilidad son exactamente iguales en ambas condiciones de iluminación. Esto es debido a que esta superficie sensible está conectada a un MOSFET comercial cuyas terminales y sobre todo, la región del canal de inversión nunca son expuestas directamente a la solución electrolítica a analizar ni a las condiciones ambientales de temperatura e iluminación durante la medición.

La respuesta del dispositivo Si/SiO_x/Ti/TiO₂ bajo condiciones de luz y oscuridad se muestran en la Figura 4-9. No se presentan grandes cambios en el voltaje de encendido del transistor cuando se realizan mediciones secuenciales $I_d - V_g$ en función de los valores de pH a medir (10 → 7 → 4 → 7 → 10 → etc.). Sin embargo, sí se presenta un ligero cambio de entre 2 – 8 μA cuando se realizan mediciones constantes de la corriente de drenaje en función del tiempo y de pH, bajo condiciones de oscuridad e iluminación (Figura 4-9 (b)).

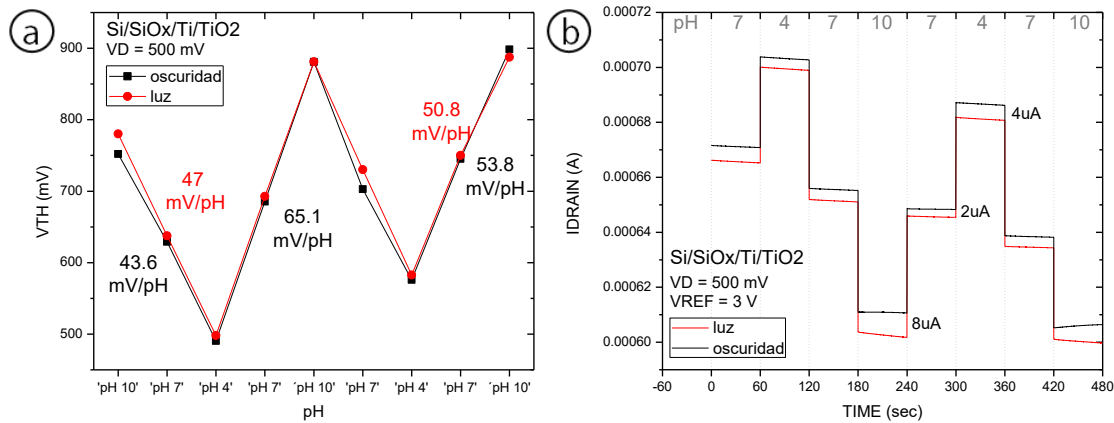


Figura 4-9 (a) Sensibilidad calculada con respecto a voltaje de encendido de dispositivos Si/SiO_x/Ti/TiO₂ (b) Medición de corriente de drenaje en función del tiempo en condiciones de luz y oscuridad

En la Tabla 5 se muestra un resumen de la sensibilidad medida bajo condiciones de luz y oscuridad de estructuras de óxido de titanio y nitruro de silicio (ambas como superficies sensibles a pH) realizadas con condiciones de luz y oscuridad. Se aprecia que el mayor cambio en la sensibilidad se presenta en el ISFET comercial con 11.5 mV/pH de diferencia, y la estructura sobre vidrio presenta un cambio de 1 mV/pH lo que significa que no le afectan esas condiciones ambientales para su desempeño.

Tabla 5 Cambio en la sensibilidad a iones de hidrógeno de estructuras de óxido de titanio y nitruro de silicio realizadas con condiciones de luz y oscuridad.

	Glass/Ti/TiO₂	Si/SiO_x/Ti/TiO₂	ISFET CNM Si₃N₄
Luz	51 mV/pH	54 mV/pH	46.5 mV/pH
Oscuridad	52 mV/pH	58 mV/pH	58 mV/pH

4.4 Eventos de hibridación/desnaturalización de cadenas sencillas de ADN

Se comprobó la hibridación/desnaturalización de las cadenas sencillas de 20 oligonucleótidos combinadas con sus cadenas complementarias, ambas con la misma concentración, lo que hace que sea más probable que todas las cadenas suspendidas puedan emparejarse correctamente.

La curva de fusión del ADN necesaria para determinar la temperatura de transición de las cadenas de ADN se realizó mediante espectrofotometría de absorbancia a 260 nm (Figura 4-10). Para Adenina y Timina se espera una temperatura de melting (T_m)¹¹ menor a la de Guanina y Citosina, debido a la energía necesaria para romper enlaces dobles y triples de hidrógeno, respectivamente. Las pares de bases complementarias Adenina-Timina presentan una $T_m \approx 45^\circ C$. Para Guanina y Citosina pese que no presenta una curva limpia, sí se aprecia que a temperaturas bajas ($T < 30^\circ C$) se encuentran hibridadas (naturalizadas), es decir, presenta una absorbancia mínima constante. También se puede apreciar cuando estas mismas pares de bases se encuentran desnaturalizadas, esto es a partir de los $85^\circ C$. Por lo tanto se puede decir que Citosina-Guanina presentan una $T_m \approx 52^\circ C$.

La Figura 4-11 ilustra los eventos de hibridación/desnaturalización de las cadenas A-T y C-G para las temperaturas adecuadas, en el tiempo. Estas curvas comienzan con la medición de la

¹¹ Temperatura de melting (T_m): Temperatura a la cual el 50% de las especies de una molécula de ADN forman una doble hélice estable y el otro 50% se encuentran no apareados.

