

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Analítica

“Profesor Fermín Capitán García”



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

**Estrategias para el diseño y caracterización de
dispositivos analíticos colorimétricos**

Programa de Doctorado en Química

Celia Esperanza Ramos Lorente

Tesis Doctoral dirigida por:

Dr. Miguel María Erenas Rodríguez

Dr. Ignacio de Orbe Payá

Granada, 2024

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Celia Esperanza Ramos Lorente
ISBN: 978-84-1195-446-4
URI: <https://hdl.handle.net/10481/94999>

D. Miguel María Erenas Rodríguez y D. Ignacio de Orbe Payá, ambos Profesores Titulares del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada.

CERTIFICAMOS QUE:

El trabajo de investigación recogido en la presente Memoria, titulada “Estrategias para el diseño y caracterización de dispositivos analíticos colorimétricos” y presentada por Celia Esperanza Ramos Lorente para optar al grado de doctora por la Universidad de Granada, ha sido realizado en su totalidad bajo nuestra dirección en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada.

Dr. Miguel María Erenas Rodríguez
Profesor de Universidad

Dr. Ignacio de Orbe Payá
Profesor de Universidad

Dña. Celia Esperanza Ramos Lorente
Doctoranda

Granada, julio de 2024

A mi madre.

ÍNDICE

ÍNDICE

ACRÓNIMOS	11
OBJETIVOS	19
RESUMEN.....	23
CAPÍTULO 1:.....	27
1. Point-of-Care, Point-of-Need	29
2.1 Clasificación	31
2. Dispositivos microfluídicos	35
3. Materiales	36
4. Técnicas de fabricación de μ PADs	44
4.1 Control de flujo.....	57
4.2 Materiales inteligentes.....	59
4.3 Hidrogeles.....	60
5. Sistemas de detección	82
5.1 Colorimetría.....	87
6. Aplicaciones de los μ PADs, μ TADs y μ CADs.....	100
ÍNDICE DE FIGURAS.....	105
ÍNDICE DE TABLAS.....	107
CAPÍTULO 2:.....	109
1. Reactivos, materiales e instrumentación	111
1.1 Reactivos	111
1.2 Instrumentos y equipos.....	113
1.3 Aparatos de laboratorio	114
1.4 Materiales de laboratorio.....	116
1.4 Software empleado	120
2. Desarrollo de sensores.....	121
2.1 Diseño.....	121
2.2 Técnicas de preparación de dispositivos microfluídicos.....	125
2.3 Preparación de membranas	155
2.4 Preparación de NIPAM	162
2.5 Captura y análisis de imagen.....	172
3. Caracterización de materiales empleados en los sensores	184
3.1 Espectroscopía de absorción UV	184

3.2 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear	191
3.3 Medida de densidad de disoluciones	198
ÍNDICE DE FIGURAS	201
ÍNDICE DE TABLAS	203
CAPÍTULO 3	205
Planteamiento.....	207
Objetivo.....	209
Abstract.....	211
Keywords.....	211
1. Introduction	213
2. Materials and methods	216
2.1 Reagents, materials and instrumentation	216
2.2 Synthesis of vinyl sulfone acidochromic dye (AD-VS-1).....	217
2.3 μ CAD fabrication	218
2.4 Imaging and color analysis	221
2.5 Readout and processing electronics	221
3. Results.....	223
3.1 Cotton cloth characterization	223
3.2 Selection and characterization of the acidochromic dye indicator AD-VS-1..	224
3.3 Selection of the analytical parameter	228
3.4 μ CAD design	230
3.5 Optimization assays for the preparation of the sensing area.....	230
3.6 μ CAD patterning procedure	231
3.7 Dipping calibration	232
3.8 Absorbent pad characterization.....	234
3.9 First μ CAD designs.....	235
3.10 Method characterization.....	238
3.11 Reversibility study	239
3.12 Stability.....	239
3.13 Comparison with commercial pH-meter.....	240
3.14 Android™ application development.....	241
3.14 Wristband performance and evaluation.....	242
3.15 Electronics performance	243

4. Conclusions	246
Acknowledgements.....	247
FIGURE INDEX	249
TABLE INDEX	251
CAPÍTULO 4.....	253
Planteamiento.....	255
Objetivo.....	259
Abstract.....	261
Keywords.....	262
1. Introduction	263
2. Materials and methods	266
2.1 Reagents and materials.....	266
2.2 Colorimetric inks fabrication	267
2.3 Colorimetric inks deposition	268
2.4 QRsens design and fabrication.....	268
2.5 Calibration setups and measurements	270
2.6 Smartphone application development	272
2.6.1 <i>Light colour correction</i>	272
3. Results and discussion	274
3.1 QRsens application user flow	274
3.2 Light colour correction	277
3.3 QRsens calibration and performance.....	278
3.4 Cross-sensitivity study.....	284
3.5 Literature review	285
4. Conclusions	287
Acknowledgements.....	287
FIGURE INDEX	289
TABLE INDEX	291
CAPÍTULO 5.....	293
Planteamiento.....	295
Objetivo.....	297
Abstract.....	299
Keywords.....	299

1. Introduction	301
2. Materials and methods	304
2.1 Reagents, materials and instrumentation	304
2.2 Synthesis of the NIPAM repository.....	306
2.3 Synthesis of the LiCl NIPAM repository	307
2.4 Preparation of the NIPAM ionogels.....	307
2.5 Fabrication of the μ PADs	308
2.6 Nanoflowers synthesis	309
2.7 Measurement protocol and data analysis.....	309
3. Results	311
3.1 Swelling/Deswelling behaviour of the NIPAM repository	311
3.2 Behaviour in different solvents	314
3.3 Thermal behaviour below the LCST	315
3.4 pH influence in adsorption	316
3.5 Evaporation processes in NIPAM hydrogels	318
3.6 Ionogels as flow barriers or delayers.....	320
3.7 NIPAM assisted μ PAD model.	322
4. Conclusions	330
FIGURE INDEX	333
TABLE INDEX.....	335
CONCLUSIONES.....	337
BIBLIOGRAFÍA	343

ACRÓNIMOS

ACRÓNIMOS

AA: Acrylic acid

AAM: Acrylamide

AcOH: Acetic acid

AD-VS-1: (E)-2,6-dimetoxi-4-((4-((2-vinilsulfonil)etil)tio)fenil)diazenil) fenol

DNA: Deoxyribonucleic acid

AKD: Alkyl ketene dimers

APS: Ammonium persulfate

ASSURED: Affordable, Sensitive, Specific, User friendly, Rapid and robust, Equipment-free, Delivered

BIS: N,N'-methylenebisacrylamide

BLE: Bluefruit Low Energy

CAGR: Compound annual growth rate

CEPs: Conductive electroactive polymers

CHT: Circle Hough Transform

CMOS: Complementary Metal-Oxide Semiconductor

CMYK: Cyan, Magenta, Yellow, Black (Key)

COC: Cyclic olefin copolymer

CTAB: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

CTS: Critical solution temperature

CV: Coefficient of variation

DMAEMA: 2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate

DMPA: 2,2-Bis(hydroxymethyl)propionic acid

DMSO: Dimethyl sulfoxide

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

DVS: Divinyl sulfone

DIW: Direct Ink Writing

EDC: 1-ethyl-3-carbodiimide

EMIES: 2-Ethyl-4-methylimidazole

ERDF: European Regional Development Funds

EtOH: Ethanol

ESI: Electrospray ionization

FDA: Food and Drug Administration

FFF: Fused Filament Fabrication

FOS: Fiber optic sensors

GSV: Gray scale value

hCG: Human chorionic gonadotropin

HEMA: Hydroxyethyl Methacrylate

HSL: Hue, Saturation, Lightness

HSV: Hue, Saturation, Value

IDE: Integrated development environment

IL: Ionic liquid

INP: Interpenetrating networks

LCST: Lower critical solution temperature

LFIA: Lateral flow immune assays

LIFT: Laser-Induced forward transfer

LOD: Limit of detection

MAA: Methacrylic acid

MBAA: N,N'-Methylenebisacrylamide

MCU: Microcontroller unit

MeOH: Methanol

MWCO: Molecular weight cut off

NCS: Natural colour system

NHS: N-Hydroxysuccinimide

NFC: Near field communication

NFS: Near field sensors

NIPAM: N-isopropylacrylamide

NPOE: Nitrophenyl octyl ether

ODTS: Octadecyltrichlorosilane

PA: Poliacrylate

PAA: Poly(acrylic acid)

PAM: Polyacrylamide

PAN-Cu: 1-(2-Piridilazo)-2-naftol

PC: Polycarbonate

PCB: Printed Circuit Board

PCL: Polycaprolactone

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDEAM: Poly(N,N-diethylacrylamide)

PDEAEM: Poli(dimetilaminoetilmetacrilato)

PDMAEMA: Poly(2-dimetilaminoethyl methacrylate)

PDMS: Polydimethylsiloxane

PE: Polyethylene

PEC: Polyelectrolytic complex

PEG: Polyethylene Glycol

PET: Polyethylene terephthalate

PLA: Polylactic acid

PLY: Polygon File Format

PMMA: Polymethyl methacrylate

PMAA: Polymethacrylic acid

PMVE: Polymethyl vinyl ether

POC: Point of Care

PON: Point of Need

PS: Polystyrene

PT: Polyester

PTMOS: Trimetoxifenilsilano

PVA: Polyvinyl alcohol

PVC: Poly(N-vinylcaprolactam)