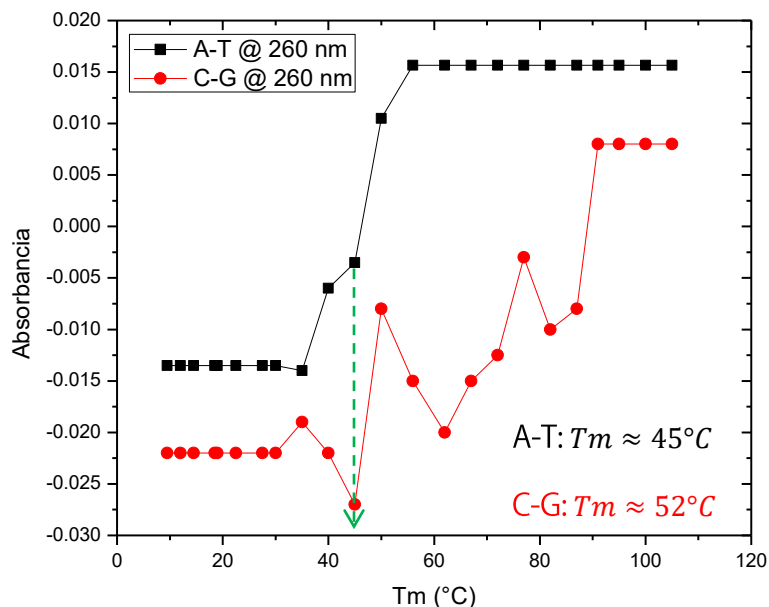


Figura 4-10 Curva de fusión del ADN, obtenida mediante la medición de la absorbancia a 260nm

absorbancia a 110°C temperatura a la cual todas las pares de bases se encuentran completamente desnaturalizadas produciendo máxima absorbancia. Después se disminuye la temperatura hasta llegar a temperatura ambiente (23°C) e incluso a temperatura menor (10°C) a las fisiológicas donde se espera que ya se haya realizado el evento de hibridación de las 20 pares de bases produciendo mínima absorbancia. Se vuelve a subir la temperatura pero ahora a 65°C a la cual Adenina-Timina ya deberían estar desnaturalizados (debido a su T_m), y Guanina-Citosina en su mayoría desnaturalizados. Se vuelve a bajar la temperatura ahora en un rango de tiempo muy corto de 2 minutos y medio, obteniendo el mismo nivel de absorbancia, lo que sugiere que a los dos minutos y medio, ya se dió la naturalización y desnaturalización de las cadenas, A-T y C-G.

Es importante mencionar que estas cadenas se encuentran suspendidas en un medio fisiológico (buffer TE), cuyo pH cambia dependiendo de la temperatura, pero que presenta una zona plana donde el pH se mantiene constante en el rango de 45° – 55°C, ver Figura 4-12 (a). Este comportamiento es muy conveniente para las mediciones a realizar con las cadenas complementarias de ADN, ya que justo en ese rango se encuentra la temperatura de fusión de A-T, $T_m \approx 45^\circ\text{C}$. También las cadenas complementarias C-G comienzan a desnaturalizarse en este rango de estabilidad del buffer. Gracias a esto, se espera que la medición del cambio de pH debido a la desnaturalización de las hebras complementarias A-T y C-G sea solo debida a

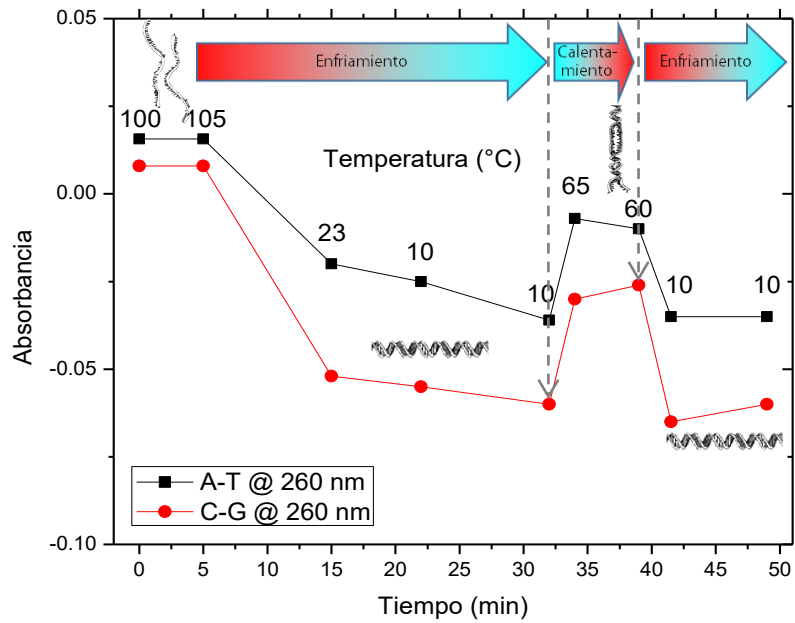


Figura 4-11 Medición de absorbancia a 260nm durante la naturalización (hibridación) y desnaturalización rápida de cadenas complementarias A-T y C-G

éste fenómeno y no al cambio de pH de la solución buffer donde se encuentran suspendidas. La medición del cambio de pH del buffer TE con temperatura (de 8.3 a 7.9) se realizó con un pH-metro comercial.