QR: Quick Response Code

REASSURED: Real-time connectivity, Ease of specimen collection, Affordable, Sensitive, Specific, User friendly, Rapid and robust, Equipment-free, Delivered

RH: Relative Humidity

RFID: Radio frequency identification

RGB: Red, Green, Blue

NMR: Nuclear magnetic resonance

ROI: Region of interest

SD: Standard deviation

SL: Stereolithography

STL: Surface tessellation language

TBP: Tributyl phosphate

TEMED: N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine

TEOS: Tetraethyl orthosilicate

THF: Tetrahydrofuran

TLC: Thin-layer chromatography

TMOS: Trimethoxy(octyl)silane

TMS: Tetramethyl silane

TOAOH: Tetramethylammonium hydroxide

Tris base: Tris(hydroxymethyl)aminomethane

UCST: Upper critical solution temperature

URL: Uniform Resource Locators

UV-Vis: Ultraviolet-visible

WB: White Balance

WHO: World Health Organization

μ CAD: Microfluidic cloth-based analytical device

μ PAD: Microfluidic paper-based analytical device

μ TAD: Microfluidic thread-based analytical device

μ TAS: Micro Total Analysis System

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es el diseño, la optimización y la caracterización de dispositivos analíticos microfluídicos para el análisis de muestras de diversa naturaleza lejos de los centros especializados en ello (laboratorios de análisis clínicos, de control de calidad, de investigación o de cualquier otro tipo). En la fabricación de estos dispositivos se fomentará el uso de materiales que garanticen el mínimo impacto medioambiental y la máxima portabilidad, recurriendo a fibras biodegradables, como papel y tela, y a la sustitución de instrumentos complejos y pesados por lecturas ópticas colorimétricas que pueden realizarse desde aplicaciones de smartphone.

Para alcanzar este objetivo general se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollar químicas de reconocimiento reversibles que respondan rápidamente a variaciones para posibilitar la detección a tiempo real de los analitos presentes en muestras de tipo medioambiental, alimentario y clínico.
- Diseñar y fabricar dispositivos microfluídicos de papel y tela capaces de llevar a cabo varias o todas las etapas del proceso analítico con la mínima intervención humana posible.
- Sintetizar y caracterizar polímeros inteligentes capaces de responder a estímulos como la variación de temperatura o pH.
- Implementar los polímeros capaces de responder a estímulos en los dispositivos de análisis para lograr una mayor automatización de los procesos de análisis.
- Estudiar y caracterizar las variables analíticas que sean determinantes en el uso del dispositivo analítico, así como para lograr alcanzar los estándares medioambientales, sanitarios o de seguridad alimentaria que requieran las muestras elegidas en los contextos de uso del dispositivo.
- Aunar el desarrollo de dispositivos analíticos con los principios de la química verde, reduciendo la generación de residuos y cambiando los reactivos con mayor

peligrosidad o impacto ambiental por otros inocuos o menos perjudiciales tanto para la salud de las personas como para el medio ambiente.

- Desarrollar sistemas de detección integrados o conectados con el smartphone mediante aplicaciones hechas a medida capaces de realizar correcciones de la iluminación ambiental y de convertir las señales analíticas en información fácilmente interpretable por el usuario promedio de los dispositivos de telefonía móvil.

RESUMEN

RESUMEN

La presente Tesis Doctoral expone el resultado del trabajo de investigación que se ha realizado durante cuatro años en el ámbito del diseño y caracterización de dispositivos microfluídicos colorimétricos para análisis de muestras de tipo ambiental, fisiológico y alimentario.

Esta memoria se ha estructurado en cinco capítulos, los dos primeros dedicados a la introducción a la metodología de trabajo y los tres últimos a los dispositivos y estrategias analíticas desarrolladas.

La introducción se ha centrado en explicar los aspectos generales más relevantes y la clasificación de los dispositivos Point of Care (POC) y Point of Need (PON) para, a continuación, profundizar en los dispositivos microfluídicos, la evolución en la selección de materiales más sostenibles y flexibles como soporte de estos, especialmente el papel, y las técnicas de fabricación de dispositivos microfluídicos. Por último, también se ha mostrado el estado del arte en cuanto a las aplicaciones de los dispositivos microfluídicos de soporte flexible.

Por otra parte, en el capítulo dedicado a la metodología se han descrito de manera ordenada cada una de las etapas en el diseño y fabricación de los dispositivos microfluídicos: el diseño, incluyendo la etapa de selección de materiales; las técnicas de fabricación de dispositivos disponibles; la preparación de membranas sensoras; la síntesis de materiales inteligentes y, en particular, de polímeros de N-isopropilacrilamida (NIPAM), tanto en hidrogel como en ionogel; la toma y el análisis de imágenes y las técnicas de caracterización de materiales empleados en los sensores.

El primer dispositivo desarrollado (Sensors and Actuators B: Chemical, 2021, 327, 128948-128956) es una pulsera para medida a tiempo real del pH del sudor con transmisión de información a una aplicación móvil hecha a medida. El sistema consiste en un dispositivo microfluídico de tela (μ CAD) serigrafiado para reducir el volumen y dirigir el flujo de muestra hacia una zona de detección en la que se encuentra retenido covalentemente un indicador colorimétrico que vira con la variación de concentración de hidrogenoiones, una bomba pasiva que alarga la vida útil del μ CAD. Para su uso, éste se introduce en la pulsera que proporciona una iluminación constante, y posee la

electrónica que permite detectar el cambio en la coordenada H del espacio de color HSV y transmitir, via Bluetooth, la información a la aplicación móvil, donde se extrae de forma continua los valores de pH.

El segundo dispositivo (Sensors and Actuators B: Chemical, 2023, 376, 133001-133012) consiste en el desarrollo de códigos de respuesta rápida (QR) para extraer información química, en concreto para el análisis *in situ* de las condiciones ambientales del lugar de trabajo y para el envasado inteligente de alimentos. Para ello se imprimió el código QR en papel (μ PAD) y luego se inmovilizaron en el QR, mediante serigrafía y drop casting, tres zonas sensoras para la determinación de diferentes gases y vapores. Las variaciones en las coordenadas de color de los espacios RGB y HSV de las zonas sensoras se registraron con una aplicación de smartphone hecha a medida, que además permitía leer el código QR y hacer correcciones en función de la iluminación ambiental.

El último trabajo ha consistido en el desarrollo y caracterización de materiales inteligentes capaces de sufrir un cambio de fase como respuesta a variaciones de temperatura. El material de base elegido para estos han sido los polímeros de NIPAM tanto en hidrogeles, que pueden ser usados como repositorio de reactivos en disolución acuosa, como en ionogeles, que han sido usados como ralentizadores de flujo. Además, se han realizado unas primeras pruebas acerca del uso de estos para control de flujo en un dispositivo microfluídico.

CAPÍTULO 1:

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1. Point-of-Care, Point-of-Need

Los sistemas Point of Care (POC) y Point of Need (PON) son los ensayos de laboratorio que se realizan cerca del paciente o del usuario que lo necesita en vez de en un laboratorio central [1]. Normalmente los llevan a cabo personal especializado como pueden ser enfermeros, médicos o técnicos de emergencias sanitarias, pero los pacientes también pueden usar en sus hogares los POC más sencillos y extendidos como, por ejemplo, las pruebas de embarazo o los glucómetros portátiles. Sin embargo, los resultados de los POC se usan para tomar decisiones clínicas y, por lo tanto, necesitan la implementación de un programa que asegure la calidad de los resultados para la seguridad del paciente [1].

Por ello, la WHO estableció siete características que deben cumplir estos dispositivos POC, en concreto: Que sean asequibles, sensibles, específicos, fáciles de usar, rápidos y robustos, libres de instrumentación y que puedan enviarse a quienes los necesitan, que se corresponde con el acrónimo “ASSURED” por el que se le conoce [2]. Sin embargo, en los últimos años, el aumento en la frecuencia y severidad de las emergencias sanitarias globales producidas por enfermedades infecciosas con potencial epidémico, como es el caso del COVID-19, el Zika o el Virus del Nilo Occidental, han hecho que la sociedad tome conciencia de la necesidad de acelerar el desarrollo, validación, producción e implementación de los dispositivos Point-of-Care. Aunque está claro que todos los criterios recogidos en la directriz ASSURED siguen siendo relevantes, existe la oportunidad de mejorarla incluyendo en un renovado acrónimo (REASSURED) la necesidad de conexión a tiempo real (Real-time connectivity, R) y que la recogida de muestra no sea invasiva (Ease of specimen collection, E) [3].

Un aspecto clave por el que los POC están cada vez más extendidos y presentes en nuestras vidas es la rapidez de los resultados que ofrecen frente a los análisis convencionales. Los POC reducen los tiempos de análisis y permiten a los pacientes iniciar sus tratamientos antes, cuando de otro modo habrían tenido que esperar por la saturación del sistema de salud mientras que su enfermedad avanza hacia estadios más agresivos [4].