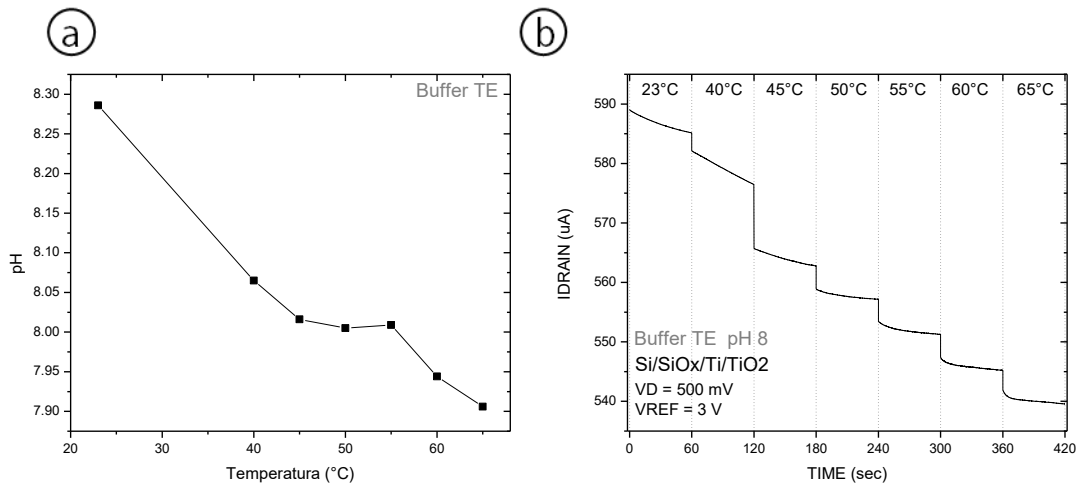


Figura 4-12 Medición discontinua en el tiempo para (a) pH a 2 ml de TE con pHmetro (b) Corriente en drenaje medida en pasos de 1 min para las temperaturas mostradas

Siguiendo con la caracterización del buffer TE, se realizaron mediciones usando las mismas temperaturas que las medidas con el pH-metro Metler Toledo mostradas en la Figura 4-12 (a) pero ahora con los dispositivos EG-ISFET ([Si/SiO_x/Ti/TiO₂]+MOSFET comercial [ALD110804]). Este dispositivo es el que se va a utilizar para todas las pruebas siguientes de hibridación/desnaturalización de cadenas sencillas de ADN. En la Figura 4-12 se aprecia que la corriente de drenaje disminuye con el incremento en temperatura, lo cual es fácilmente observable en las Figura 4-5 (c) anteriores, donde la corriente I_d en saturación, disminuye gradualmente con incrementos de temperatura de 10, 20 y 40°C durante mediciones $I - V - pH - T$ respectivamente.

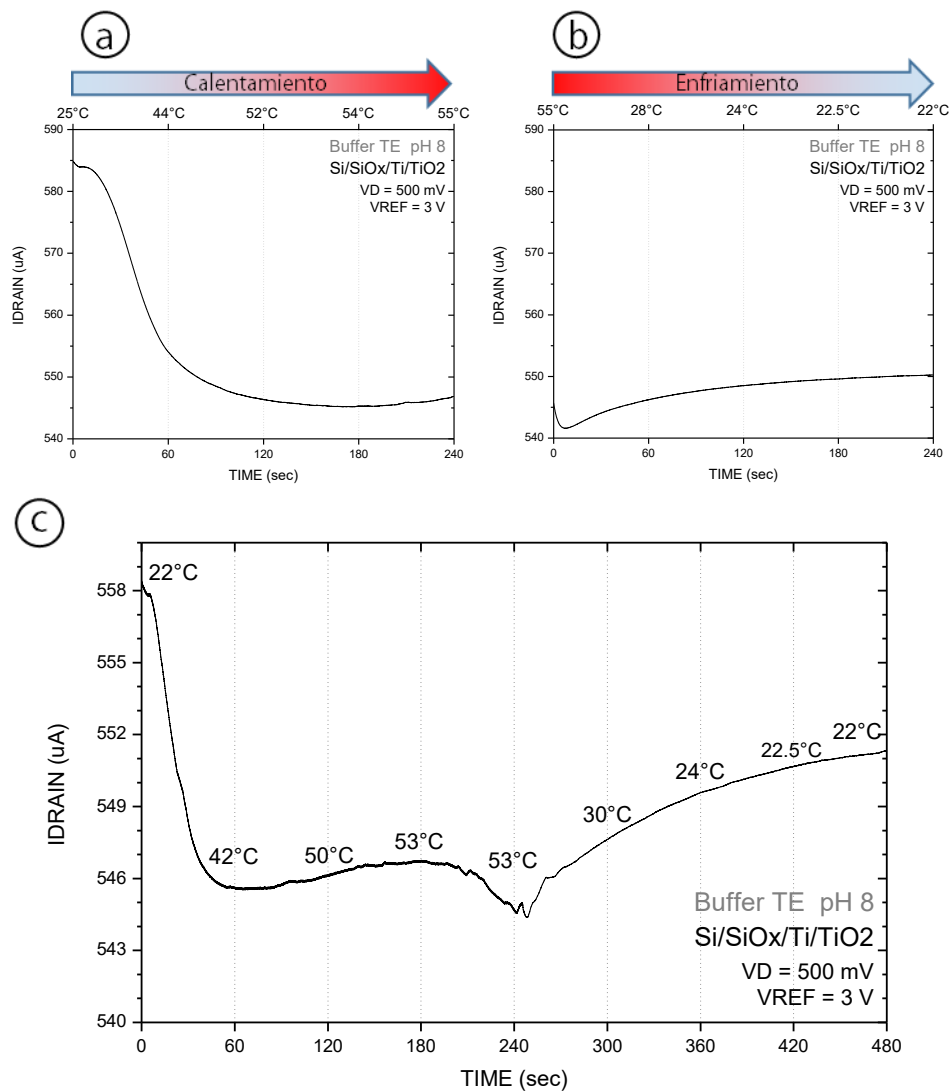


Figura 4-13 Corriente de drenaje registrada por EG-ISFET al realizar (a) calentamiento y (b) enfriamiento del buffer TE. (c) Calentamiento y enfriamiento continuo del buffer TE

Posteriormente se caracterizó el buffer TE con el EG-ISFET Si/SiO_x/Ti/TiO₂, ahora midiendo curvas $I - V - time - T$ por 4 minutos continuos durante rutinas de calentamiento y enfriamiento del buffer TE, y se obtienen las tendencias mostradas en la Figura 4-13 (a-c).