Además, el lugar de aplicación de los POC no tiene por qué verse limitado a los más evidentes. Algunos dispositivos POC están pensados para su uso en centros médicos y hospitales, siendo de ayuda en una primera toma de decisiones según la gravedad de los pacientes o para un descarte rápido de ciertas patologías frente a otras (triaje) y permiten una mayor velocidad de reacción del sistema sanitario ante una emergencia. No obstante, hay muchos POC que son empleados por los propios pacientes en sus hogares. Las principales ventajas de la posibilidad de controlar el estado de salud de los pacientes desde sus casas es que se reducen el número de visitas a los centros sanitarios, disminuyendo su saturación y evitando poner en riesgo de contagio de otras enfermedades a los pacientes, la pérdida de tiempo y el coste de desplazamientos a pacientes crónicos. Por otra parte, se ha demostrado que el uso de los POCs hace a los enfermos más responsables de su control sanitario, que entiendan mejor sus resultados médicos, estén más satisfechos y se adhieran mejor a sus regímenes de tratamiento, logrando mejores resultados clínicos a la larga [5–8]. Un ejemplo claro de esto es el éxito de los glucómetros, los tests de embarazo o los tests de COVID-19 [9].

Asimismo, pueden ser de especial ayuda en zonas rurales en las que el acceso a los servicios sanitarios está más limitado [10,11], en países en vías de desarrollo [12] y en los casos de enfermedades cuyo diagnóstico suele llevar asociado un estigma, como es el caso del SIDA u otras enfermedades de transmisión sexual [13].

Tabla 1.1 Ejemplos de ensayos que se realizan con dispositivos POC.

Ejemplos de ensayos realizados comúnmente con dispositivos POC [14]
Control de glucosa desde el hogar
Medidas de gases y electrolitos en sangre
Control de la coagulación (niveles de protrombina), incluido el tiempo de coagulación activa
Detección de marcadores de enfermedades cardíacas
Detección de sangre oculta en las heces
Tests de embarazo
Tests de orina
Tests de enfermedades infecciosas como el VIH, la gripe A/B, la COVID-19, etc.

También en el aspecto económico los POC ofrecen ventajas: El coste de estos dispositivos es generalmente menor al de los análisis convencionales de laboratorio ya que los instrumentos empleados para la detección suelen ser menos costosos al ser más pequeños y menos complejos, y no suele haber contacto directo entre el sistema de lectura y las muestras, por lo que la mayoría no precisa de subsistemas de limpieza [9].

Por su parte los dispositivos Point of Need (PON) presentan las mismas ventajas, pero sus aplicaciones están orientadas a la adquisición de información en cuestiones no médicas como pueden ser los problemas medioambientales, en los que detectar rápidamente una alteración del medio permite una actuación rápida para que no se extienda la contaminación y afecte mayores áreas, dañando la biodiversidad; alimentarios, en los que el envasado inteligente de alimentos promete ser de ayuda para reducir el desperdicio de alimentos; farmacéuticos, para controlar durante todo el proceso de fabricación y distribución la calidad de los fármacos, etc.[15].

2.1 Clasificación

Los dispositivos POC y PON se pueden clasificar según su funcionamiento en tres grupos:

Tiras sensoras (Dipsticks). La primera tira sensora para cuantificar la glucosa en la orina se propuso en 1950. Hoy en día hay un gran número de varillas sensoras comerciales para análisis de muestras, orina principalmente, adaptados a un gran número de analitos.

Las tiras sensoras (p. ej. de pH o de orina) son fáciles de diseñar, fáciles de manufacturar y cómodas de usar. Generalmente consisten en pequeñas almohadillas en las que se han retenido diferentes reactivos que originan rápidos cambios de color como resultado de la interacción de estos con los componentes de las muestras [16]. Las tiras de pH se fabrican sumergiendo papel de filtro en una mezcla de indicadores ácido-base en una proporción determinada. Al humedecer con la muestra el papel seco se producirá un cambio de color que nos permitirá establecer la concentración de protones de manera semicuantitativa. De manera similar, las tiras de los tests de orina se han diseñado para detectar productos metabólicos en la orina, que se han convertido en herramientas

básicas de diagnóstico de cambios patológicos como puede ser un aumento de las proteínas en la orina de un paciente con daños nefríticos [17].

A pesar de ser simples, rápidas y baratas, las tiras sensoras tienen limitaciones en términos de sensibilidad, selectividad y reusabilidad. Con respecto a la sensibilidad, solo resulta limitante cuando se pretende detectar analitos que se encuentran a concentraciones extremadamente bajas, no siendo crítico en el resto de los casos. Además, como las tiras sensoras son colorimétricas, solo es posible el análisis semicuantitativo, en la que los resultados solo dan una estimación de la cantidad de sustancia presente. Para ello, los resultados de los ensayos se obtienen comparando el color de la tira con una carta de color a simple vista, y pudiendo las condiciones de iluminación y la percepción del color pueden afectar a la veracidad de la prueba.

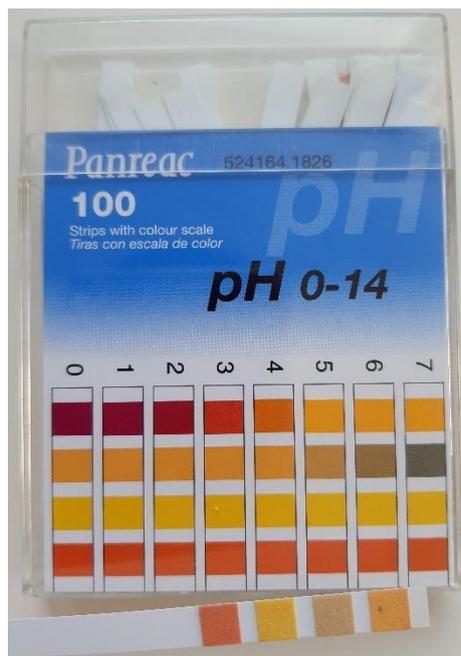


Figura 1.1 Tira sensora de pH de la casa comercial Panreac.

Con respecto a la selectividad, las muestras de orina y otras muestras biológicas son complejas y contienen muchos componentes que pueden dar lugar a falsos negativos o falsos positivos. Así pues, se suele recomendar que se lleven a cabo ensayos convencionales de laboratorio para confirmar los resultados.

Finalmente, la reusabilidad podría reducir el coste por dispositivo y reducir la contaminación producida derivada de su uso además de facilitar la calibración continua para una mayor precisión [16].

Ensayos de flujo lateral. Los ensayos de aglutinación de látex y los radioinmunoensayos se pueden considerar antecedentes de los ensayos de flujo lateral y están fechados en la década de los 50 [18,19]. A pesar de que las membranas de nitrocelulosa se han usado históricamente para filtración, no se adaptaron como sustrato para la detección molecular hasta los años 70. En los 80s empezaron a emerger los ensayos de flujo lateral serológicos, especialmente las pruebas de embarazo, derivados del desarrollo de los radioinmunoensayos con la subunidad beta del hCG. Desde entonces las pruebas comerciales rápidas de flujo lateral se han expandido mucho más allá del diagnóstico clínico introduciéndose también en veterinaria, industria alimentaria, medioambiente, defensa biológica y sustancias de abuso [2].

Los ensayos de flujo lateral más comunes son los de inmunoensayo (LFIA), que implican la interacción de la muestra con un anticuerpo marcado que se precarga en una tira que puede ser de polímero plástico, nitrocelulosa o papel, entre otros materiales [20].

Los LFIA están normalmente compuestos por varios materiales y cada uno tiene un propósito. Las partes solapan unas sobre otras y se confinan en una cajita o casete de plástico cerrado usando un adhesivo sensible a la presión (Ver Fig. 1.2). Cuando se lleva a cabo una prueba de este tipo, la muestra se adiciona en el extremo proximal de la tira, lo que se conoce como zona de muestreo. Aquí la muestra se trata para hacerla compatible con el resto de etapas del análisis que se van a llevar a cabo en el dispositivo.

La muestra tratada migra por capilaridad hasta alcanzar la siguiente almohadilla, en la que se han inmovilizado partículas de oro coloidal o de látex monodispersas conjugadas con un componente específico del ensayo biológico, bien el antígeno o el anticuerpo, dependiendo del formato del ensayo. La muestra vuelve a movilizar el conjugado seco y el analito de la muestra interacciona con él, migrando ambos a la siguiente sección, que es la matriz de reacción.

Esta matriz de reacción consiste en una membrana porosa en la que se ha inmovilizado el componente biológico específico del ensayo. Suelen ser proteínas, bien un anticuerpo

o un antígeno, que se han puesto en áreas específicas en forma de bandas donde capturan al analito y el conjugado conforme migran. El exceso de reactivos se desplaza más allá de las líneas de captura y se atrapan en la almohadilla absorbente. Los resultados se interpretan en función de que aparezcan o no líneas con el conjugado capturado y pueden verse a simple vista o con un lector [21]. Habitualmente incluyen una línea de control constituida por anticuerpos secundarios o inmunoglobulinas que reaccionan con el anticuerpo libre de analito excedente de la línea de captura. La línea de control, por tanto, sirve para reconocer el reactivo marcado y señalar que el dispositivo funciona correctamente tanto si hay analito en la muestra como si no.

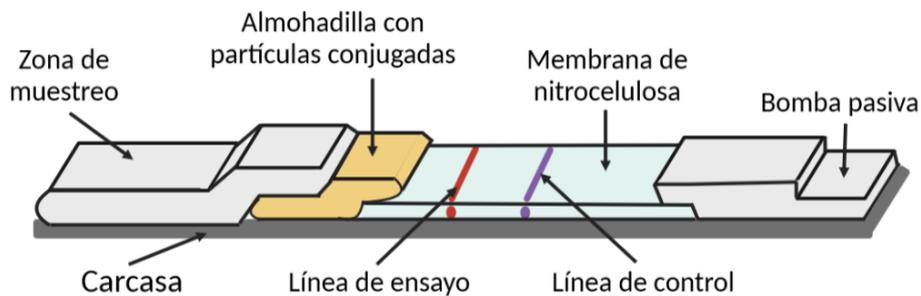


Figura 1.2 Esquema de los componentes de un inmunoensayo de flujo lateral.

El formato de los inmunoensayos de flujo lateral puede ser directo (sándwich) o competitivo (inhibición):

- En el tipo directo o sándwich, un resultado positivo viene indicado por la presencia de una línea en la prueba. En presencia de analito, parte de las partículas conjugadas reaccionan con él para formar complejos partícula-analito. Posteriormente estos complejos y el exceso de partículas conjugadas libres de analito migran con el flujo del fluido hasta llegar a la línea de ensayo. En esta, los complejos son capturados por interacciones entre la línea y el analito. Sin embargo, las partículas conjugadas libres de analito pueden sobrepasar la línea de prueba y ser capturadas en la línea de control. Se suelen usar para ensayar analitos de mayor tamaño con múltiples sitios antigénicos como pueden ser el antígeno del Dengue o el del virus del VIH.

- En el tipo competitivo o de inhibición, las partículas conjugadas pueden reaccionar con las moléculas de captura depositadas en ambas líneas, la de ensayo y la

de control. El analito compite con las moléculas captadoras por los sitios de unión en la línea de ensayo dando lugar a que no haya una agregación de las partículas conjugadas en esta. Sin embargo, en ausencia de analito, las partículas conjugadas pueden ser capturadas tanto en la línea de prueba como en la de control. Se emplea sobre todo cuando se están ensayando moléculas más pequeñas con un solo determinante antigénico que no puede unirse a dos anticuerpos simultáneamente [17].

Existen también formatos alternativos al flujo lateral como es el flujo a través, que es vertical, pero suelen ser más complejos que los ensayos de flujo lateral y su uso tiene más etapas, por lo que requieren personal especializado para realizarlos y son menos usados.

Ensayos microfluídicos. Por su parte, el ensayo microfluídico ofrece control preciso del flujo de las muestras y reactivos a través de canales de tamaño micrométrico permitiendo la separación y detección de los analitos de interés [2].

Merece la pena para el propósito de esta Tesis Doctoral profundizar más en los dispositivos microfluídicos y sus ventajas frente otros formatos de dispositivos POC y PON.

2. Dispositivos microfluídicos

Un sistema microfluídico es un dispositivo en el que uno o más líquidos avanzan a través de canales de diámetro micrométrico. El pequeño tamaño de estos dispositivos hace que tengan propiedades físicas diferentes respecto a los sistemas macroscópicos cuando se confinan en ellos líquidos y permiten que se lleven a cabo procesos químicos usando volúmenes mínimos, tanto de reactivos como de muestra. Por este motivo también se reducen significativamente los residuos químicos generados durante el desarrollo y el uso del dispositivo en comparación con la macroescala tradicional.

Los flujos a microescala tienen beneficios más allá del acercamiento a la deseada química verde, ya que en microfluídica los fluidos presentan un número de Reynolds muy bajo. Esto implica la existencia de un flujo laminar, que permite un control efectivo

de parámetros de reacción críticos como son la temperatura, la velocidad de mezcla, la concentración de reactivos, etc.

Además, cuando se escalan los procesos hacia menores dimensiones, la fuerza gravitatoria ya no es la dominante en los fluidos. Las fuerzas capilares cobran protagonismo en los materiales porosos y se pueden usar para conducir líquidos sin necesidad de bombas externas [22].

Cuando consideramos los materiales comúnmente usados en dispositivos microfluídicos se observa una tendencia a sustituir materiales rígidos y con un alto impacto ambiental como el silicio o el vidrio, por materiales basados en fibras.

3. Materiales

Los primeros sustratos en los que se desarrollaron dispositivos microfluídicos fueron el vidrio y el silicio. En 1970, Terry et al. [23] fabricó un sistema para cromatografía de gases completo en una oblea de silicio mediante fotolitografía. Sin embargo, la comunidad investigadora no centró su atención de nuevo en investigar en mayor profundidad posibles sustratos para la reducción de los sistemas de análisis hasta que en la década de los 90 Manz et al. [24] introdujo el concepto de microsistema de análisis total (μ TAS), en el que tienen lugar todas las etapas del análisis en un mismo microdispositivo. Fue entonces cuando se empezaron a buscar nuevos materiales que presentasen una alternativa a las dificultades de manufactura, la rigidez y el alto coste de los sustratos de silicio y vidrio [25].

Plásticos. Los plásticos son materiales habituales para microfluídica ya que colectivamente ofrecen una amplia variedad de propiedades deseables entre las que se encuentra la posibilidad de dejar pasar la luz, resistencia a disolventes, métodos de escalado de la producción, etc. Además, hay materiales que son prometedores en relación a la biocompatibilidad y la modificación superficial e integración de materiales funcionales. El poli(dimetilsiloxano) (PDMS) y otros polímeros como el policarbonato (PC), el poli(metilmetacrilato) (PMMA), el poliacrilato (PA), el copolímero de cicloolefinas (COC), el poliéster (PT), poli(etilentereftalato) (PET), el poliestireno (PS),

polietileno (PE) y el tóner de poliéster han sido de los más empleados en dispositivos microfluídicos debido a su bajo coste y sus adecuadas propiedades mecánicas y eléctricas [25].

El PDMS es el material polimérico más usado con aplicaciones microfluídicas, pues ofrece numerosas ventajas que incluyen la transparencia óptica, la compatibilidad para estudios biológicos, el bajo coste y la capacidad de adherirse a superficies planas y lisas [26–28]. Hay múltiples ejemplos de aplicaciones biomédicas que emplean el PDMS como sustrato, incluyendo la detección de tumores, la evaluación de actividad anticancerígena, el diagnóstico del virus de la gripe, etc. [29].

El PA es uno de los plásticos más sencillos y útiles gracias a su bajo coste, alta transparencia óptica, amplia disponibilidad y compatibilidad con multitud de herramientas usadas para la fabricación de dispositivos. Otros plásticos similares como el PC pueden ser adecuados en los casos en los que sea necesaria incluso una mayor claridad óptica, aunque este no pueda ser cortado mediante láser ya que tiende a decolorarse o quemarse [30].

Además, las cintas adhesivas de doble cara son materiales ideales para unir y ensamblar partes de dispositivos microfluídicos. Elegir la cinta adhesiva puede ser una tarea compleja teniendo en cuenta la amplia gama disponible. Algunas consideraciones clave para ello son: 1) Aspectos relacionados con la fabricación, 2) Espesor de la cinta y 3) Coste/Disponibilidad.

Para fabricar dispositivos de plástico que se mantengan unidos con cinta adhesiva de doble cara, puede ser difícil cortar los canales microfluídicos si no tienen ambas caras cubiertas con el protector [30].

A pesar de la innegable utilidad de los plásticos como componentes de los dispositivos microfluídicos, los sustratos basados en fibras han ganado popularidad desde 2007 debido a que se obtienen de fuentes renovables y pueden ser eliminados por incineración, lo cual es útil para dispositivos de un solo uso que puedan entrar en contacto con muestras de riesgo biológico [31,32]. Además, su abundancia y facilidad de fabricación dan una oportunidad para llevar a cabo ensayos diagnósticos y

medioambientales en lugares remotos o con pocos recursos [33]. Entre estas fibras se encuentran el papel, el hilo y la tela.

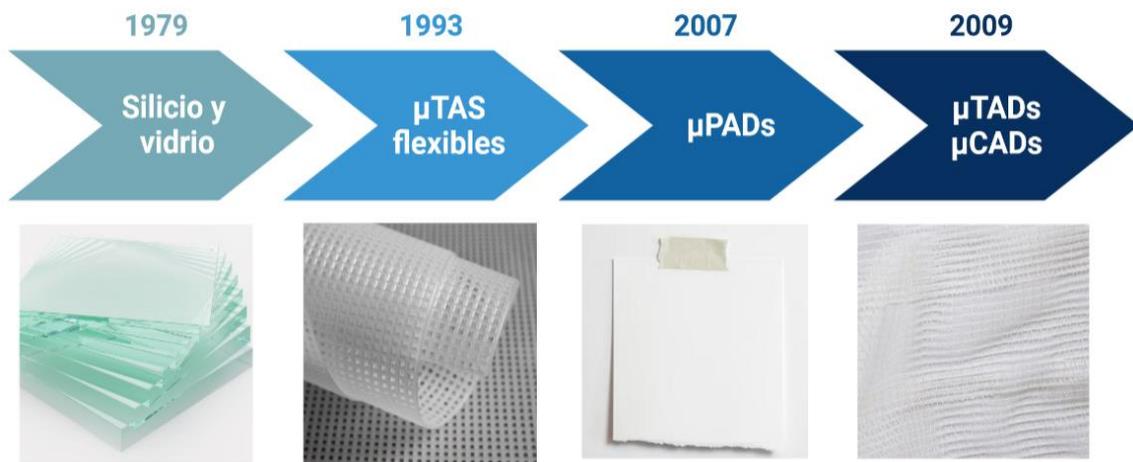


Figura 1.3 Línea temporal de los materiales usados en dispositivos microfluídicos.