4.5 Detección de eventos de desnaturalización de cadenas sencillas de ADN usando EG-ISFET con ALD-TiO₂

Usando el mismo método de calentamiento y medición de corriente de drenaje durante 4 minutos expuesto en la sección 3.3.3, se obtuvieron los primeros resultados donde se observa un pequeño incremento justo en la temperatura de *melting* $T_m \approx 45^\circ C$ (obtenida anteriormente para Adenina-Timina) y cuyo pequeño incremento en $I_d(pH, T, t)$ representa una tendencia opuesta al decremento monótonico de I_d normalmente esperado.

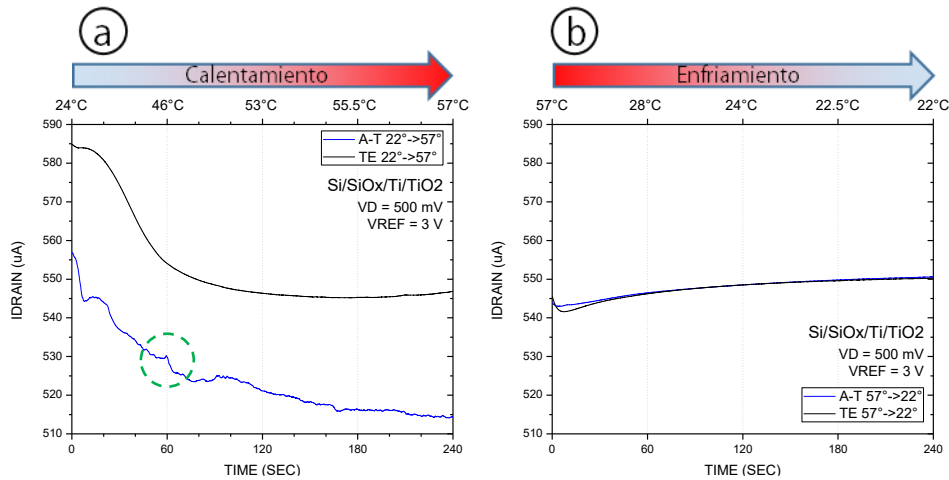


Figura 4-14 Medición de I_{drain} durante (a) Desnaturalización (mediante calentamiento) de poly-A & poly-T (b) Enfriamiento de poly-A & poly-T

Pese a que, el cambio en la tendencia de la corriente de drenaje coincide con la temperatura esperada para A-T, este cambio no puede ser relacionado con total seguridad a la separación de las cadenas de ADN debido a que existen muchas variaciones en la misma curva, no siendo este el único cambio en la tendencia normalmente esperada de observar una disminución progresiva en I_d . Además de que este tipo de calentamiento en tan poco tiempo y no muy controlado no es conveniente ya que según [4] las reacciones de

hibridación/desnaturalización toman mínimo 10 minutos para lograr ser detectadas con este tipo de sensores.

Un calentamiento más controlado permite linealizar el cambio en temperatura, este cambio para el mismo rango de incremento en temperatura ($25^{\circ} - 55^{\circ}C$) se realizó en 11 minutos, ver Figura 4-15 (a-b).

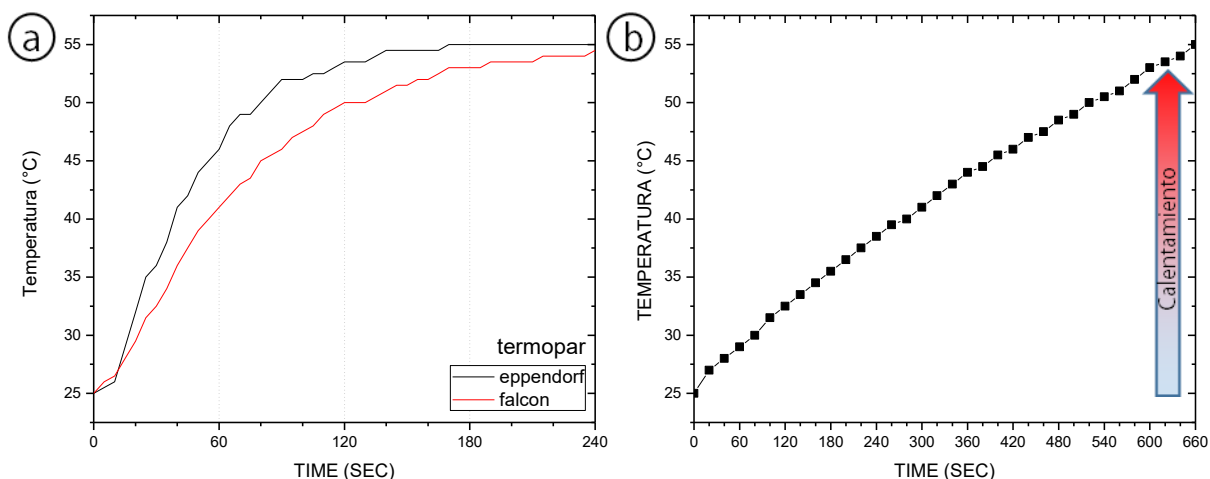


Figura 4-15 (a) Curva de calentamiento de $25^{\circ}C$ a $55^{\circ}C$ en 4 minutos, para dos viales disponibles tubos eppendorf de 2 ml y tubos falcon de 5 ml. (c) Curva de calentamiento lineal de $25^{\circ}C$ a $55^{\circ}C$ en 11 minutos

En la Figura 4-16 se muestra la corriente de drenaje al realizar este calentamiento de las cadenas complementarias A-T y C-G, suspendidas en buffer TE. Como se ha observado, inicialmente la corriente I_d del sensor EG-ISFET en inmersión directa al buffer TE (sin cadenas suspendidas) siempre tiende a decaer en el tiempo, de tal forma que con estas condiciones de calentamiento, I_d decae $17\mu A$ después de los 11 minutos de medición. La corriente de drenaje de las cadenas complementarias Adenina-Timina comienza $22\mu A$ menor que la corriente inicial del buffer y lleva una tendencia de decaimiento parecida a la del buffer, hasta $45.5^{\circ}C$ donde incrementa $47\mu A$ y continúa con la tendencia de decaimiento. Para las cadenas de Citosina y Guanina inicia con una corriente $18\mu A$ menor que la corriente inicial del buffer y sigue la tendencia de decaimiento hasta que en $48^{\circ}C$ incrementa $41\mu A$, vuelve a decaer y posteriormente se presenta otro incremento con una tendencia parecida a la anterior ahora a una temperatura de $51^{\circ}C$.

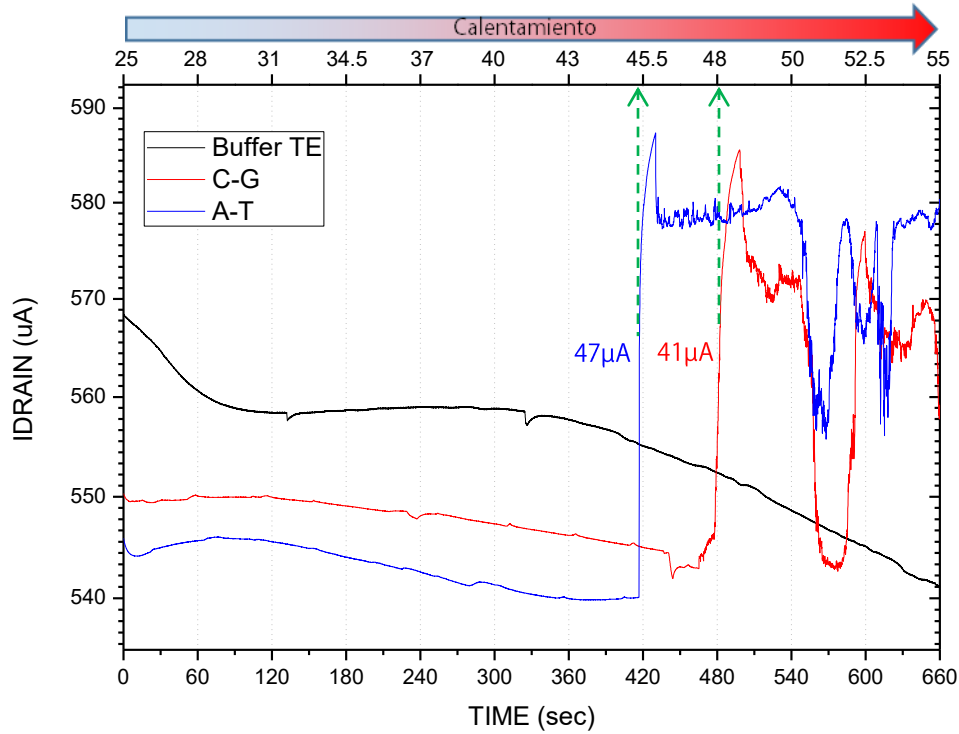


Figura 4-16 Corriente de drenaje obtenida durante la desnaturalización (calentamiento) de oligonucleótidos complementarios suspendidos en buffer TE

Como se mencionó en el capítulo 1, la estructura del ADN presenta una carga negativa intrínseca debida a los fosfatos que forman el *backbone* de la doble hélice que al ser hibridada/desnaturalizada, genera un cambio de potencial que es detectado mediante el cambio de la conductancia del canal del transistor [11]. Aun cuando se ha demostrado un cambio en I_d justo en las temperaturas T_m de cadenas A-T y C-G bastante apreciable con sensores EG-ISFET, es importante estudiar y verificar los mecanismos particulares responsables de la señal transducida electrónicamente para estos eventos de desnaturalización y que son experimentalmente observados con este tipo de sensores [51].

No obstante, esta última medición (Figura 4-16) demuestra que el dispositivo (Si/SiO_x/Ti/TiO₂)+MOSFET comercial (ALD110804) es capaz de detectar eventos de desnaturalización de ADN con una combinación de materiales bio-compatibles y transductores electrónicos comerciales.

5

Conclusiones

Se demostró que el dispositivo (Si/SiO_x/Ti/TiO₂)+MOSFET comercial (ALD110804) es capaz de detectar eventos de desnaturalización de pares-base complementarias de ADN, sin necesidad de usar un paso de marcaje o inmovilización de las hebras de ADN. Esto es importante ya que al utilizar técnicas convencionales de depósito de películas delgadas (*e-beam evaporation* y ALD) es posible desarrollar superficies sensibles con alta calidad, y adicionalmente, desarrollar múltiples áreas de detección si se integran estos procesos dentro de un proceso de fabricación de CI's compatibles con CMOS.