Las características más importantes comunes a las fibras empleadas en dispositivos microfluídicos son:

- El principal mecanismo impulsor del flujo es la capilaridad. La superficie hidrofílica de las fibras favorece la adhesión y expansión de los líquidos mientras que la tensión superficial del líquido tiende a disminuir el área interfacial líquido-gas, resultando en un mojado espontáneo. El flujo dirigido capilarmente se genera, por tanto, a través del medio poroso y se mantiene por la diferencia de presión entre el área mojada y el área seca en el frente del líquido, donde la presión es menor. El mojado de las fibras se puede predecir y analizar usando dos modelos: el de Lucas-Washburn, que se deriva de la ley de Hagen-Poiseuille, que considera que los poros del medio son como tubos capilares isotrópicos; y la ley de Darcy, que se desarrolla fenomenológicamente [34].

- Por otra parte, los poros de tamaño micrométrico de las fibras dan lugar a números de Reynolds inferiores a 1:

$$Re_p = \frac{\rho V \delta}{\mu} < 1 \quad (\text{Ecuación 1.1})$$

Donde ρ es la densidad de fluido (kg/m^3), V es la velocidad del fluido (m/s), δ es el tamaño de poro característico (m) y μ es la viscosidad dinámica del fluido ($\text{Pa}\cdot\text{s} = \text{N}\cdot\text{s/m}^2$). Este es un parámetro que determina el dominio en el que se puede estudiar y modelar la microfluídica de la fibra. La primera consecuencia de que el número de Reynolds sea inferior a 1 es que hay un dominio de las fuerzas viscosas y el flujo es laminar. Como resultado, la velocidad de flujo depende mayoritariamente del equilibrio entre la tensión superficial y la resistencia viscosa [34].

El $Re < 1$ permite también una aproximación fiable del flujo de fluido a través del papel de filtro de celulosa con la ley de Darcy, que se estableció experimentalmente para caracterizar el flujo de fluido en ajustes hidrológicos. La ley de Darcy solo es aplicable a fluidos incompresibles y newtonianos (con densidad y viscosidad constantes). Describe el flujo volumétrico en un medio permeable poroso como es una tubería llena de arena como una función de la altura, la presión de fluido y una constante de proporcionalidad (ver Fig. 1.4):

$$Q = -AK \frac{\Delta h}{L} = -AK \frac{\Delta\left[\left(\frac{P}{\rho g}\right) + z\right]}{L} \quad (\text{Ecuación 1.2})$$

Donde Q es el flujo volumétrico (m^3/s), A es el área de flujo perpendicular a L (m), K es la conductividad hidráulica (m/s), h es la cabeza hidráulica o altura (m), que es la suma de la presión de cabeza (P) y la elevación (z); L es la longitud de paso del flujo, que se ve afectada por la tortuosidad del medio (m); g es la aceleración de la gravedad (m/s^2); y ρ es la densidad del agua (kg/m^3). El signo negativo en la ecuación indica que la cabeza hidráulica disminuye con la dirección del flujo.

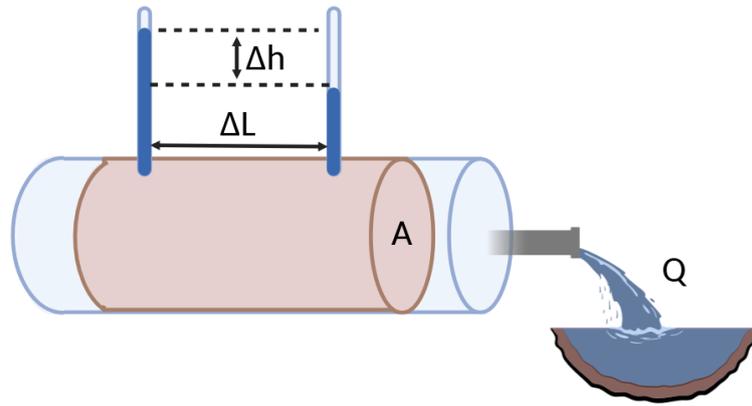


Figura 1.4. Esquema de la ley de Darcy

En otras palabras, el fluido se mueve desde presiones más altas hacia zonas de presión más baja. La conductividad hidráulica (K) es el coeficiente de proporcionalidad y es una función tanto de la permeabilidad del medio como de las propiedades del fluido. Puede expresarse como:

$$K = \frac{\kappa \rho g}{\mu} \quad (\text{Ecuación 1.3})$$

Donde κ es la permeabilidad intrínseca del papel (en m), ρ es la densidad del fluido, g la aceleración de la gravedad y μ la viscosidad dinámica del fluido. Esta asunción condujo al desarrollo de una relación entre la ratio de mojado en el medio de expansión. Schuchardt y Berg asumieron que el radio de poro disminuye continuamente, lo cual no es el caso de las tiras de papel o tela completamente mojadas donde la expansión rápidamente alcanza su máximo. Consecuentemente, su modelo solo es aplicable durante el proceso de mojado [34].

La ecuación de Washburn también fue modificada para incluir el término de la gravedad y extender su aplicación a casos en los que la inercia de la columna de líquido no puede negarse. Este es el caso del mojado vertical donde el líquido cesa de subir debido al balance entre la tensión superficial y la gravedad. Esta consideración es particularmente importante cuando se hacen dispositivos microfluídicos de fibra tridimensionales [34].

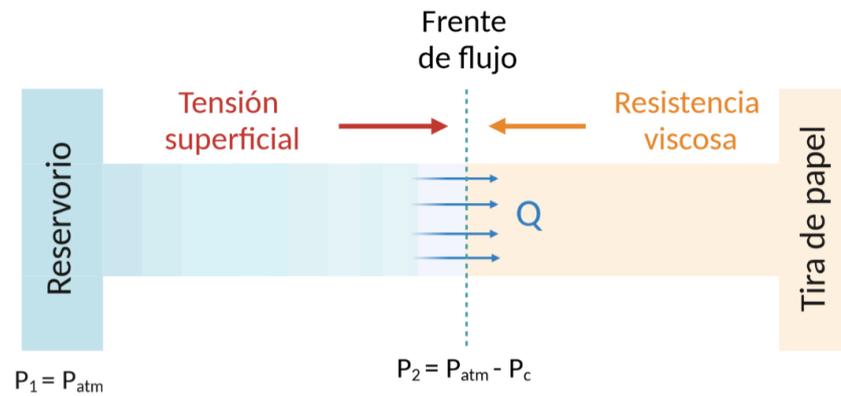


Figura 1.5 Esquema de las fuerzas implicadas en la microfluídica en papel.

P_{atm} : Presión atmosférica, P_c : Presión debida a fuerzas capilares, Q : Flujo de fluido.

Trabajos más recientes se han centrado en el estudio del flujo en diferentes geometrías de canales en tiras de fibra como una forma de mejorar el pretratamiento de la muestra y las capacidades de detección [34].

Hilo y tela. El hilo es un sustrato alternativo para el uso en plataformas microfluídicas. El hilo es poroso, barato y está disponible globalmente, pero quizás la ventaja más significativa de los hilos textiles en microfluídica es la facilidad para modificar el comportamiento del flujo en ellos mediante la creación de redes o la modificación de las dimensiones de los microcanales, bien sea trenzando, cosiendo o atando los hilos. Es por ello que a los primeros μ TADs propuestos por Reches et al. [35] y Li et al. [36] les han seguido muchos diseños de dispositivos microfluídicos que emplean hilos. Quizás el modelo más simple sea el de sujetar un solo hilo en un soporte, pero otra posibilidad es utilizar varios hilos en configuraciones paralelas para llevar a cabo varios análisis a la vez. Los nudos también pueden ser usados para controlar la separación de flujo, el mezclado de disoluciones y actuar como zonas de detección y se pueden hacer fácilmente entre piezas de materiales del mismo o de diferente tipo [37,38].

Un aspecto crítico en la microfluídica, tanto de hilo como de telas, es que su capacidad de transportar flujo por capilaridad depende de la hidrofobicidad de la superficie. Los hilos de algodón, que son los más usados en dispositivos microfluídicos, suelen tener una capa de cera en su superficie, bien sea natural o añadida durante procesos de fabricación. Esta capa hidrofóbica reduce las propiedades de mojado de los hilos de algodón. Además, los hilos de otros materiales como pueden ser el nylon, la lana, etc.

también pueden mostrar baja hidrofiliidad. Para aumentar su capacidad de mojado es necesario llevar a cabo un tratamiento superficial [39,40].

El tratamiento con plasma fue uno de los primeros métodos que se usaron para aumentar la polaridad de los hilos. La exposición al plasma provoca la oxidación de la superficie de las fibras, activándolas y creando grupos oxigenados polares. Sin embargo, el tratamiento con plasma provoca daños en la superficie de los hilos, por lo que ha sido progresivamente sustituido por otro tipo de tratamientos para mejorar la humectabilidad [41].

Los tratamientos superficiales más comunes llevados a cabo son los lavados empleando agua, surfactantes o jabón comercial, aunque las disoluciones calientes de NaOH y Na₂CO₃ han demostrado mayor efectividad en la retirada de las ceras de los hilos de algodón [42]. Tras del lavado, los hilos se enjuagan con agua para eliminar el medio básico y finalmente, se suelen dejar secar a temperatura ambiente antes de ser empleados en los μ TADs.

Aparte de eliminar las impurezas de la superficie y aumentar la humectabilidad de los hilos, se pueden hacer modificaciones adicionales para hacer estos sustratos más adecuados a su aplicación como μ TADs. Se puede hacer reaccionar parcial o totalmente la superficie hidroxilada de las fibras de celulosa para dar lugar a derivados de esta [25]. Por ejemplo, se pueden modificar los hilos de algodón con quitosan para aumentar la duración del tratamiento de mejora de la humectabilidad [43] o se pueden cubrir con PVC (cloruro de polivinilo) a modo de membrana de intercambio de iones selectiva para la detección colorimétrica de ciertos iones [44].

Papel. El grupo del Prof. George Whitesides en la Universidad de Harvard fue pionero en el desarrollo de dispositivos analíticos microfluídicos basados en papel (μ PADs) en 2007 [45].

El papel de celulosa es un material permeable compuesto de una matriz sólida con un diámetro medio de fibra de 1-100 μ m y tamaño de poro promedio de 1-10 μ m. La geometría y naturaleza hidrofílica de la celulosa determina las propiedades microfluídicas del papel.

La selección del papel para un dispositivo microfluídico depende del uso que se le vaya a dar y no hay un solo tipo de papel que tenga las características deseadas para todas las aplicaciones. Los papeles comerciales difieren en porosidad, retención de partículas, velocidad de flujo y espesor. El tamaño de poro (nominal o absoluto) se relaciona con el tamaño de las partículas retenidas en un filtro y la porosidad ayuda a estimar el volumen total de muestra necesario para mojar piezas de papel de dimensiones conocidas.

Cuando el espesor aumenta, también lo hace el volumen necesario para mojar el papel. En caso de que no haya un absorbente en el dispositivo, este parámetro es especialmente importante porque determina la cantidad total de muestra que puede ser absorbida. Además, si el papel es muy fino es fácil que se rompa durante un proceso de manufactura [2].

Materiales como el papel de filtro, papel de grafito o el papel cromatográfico se componen de celulosa pura y carecen de los aditivos, que refuerzan la estructura, habitualmente presentes en muchos otros papeles, que son potencialmente perjudiciales para el funcionamiento de los ensayos analíticos. Además, el papel de filtro y el cromatográfico sufren el blanqueamiento completo durante su manufactura, el cual elimina virtualmente todas las impurezas del papel. La estructura de celulosa del sustrato del μ PAD puede funcionalizarse y sirve como canal ideal y andamiaje para el transporte e inmovilización de varios sustratos usados en ensayos analíticos. En la práctica, los compuestos cargados positivamente se adsorben electrostáticamente en la superficie ligeramente aniónica de la celulosa, mientras que los no iónicos o aniónicos no lo hacen. Además, las proteínas muestran una cierta interacción electrostática con las fibras de celulosa a través de sus regiones catiónicas. La posibilidad de formar enlaces covalentes se explota frecuentemente para un anclaje más robusto de biomoléculas. En cualquier caso, ya que los grupos hidroxilo de la celulosa no son lo suficientemente reactivos en condiciones medias, se necesita un mayor procesamiento para inmovilizar covalentemente varias biomoléculas en la superficie del papel. Típicamente este procesamiento toma la forma de derivatización de los grupos hidroxilo a aldehídos o grupos epoxi, la introducción de poli(carboxibetaina) seguida de la química EDC/NHS o la modificación de los grupos hidroxilo usando divinilsulfona [46].

Ventajas adicionales del papel para hacer dispositivos de diagnóstico REASSURED [47]:

- Es fino, ligero y está disponible en un amplio rango de espesores, siendo fácil de almacenar y transportar.
- Está hecho habitualmente de celulosa o mezclas de polímero con celulosa y es compatible con las muestras biológicas.
- Puede ser modificado químicamente para incorporar una gran variedad de grupos funcionales que pueden unirse covalentemente a proteínas, ADN o moléculas pequeñas.
- Es normalmente blanco y esto hace que sea un buen medio para los ensayos colorimétricos porque da un mayor contraste en comparación con los sustratos coloreados.
- Es inflamable por lo que pueden quemarse los dispositivos después de su uso de forma fácil y segura.
- Es flexible y compatible con muchas técnicas de impresión que pueden ser usadas para fabricar los μ PADs.

4. Técnicas de fabricación de μ PADs

Para crear canales y barreras en el papel se han propuesto recientemente varias aproximaciones que incluyen el corte, la fotolitografía, el plotting, el inkjet, el grabado con plasma, la impresión con ceras, etc. Las dimensiones de los canales resultantes junto con las características del papel y las condiciones ambientales de temperatura y humedad afectan a la velocidad de absorción del fluido.

Los métodos pueden inicialmente dividirse en químicos o físicos.

Métodos químicos

Fotolitografía. Fue de los primeros métodos usados para hacer microcanales para sensores basados en papel. Se trata de una técnica de fabricación convencional basada en la exposición a radiación UV de un fotoresist (laca fotosensible) a través de una máscara transparente que presenta el diseño deseado. Entre los fotoresists más

empleados se encuentran el SU-8, el poli(o-nitrobencil metacrilato) (PoNBMA) y el octadeciltriclorosilano (ODTS) [48]. Los fotoresists comerciales como la SU-8 dan excelentes resultados con tamaños inferiores incluso a 1 μm . Sin embargo, la fotolitografía tiene dos desventajas principales:

A. La barrera endurecida puede agrietarse fácilmente por lo que hace más probable que afecten los daños por flexión y plegado.

B. El procedimiento normalmente requiere de instrumentación cara y múltiples pasos, aunque la fotolitografía casera de baja resolución de dibujo se puede emplear en algunos casos.

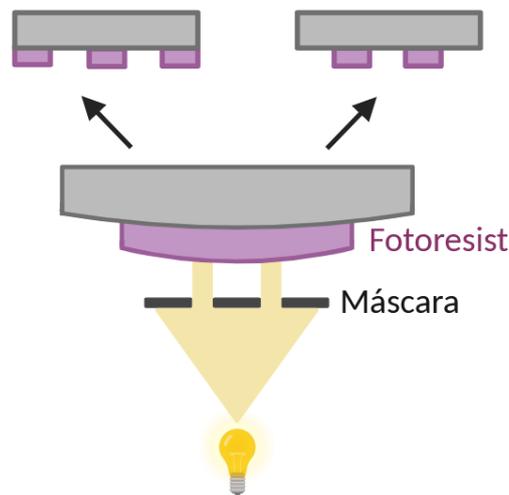


Figura 1.6. Esquema del proceso de fotolitografía.

Para lograr reducir los costes de fabricación, se emplean fotoresists basados en epoxi que son más baratos que la comercial SU-8 [49]. Un ejemplo de uso de esta técnica en la fabricación de dispositivos analíticos sería el dispositivo microfluídico flexible diseñado por Ma et al. [50] para determinar glucosa en el sudor para cuya fabricación se empleó un copolímero de acrilato (SL-03) como capa de separación entre un soporte de vidrio y una capa de Ag-Pd-Cu/ZnO. La capa metálica fue sometida a un revelado y posteriormente se eliminaron las zonas enmascaradas con un grabador químico. La capa de copolímero con el diseño deseado finalmente se transfiere del vidrio a una película de PET y se inmoviliza la glucosa oxidasa.

- Impresión. Es la técnica más reciente y popular usada en la fabricación de dispositivos microfluídicos de papel. Se han usado diferentes materiales para imprimir el papel dando lugar a diferentes técnicas que incluyen la impresión con cera, la inyección de polímeros como los dímeros de alquilceteno (AKD) y la serigrafía con tintas de carbono y plata para fabricación de electrodos. A pesar de que la impresión con cera tiene menos resolución que la fotolitografía (en torno 700 μm es la línea más fina que se puede hacer por este método), las áreas hidrofílicas no se exponen a un fotoresist, polímeros o disolventes. Por lo tanto, no requiere un paso de procesado de las áreas hidrofílicas [34]. Un ejemplo del uso de la impresión con cera es el μPAD fabricado por Asif et al. [51] para la detección de *Staphylococcus aureus* y *E. coli* en muestras de leche. Para desarrollarlo imprimieron círculos de 7 mm de diámetro usando una impresora de cera y después los impregnaron con sustancias cromogénicas que reaccionan con ciertas enzimas bacterianas originando un cambio de color que detectaron por espectrometría UV-Vis.

- Tratamiento de plasma. Para hacer el papel hidrófobo, primero se sumerge en una disolución de AKD en heptano, se deja secar y a continuación se calienta a 100°C durante 45 minutos para curar el AKD. El resultado es papel completamente hidrófobo. Las regiones hidrófilas se definen posteriormente aplicando tratamiento de plasma a través de máscaras metálicas que definen el diseño deseado.

- Plotting. El penplotting emplea un plóter x-y o una plantilla para fabricar μPADs . Se emplea tinta hidrófoba como el PDMS disuelto en hexano en un plotter x-y modificado, para imprimir la superficie del papel. El PDMS penetra en el papel y forma barreras con espesores de hasta 1 mm. Las ventajas de esta técnica son su bajo coste y la flexibilidad física del dispositivo. También en este caso se puede usar la cera como tinta en un bolígrafo trazando en un papel el dibujo por ambas caras y posteriormente calentándolo en un horno a 150°C durante al menos 5 minutos. Nie et al. [52] describió un método de grabado de un solo paso que emplea un rotulador permanente y una máscara metálica para fabricar un dispositivo en tan solo un minuto y Chakraborty et al. [53] publicaron un método de fabricación de μPADs de un solo paso usando un lápiz corrector. Opuesto a la cera, este marcador no requiere calentar ya que la tinta penetra durante el grabado. A pesar de que este método es muy sencillo, el espesor de la barrera

resulta difícil de controlar. Es importante también tener en cuenta que tanto la cera como las tintas comerciales son incapaces de bloquear completamente todos los poros de papel cuando penetran a su través materiales hidrófobos, como pueden ser aceites, debido a la similitud en su naturaleza química.