Se fabricaron y caracterizaron electroquímicamente estructuras sensibles a iones de hidrógeno usando Al₂O₃ y TiO₂, este último tiene la ventaja de ser biocompatible.

Se obtuvo una sensibilidad mayor a la sensibilidad medida de un ISFET comercial con Si_3N_4 como superficie sensible.

Se fabricaron estructuras sensibles a iones de hidrógeno usando TiO_2 sobre dos sustratos diferentes, silicio y vidrio. Se comprobó la sensibilidad de las dos estructuras a cambios de pH de hasta 0.1, de variación en ese parámetro. Se comprobó que la estructura (Glass/Ti/ TiO_2)+MOSFET comercial (ALD110804) no es susceptible a cambios en las condiciones ambientales (temperatura e iluminación) durante mediciones secuenciales o constantes de pH, sin embargo la estructura (Si/ SiO_x /Ti/ TiO_2)+MOSFET comercial (ALD110804) sí presentó pequeñas variaciones de sensibilidad y niveles de corriente al estar expuestos a la luz y temperaturas mayores a la ambiente, debido al fenómeno de generación adicional de portadores de carga en el silicio por iluminación y temperatura.

El proceso de fabricación de la superficie sensible a iones H^+ es relativamente fácil de realizar y presenta la enorme ventaja de obtener una superficie de óxido metálico altamente sensible a pH pues no es expuesta a ningún paso adicional de proceso. Conectando esta superficie sensible a pH a un MOSFET comercial, podemos obtener un dispositivo sensible a iones de pH fácil de operar. Además, al tener esta estructura de compuerta extendida, el MOSFET es reutilizable para diferentes aplicaciones, no solo de lectura de pH, sino de procesamiento, compensación, calibración, almacenamiento y/o transmisión de las señales analógicas y/o digitales de interés. Lo anterior es útil para implementar soluciones portátiles, de bajo consumo de potencia y con alta estabilidad, para el monitoreo remoto de pH a mediano plazo y en campo (fuera de laboratorio).

5.1 Trabajo a futuro

En este trabajo se demostró que el dispositivo (Si/ SiO_x /Ti/ TiO_2)+MOSFET comercial (ALD110804) es capaz de detectar eventos de desnaturalización de pares-base complementarias de ADN, sin embargo, es necesario mucho más trabajo para aplicar estos dispositivos con ácidos nucleicos. Es por esto que se propone como trabajo futuro estudiar la termodinámica de los eventos de hibridación y desnaturalización del ADN para comprender correctamente el principio mediante el cual se pudo identificar la desnaturalización de las cadenas de 20 pares de bases. Se propone realizar mediciones mezclando cadenas no

complementarias y no totalmente complementarias además de pruebas con oligonucleótidos con longitudes de diferentes pares de bases, para determinar si los dispositivos son capaces de identificar estas diferencias. También convendría realizar mediciones dando un mayor tiempo para realizar el proceso de hibridación y desnaturalización del ADN.

Estos dispositivos tienen el potencial para ser incluidos en un arreglo de sensores de iones de hidrógeno completamente integrados, incluyendo la integración de geometrías microfluídicas y/o sustratos flexibles que definan la zona de reacción convenientemente separadas/aisladas del MOSFET.

Bibliografía y referencias

- [1] J. D. Watson and F. H. Crick, “The structure of DNA,” *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, vol. 18, pp. 123–131, 1953.
- [2] L. Pray, “Discovery of DNA structure and function: Watson and Crick,” *Nat. Educ.*, vol. 1, no. 1, p. 100, 2008.
- [3] W. S. Klug, M. R. Cummings, C. A. Spencer, and M. A. Palladino, *Concepts of Genetics*, 10th ed. Madrid: Pearson Education S. A. de C. V., 2013.
- [4] Y. Han, A. Offenhäusser, and S. Ingebrandt, “Detection of DNA hybridization by a field-effect transistor with covalently attached catcher molecules,” *Surf. Interface Anal.*, vol. 38, pp. 176–181, 2006.
- [5] F. Mérieux, “Module of Molecular Biology,” *DNA and genomes*, 2016. .
- [6] S. Goodwin, J. D. McPherson, and W. R. McCombie, “Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 17, no. 6, pp. 333–351, 2016.
- [7] J. P. Devadhasan, I. S. Yoo, and S. Kim, “Overview of CMOS image sensor use in molecular diagnostics,” *Curr. Appl. Phys.*, vol. 15, no. 3, pp. 402–411, 2015.
- [8] J. M. Rothberg *et al.*, “An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing,” *Nature*, vol. 475, no. 7356, pp. 348–352, 2011.
- [9] C. Toumazou, T. S. L. K. Thay, and P. Georgiou, “A new era of semiconductor genetics using ion-sensitive field-effect transistors: the gene-sensitive integrated cell,” *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 372, no. 2012, 2014.
- [10] M. Waleed Shinwari, M. Jamal Deen, and D. Landheer, “Study of the electrolyte-insulator-semiconductor field-effect transistor (EISFET) with applications in biosensor design,” *Microelectron. Reliab.*, vol. 47, no. 12, pp. 2025–2057, 2007.

- [11] M. Kaisti, “Detection principles of biological and chemical FET sensors,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 98, no. April, pp. 437–448, 2017.
- [12] V. Pachauri and S. Ingebrandt, “Biologically sensitive field-effect transistors: from ISFETs to NanoFETs,” *Essays Biochem.*, vol. 60, no. 1, pp. 81–90, 2016.
- [13] W.-A. Lai, C.-H. Lin, Y.-S. Yang, and M. S.-C. Lu, “Ultrasensitive and label-free detection of pathogenic avian influenza DNA by using CMOS impedimetric sensors,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 35, no. 1, pp. 456–460, 2012.
- [14] M. Kaisti *et al.*, “Real-Time wash-free detection of unlabeled PNA-DNA hybridization using discrete FET sensor,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–8, 2017.
- [15] J. Molina, W. Calleja, M. Landa, and P. Alarcón, “Fabricación y Caracterización Electroquímica de ISFETs : Progreso hacia el Desarrollo de la Bio-Electrónica,” 2^o *Congr. Nac. Electrónica*, vol. 1, pp. 1–6, 2002.
- [16] J. Molina, W. Calleja, M. Landa, P. Alarcón, and A. Diaz Sanchez, “Fabrication, Packaging and Characterization of ISFET’s,” *Proc. IX Int. IBERCHIP Work.*, vol. 1, no. S2–BE02, 2003.
- [17] E. Souteyrand *et al.*, “Direct Detection of the Hybridization of Synthetic Homopolymer DNA Sequences by Field Effect,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 101, no. 15, pp. 2980–2985, 1997.
- [18] B. Veigas, E. Fortunato, and P. V. Baptista, “Field effect sensors for nucleic Acid detection: recent advances and future perspectives,” *Sensors (Basel)*, vol. 15, no. 5, pp. 10380–10398, 2015.
- [19] F. Uslu, S. Ingebrandt, D. Mayer, S. Böcker-Meffert, M. Odenthal, and A. Offenhäusser, “Labelfree fully electronic nucleic acid detection system based on a field-effect transistor device,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 19, no. 12, pp. 1723–1731, 2004.
- [20] F. Pouthas, C. Gentil, D. Côte, G. Zeck, B. Straub, and U. Bockelmann, “Spatially resolved electronic detection of biopolymers,” *Phys. Rev. E - Stat. Physics, Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip. Top.*, vol. 70, no. 3, p. 8, 2004.
- [21] S. Ingebrandt, Y. Han, F. Nakamura, A. Poghossian, M. J. Schöning, and A.

Offenhäusser, “Label-free detection of single nucleotide polymorphisms utilizing the differential transfer function of field-effect transistors,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 22, no. 12, pp. 2834–2840, 2007.

- [22] J. Fritz, E. B. Cooper, S. Gaudet, P. K. Sorger, and S. R. Manalis, “Electronic detection of DNA by its intrinsic molecular charge,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 99, no. 22, pp. 14142–14146, 2002.
- [23] P. Estrela, A. G. Stewart, F. Yan, and P. Migliorato, “Field effect detection of biomolecular interactions,” *Electrochim. Acta*, vol. 50, no. 25–26 SPEC. ISS., pp. 4995–5000, 2005.
- [24] D. Gonçalves, D. M. F. Prazeres, V. Chu, and J. P. Conde, “Detection of DNA and proteins using amorphous silicon ion-sensitive thin-film field effect transistors,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, no. 4, pp. 545–551, 2008.
- [25] T. Sakata, M. Kamahori, and Y. Miyahara, “DNA Analysis Chip Based on Field-Effect Transistors,” *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 44, no. 4B, pp. 2854–2859, 2005.
- [26] T. Sakata and Y. Miyahara, “DNA sequencing based on intrinsic molecular charges,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 45, no. 14, pp. 2225–2228, 2006.
- [27] D. S. Kim *et al.*, “Fabrication and characteristics of a field effect transistor-type charge sensor for detecting deoxyribonucleic acid sequence,” *Japanese J. Appl. Physics, Part 1 Regul. Pap. Short Notes Rev. Pap.*, vol. 42, no. 6 B, pp. 4111–4115, 2003.
- [28] D. S. Kim *et al.*, “An FET-type charge sensor for highly sensitive detection of DNA sequence,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 20, no. 1, pp. 69–74, 2004.
- [29] L. Bandiera *et al.*, “A fully electronic sensor for the measurement of cDNA hybridization kinetics,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 22, no. 9–10, pp. 2108–2114, 2007.
- [30] F. Yan, S. M. Mok, J. Yu, H. L. W. Chan, and M. Yang, “Label-free DNA sensor based on organic thin film transistors,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, no. 5, pp. 1241–1245, 2009.
- [31] L. Jagannathan and V. Subramanian, “DNA detection using organic thin film transistors: Optimization of DNA immobilization and sensor sensitivity,” *Biosens.*