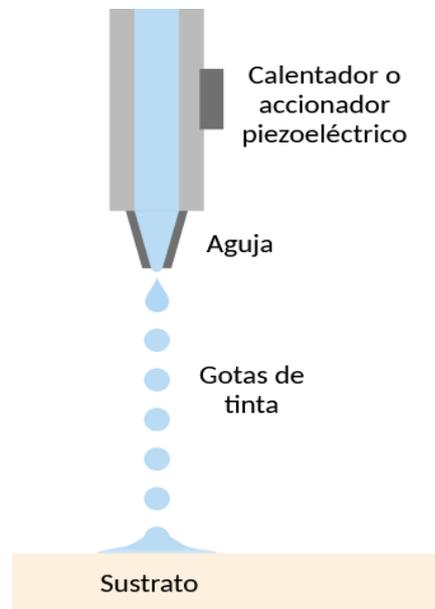


Figura 1.7. Esquema del proceso de ink-jet printing.

- Ink-jet printing. El tratamiento de plasma previamente descrito fue mejorado por Shen et al. y ahora se usa para fabricar μ PADs con impresión por inyección de tinta tal y como se muestra en el esquema de la Fig. 1.7. En este método se emplea un disolvente (p. ej. AKD en heptano) en lugar de tinta en una impresora comercial adaptada para dibujar un diseño en papel. Esta tecnología está comúnmente disponible en el mercado mientras que la impresión de cera y el pen plotting están aún en sus etapas iniciales en términos de comercialización. Muchos investigadores modifican las tintas y las características de la impresión para fabricar μ PADs y simplificar el proceso para la producción en masa. A pesar de que es una técnica simple, tiene como principal desventaja el deterioro causado en la impresora, especialmente los cartuchos, por los disolventes orgánicos [54,55]. Abe et al. [56] recubrieron papel con una capa hidrófoba de poliestireno y a continuación aplicaron tolueno con una impresora para dibujar canales hidrófilos en los que retuvieron la química de reconocimiento colorimétrica para pH, proteína total y glucosa para análisis de orina. Recientemente Citterio et al. [57] ha

usado una impresora sencilla de escritorio para depositar los reactivos necesarios para un μ PAD para la determinación colorimétrica de iones calcio en muestras de agua de grifo.

- Impresión láser. Las técnicas de bajo coste de impresión como son la impresión con ceras o con inyección de tintas también se han desarrollado para la fabricación de μ PAD, aunque este tipo de impresoras no hayan sido tan usadas o requieran modificaciones en la composición para este propósito. Opuesto a esto, la impresora láser ha demostrado la ventaja de ser una técnica de fabricación simple y de alta resolución empleando un dispositivo comercial. En ella se hace incidir un rayo láser sobre la superficie de un cilindro conductor y posteriormente se pone este cilindro en contacto con la tinta en polvo que se quiere imprimir. Las partículas son atraídas por los puntos ionizados y posteriormente se traspasan al sustrato y se fijan con presión y calor tal y como se muestra en la Fig. 1.8.

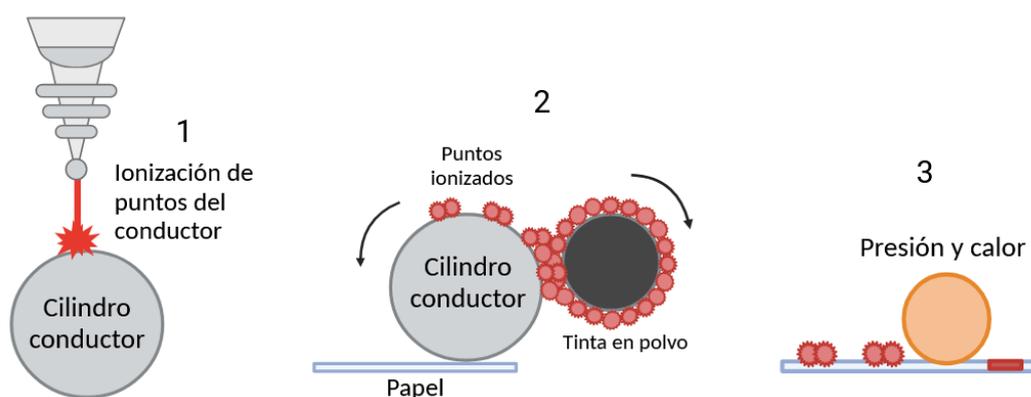


Figura 1.8. Esquema del proceso de impresión láser.

- Impresión flexográfica. Otro método de producción masiva usado en las imprentas son la flexografía, en su doble modalidad en papel y en plástico. En este método, la tinta de poliestireno mezclada en tolueno o xileno se estampa mediante una placa flexible con relieve que se mueve a alta velocidad. Esta técnica también puede imprimir tintas con biomoléculas, haciendo la fabricación de un μ PAD completo en un proceso de un solo paso. La tinta de PDMS también puede ser impresa flexográficamente en papel de copia, pero requiere seis capas de pintura para la completa penetración en el papel, comparada con la impresión de inyección. Las

limitaciones de la impresión flexográfica están en sus planchas de impresión especializadas, múltiples pasos de impresión y el uso de una sola tinta en cada momento, lo cual obstaculiza la funcionalidad del diseño. Estas limitaciones se contrarrestan con la alta capacidad de fabricación, que la hace una técnica viable para la producción en masa [58]. El método de impresión flexográfica es especialmente útil para escalar los procesos de fabricación de dispositivos analíticos, como demostraron Hiltunen et al. [59] desarrollando un sistema que permite fabricar miles de dispositivos capaces de amplificar el ARN ribonucleico de un virus mediante amplificación isoterma mediada por bucle.

- **Estampado.** Curto et al. [60] describió un método de fabricación rápido usando un tampón fabricado en PDMS y una tinta indeleble. Los autores emplearon tres tintas comerciales hidrófobas como la Back 214, la Noodler ink™ y la Black lumocolor® pero solo una proveía suficiente hidrofobicidad. Para usar la técnica de estampado se presiona contra una alfombrilla saturada de tinta el tampón de PDMS tres veces y luego se pone en contacto este tampón con el papel de filtro durante 3 s sin aplicar fuerza. La fabricación completa se consigue en menos de 10 segundos sin requerir ningún tipo de etapa de lavado, siendo la sencillez y rapidez del método sus principales ventajas. Sin embargo, la fabricación del sello en PDMS es compleja. Otro método similar sería sumergir papel en parafina líquida, dejarla solidificar a temperatura ambiente y después situarla sobre la superficie del papel nativa; con un tampón metálico se puede precalentar y poner en contacto solo en las zonas de interés el papel parafinado con el papel nativo, transfiriendo la parafina de uno a otro y formando barreras hidrofóbicas con el diseño deseado [61].

- **Deposición química de vapor.** Este método emplea altas temperaturas y reacciones químicas de especies gaseosas para depositar capas sólidas de material sobre un sustrato. Un ejemplo de su aplicación en la fabricación de μ PADs sería la deposición en papel de vapor químico de poli(o-nitrobencil metacrilato), que es fotoresponsivo e hidrófobo, y la creación posterior de regiones hidrófilas. Para crear esas regiones hidrófilas se recorta una máscara de papel negro con una cortadora láser, se coloca sobre el papel con el recubrimiento y el conjunto de ambos se expone a la luz UV y se lava con tampón para obtener, libre de material hidrófobo, el dibujo deseado. Otra

opción es depositar una capa fina de poli(cloro-p-xileno) en papel usando una cámara de sublimación previamente evacuada. Las regiones hidrofílicas se cubren con la ayuda de una máscara metálica sujeta por imanes arriba y debajo en la parte superior e inferior de la superficie. La ventaja de esta técnica es que los canales hidrófilos no se ven afectados por disolventes. De todos modos, la deposición de vapor químico requiere una instrumentación de alto costo que no es fácil de obtener en zonas de recursos limitados. Un ejemplo de aplicación de esta técnica es el desarrollo de dispositivos analíticos para determinación de glucosa, inmunoensayo y detección de metales pesados que llevaron a cabo Kim et al. [62] mediante barreras hidrófobas creadas por deposición de vapor químico.

- Grabado húmedo. Cai et al. [63] fabricaron un μ PAD inicialmente hidrofobizando el papel con una disolución de trimetoxioctadecilsilano (TMOS) y exponiendo después a una máscara de papel embebida con disolución de NaOH para el grabado húmedo del papel de filtro. La zona enmascarada se convierte en hidrófila mientras que la zona sin máscara sirve de barrera hidrófoba tal y como se muestra en la Fig. 1.9. Las ventajas de este método son que no requiere instrumentación costosa, máscaras metálicas y reactivos caros. Las desventajas son usar la máscara de papel, que presenta baja resolución.