- Bioelectron.*, vol. 25, no. 2, pp. 288–293, 2009.
- [32] F. Fixe, V. Chu, D. M. F. Prazeres, and J. P. Conde, “Single base mismatch detection by microsecond voltage pulses,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 21, no. 6, pp. 888–893, 2005.
- [33] M. Barbaro, A. Bonfiglio, L. Raffo, A. Alessandrini, P. Facci, and I. Barák, “A CMOS, fully integrated sensor for electronic detection of DNA hybridization,” *IEEE Electron Device Lett.*, vol. 27, no. 7, pp. 595–597, 2006.
- [34] M. Barbaro, A. Bonfiglio, and L. Raffo, “A charge-modulated FET for detection of biomolecular processes: Conception, modeling, and simulation,” *IEEE Trans. Electron Devices*, vol. 53, no. 1, pp. 158–166, 2006.
- [35] G. J. Zhang and Y. Ning, “Silicon nanowire biosensor and its applications in disease diagnostics: A review,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 749, pp. 1–15, 2012.
- [36] C.-P. Chen *et al.*, “Ultrasensitive in Situ Label - Free DNA Detection Using a GaN Nanowire - Based Extended - Gate Field - Effect - Transistor Sensor,” | *Anal. Chem.*, vol. 83, pp. 1938–1943, 2011.
- [37] Y. L. Bunimovich, Y. S. Shin, W.-S. Yeo, M. Amori, G. Kwong, and J. R. Heath, “Quantitative Real-Time Measurements of DNA Hybridization with Alkylated Nonoxidized Silicon Nanowires in Electrolyte Solution Quantitative Real-Time Measurements of DNA Hybridization with Alkylated Nonoxidized Silicon Nanowires in Electrolyte Solution,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 50, pp. 16323–16331, 2006.
- [38] Z. Li, Z. Li, Y. Chen, Y. Chen, X. Li, and X. Li, “Sequence-specific label-free DNA sensors based on silicon nanowires,” *Nano Lett.*, vol. 4, no. 2, pp. 245–247, 2004.
- [39] Z. Li, B. Rajendran, T. I. Kamins, X. Li, Y. Chen, and R. S. Williams, “Silicon nanowires for sequence-specific DNA sensing: Device fabrication and simulation,” *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.*, vol. 80, no. 6, pp. 1257–1263, 2005.
- [40] J. Hahm and C. M. Lieber, “Direct ultrasensitive electrical detection of dna and dna sequence variations using nanowire nanosensors,” *Nano Lett.*, vol. 4, no. C, pp. 51–54, 2004.
- [41] G. J. Zhang *et al.*, “Highly sensitive measurements of PNA-DNA hybridization using

- oxide-etched silicon nanowire biosensors,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 23, no. 11, pp. 1701–1707, 2008.
- [42] G. J. Zhang, Z. H. H. Luo, M. J. Huang, G. K. I. Tay, and E. J. A. Lim, “Morpholino-functionalized silicon nanowire biosensor for sequence-specific label-free detection of DNA,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 25, no. 11, pp. 2447–2453, 2010.
- [43] G. J. Zhang *et al.*, “Silicon nanowire biosensor for highly sensitive and rapid detection of Dengue virus,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 146, no. 1, pp. 138–144, 2010.
- [44] A. Gao *et al.*, “Enhanced sensing of nucleic acids with silicon nanowire field effect transistor biosensors,” *Nano Lett.*, vol. 12, no. 10, pp. 5262–5268, 2012.
- [45] B. Cai, S. Wang, L. Huang, Y. Ning, Z. Zhang, and G. J. Zhang, “Ultrasensitive label-free detection of PNA-DNA hybridization by reduced graphene oxide field-effect transistor biosensor,” *ACS Nano*, vol. 8, no. 3, pp. 2632–2638, 2014.
- [46] P. C. Yao, J. L. Chiang, and M. C. Lee, “Application of sol-gel TiO₂ film for an extended-gate H⁺-ion-sensitive field-effect transistor,” *Solid State Sci.*, vol. 28, pp. 47–54, 2014.
- [47] K. A. Yusof, R. Abdul Rahman, M. A. Zulkefle, S. H. Herman, and W. F. H. Abdullah, “EGFET pH Sensor Performance Dependence on Sputtered TiO₂ Sensing Membrane Deposition Temperature,” *J. Sensors*, vol. 2016, pp. 1–9, 2016.
- [48] W. Bunjongpru *et al.*, “Very low drift and high sensitivity of nanocrystal-TiO₂ sensing membrane on pH-ISFET fabricated by CMOS compatible process,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 267, pp. 206–211, 2013.
- [49] “Atlas genetics,” 2018. [Online]. Available: <http://www.atlasgenetics.com/solutions/systems.html>.
- [50] “Genmark dx,” 2018. [Online]. Available: <https://www.genmarkdx.com/solutions/technology/esensor/>.
- [51] A. Poghosian and M. J. Schöning, “Label-Free Sensing of Biomolecules with Field-Effect Devices for Clinical Applications,” *Electroanalysis*, vol. 26, no. 6, pp. 1197–1213, 2014.

- [52] P. Bergveld, "Development of an Ion-Sensitive Solid-State Device for Neurophysiological Measurements," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. BME-17, no. 1, pp. 70–71, 1970.
- [53] K. Kano, *Semiconductor devices*. New Jersey: Prentice-Hall, 1998.
- [54] J. Janata and R. J. Huber, Eds., *Solid State Chemical Sensors*. Orlando: Academic Press, 1985.
- [55] S. A. Campbell, *Fabrication Engineering at the Micro- and Nanoscale*, 3rd ed. Oxford University Press, Inc., 2008.
- [56] R. W. Johnson, A. Hultqvist, and S. F. Bent, "A brief review of atomic layer deposition: From fundamentals to applications," *Mater. Today*, vol. 17, no. 5, pp. 236–246, 2014.
- [57] *ALD110804/ALD110904*, 2.3 ed. California: Advanced Linear Devices, Inc, 2016.
- [58] D. K. Schorder, *Semiconductor material and device characterization*, 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2006.
- [59] W. Chang, Raymond College, *Química*, 7th ed. México, D. F.: McGraw-Hill Interamericana editores, S. A. de C. V., 2002.
- [60] C. N. de Microelectrónica, "CNM pH-ISFET sensor parameters," Barcelona.