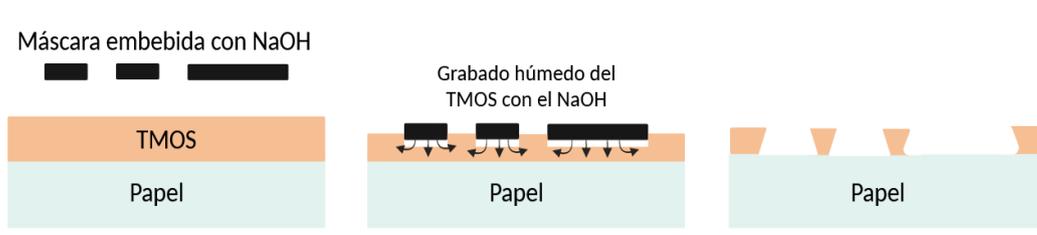


Figura 1.9. *Proceso de grabado húmedo con NaOH.*

- Tratamiento corona mantenido a mano. Jiang et al. [64] usaron el ODTs para silanizar el papel y hacerlo hidrófobo. A continuación, lavaron el papel con hexano y agua, lo secaron con nitrógeno y lo situaron entre una máscara de PMMA y una almohadilla para exponerlo a una descarga corona de bajo nivel para generar los canales hidrofílicos. Las áreas que no han sido expuestas permanecen hidrófobas. Este método

de fabricación es rápido y de bajo coste para los propósitos del laboratorio, aunque su producción en masa puede ser compleja [65].

- Serigrafía. El método de serigrafía se usa para transferir la tinta a un sustrato usando una pantalla con un dibujo y una rasqueta. Los materiales hidrófobos como la cera o el poliestireno se usan como tinta para crear barreras hidrófobas para los μ PADs [66]. Además, se usan tintas conductoras para fabricar electrodos o calentadores en papel. Este método tiene como ventajas el bajo coste y la fabricación sencilla, aunque no puede usarse para la producción masiva ya que se precisan una pantalla para cada diseño diferente. Lamas-Ardisana et al. [67] usaron una mezcla de tintas fotocurables para formar barreras hidrófobas y tintas de carbono y plata/cloruro de plata para formar electrodos sobre las zonas hidrófilas, que aplicaron en medidas de glucosa.



Figura 1.10 Mesa de serigrafía.

- Impresión 3D. Se puede imprimir un sustrato con microcanales y sellarlo con PDMS. Después los microcanales se llenan con una suspensión de polvo de celulosa en agua desionizada y se deja secar en un horno. Este método de fabricación es bastante barato y rápido y se puede llevar a cabo masivamente usando una impresora 3D de escritorio. También es posible usar la estereolitografía con una impresora 3D y una máscara dinámica para fabricar los μ PADs. El papel se sumerge primero en una resina sensible a la luz y a continuación se expone a luz UV a través de la máscara dinámica. A este paso le sigue el curado de la resina para formar las barreras hidrófobas y las regiones que no han sido curadas se lavan con alcohol anhidro. El proceso completo reduce considerablemente los tiempos de fabricación a tan solo 2 minutos. Un ejemplo de uso de la impresión 3D para sensores es el soporte desarrollado por Ruiz-García et al.

[68], que permite orientar la colocación correcta de la pipeta aportando reproducibilidad a los estudios de capacitancia en el mojado de tiras de papel.

- Aerosol. En este método se pulveriza un compuesto hidrófobo sobre el papel cubierto con una máscara, lo cual crea una barrera hidrófoba. Lew et al. [69] rociaron un material comercial repelente al agua en papel y fabricaron una máscara acrílica usando una fresadora con un diámetro de 500 μm en su extremo. El pegamento escolar, que es conocido como cola blanca, se empleó en papel por primera vez en 2017 usando máscaras magnéticas y se curaron las barreras hidrófobas exponiendo a luz UV/Vis. Es un método fácil de usar y libre de equipos para la fabricación de μPAD , aunque tiene baja resolución y escasa uniformidad cuando se compara con otros métodos.

Hay materiales que pueden ser empleados por varios métodos como es el caso de la cera, ampliamente usada para crear barreras hidrófobas. Esta puede aplicarse con una impresora de cera, por serigrafía, por inmersión del papel en la cera presionando los puntos en los que no se desea que esta penetre, etc. [70]. Una vez se ha depositado en el papel la cera, este se calienta para derretirla y permitir que penetre en los poros de papel, generando la barrera hidrófoba también en la estructura interna del mismo. Otro compuesto químico versátil para más de una metodología sería la parafina, que se emplea de manera similar a la cera [71].

Métodos físicos

- Plóter de corte. Fenton et al. [72] emplearon un plóter de corte controlado por ordenador para cortar de forma precisa el papel y obtener así los diseños deseados. Para evitar la rotura del papel se deben hacer tres cortes secuenciales. Este método sencillo reduce el tiempo de fabricación y puede ser escalado para cortar miles de dispositivos en una sola hoja de papel.



Figura 1.11 Corte con plotter de una película de acetato.

- Corte manual. De forma similar, un cortador manual se empleó por Cassano y Fan [73] para fabricar dispositivos analíticos de papel laminado. Primero se pega el papel a una hoja adhesiva y a continuación, las tiras de papel se cortan usando un cortador manual. Para un corte preciso de un papel frágil, como el de nitrocelulosa, se suele requerir unir una capa de sacrificio en la superficie del papel para lograr un corte suave. Las ventajas de esta fabricación son que es ligera, portátil, flexible y las características disponibles. Sin embargo, al contrario que los papeles libres de laminado, estos dispositivos requerirán un mecanismo de bombeo del flujo y es difícil lograr una buena reproducibilidad.

- Sello seco. El papel se empapa en etanol y se aprieta entre dos moldes de plástico para lograr en relieve el diseño deseado. Esta etapa va seguida de la silanización y el sellado con cinta adhesiva para obtener canales abiertos con barreras omnífonas porosas. Los canales abiertos permiten la interacción de éstos con los gases de alrededor debido a la naturaleza porosa del papel que de otra manera es imposible. Con este método se consiguen dispositivos flexibles que se pueden incluso doblar.

- Corte láser. Se emplea una máquina de corte con láser de CO₂ para cortar y grabar selectivamente en la superficie del papel. Durante el grabado es muy importante optimizar la potencia y la velocidad para lograr el resultado deseado, que bien puede ser el corte completo de la pieza de papel o el grabado de papeles encerados o de pergamino para lograr hacer hidrófilas ciertas zonas frente a otras [74]. En los canales grabados se puede además incluir un recubrimiento de micropartículas de sílice que mejore la humectabilidad dirigida del papel. La principal desventaja de este método, capaz de fabricar dispositivos muy reproducibles masivamente, es que dichos dispositivos requieren una etapa de lavado posterior para retirar la ceniza generada en el corte [65]. Un ejemplo de uso de grabado láser para fabricación de dispositivos microfluídicos son los canales con pendiente diseñados por Soares et al. [75] para la determinación de mezclas de biodiesel en biocombustibles.



Figura 1.12 Corte láser de una pieza de conglomerado.

Métodos de fabricación de μ PADs 3D

También es posible crear estructuras microfluídicas en tres dimensiones [76,77]. Para ello se crea un patrón primero en el papel mediante algunas de las técnicas explicadas anteriormente para crear barreras hidrofóbicas, y a continuación, el papel se dobla en una secuencia específica para generar la estructura tridimensional.

He et al. [78] demostraron que se puede lograr también delimitar un sistema microfluídico sumergiéndolo en una disolución de ODTs en hexano. Los canales hidrofílicos y las zonas de detección se obtienen por degradación de las moléculas de ODTs con luz UV y ozono, usando una máscara para las zonas en las que no se quiere degradar. Otra forma alternativa para lograr darle la forma deseada al μ PAD es cortándolo bien con un plotter de corte o una cortadora láser [79] o bien grabando en un material cuya superficie ha sido tratada con materiales hidrofóbicos, los canales hidrofílicos [74].

Para realizar algunas reacciones químicas múltiples o muchos pasos de preprocesado solo en un chip y mejorar la velocidad y eficiencia del proceso de análisis, se han investigado métodos de fabricación 3D de μ PADs.

- Apilamiento. Whitesides et al. [80,81] describieron un método para fabricar μ PADs por apilamiento de capas de papel y cinta adhesiva de doble cara. La cinta adhesiva se perfora y los huecos se rellenan con polvo de celulosa. Las dos piezas de papel de filtro estampado se separan con la cinta adhesiva de doble cara perforada y los agujeros con polvo de celulosa uniéndolos puntualmente, tal y como se muestra en la

Fig. 1.13. Posteriormente este mismo grupo realizó este método sin el polvo de celulosa en los huecos. Sin embargo, resultó más complejo alinear el papel y la cinta. En 2012 un método de impresión con cera y apilamiento por spray adhesivo se usó para fabricar μ PADs 3D. Primero se estampaban dispositivos 2D usando la impresora de cera y después se pulverizaba adhesivo en una de las caras del papel, alineándolo con la siguiente capa y presionando con un rodillo. El segundo paso se repetía hasta tener el μ PAD 3D completo.

- Origami. Se pueden estampar primero cada capa de los μ PADs en un papel de filtro por fotolitografía. Luego se dobla el papel siguiendo un cierto orden y finalmente, se usa una pinza de aluminio para unir las capas con lo que el μ PAD 3D queda completo [77]. Este método es sencillo excepto por la pinza de aluminio, pero podría cambiarse dicha pinza de aluminio por una carpeta [82].

Otro aspecto a tener en cuenta en la fabricación de dispositivos microfluídicos es la necesidad de incorporar estrategias de control de flujo más allá del dibujo de canales.

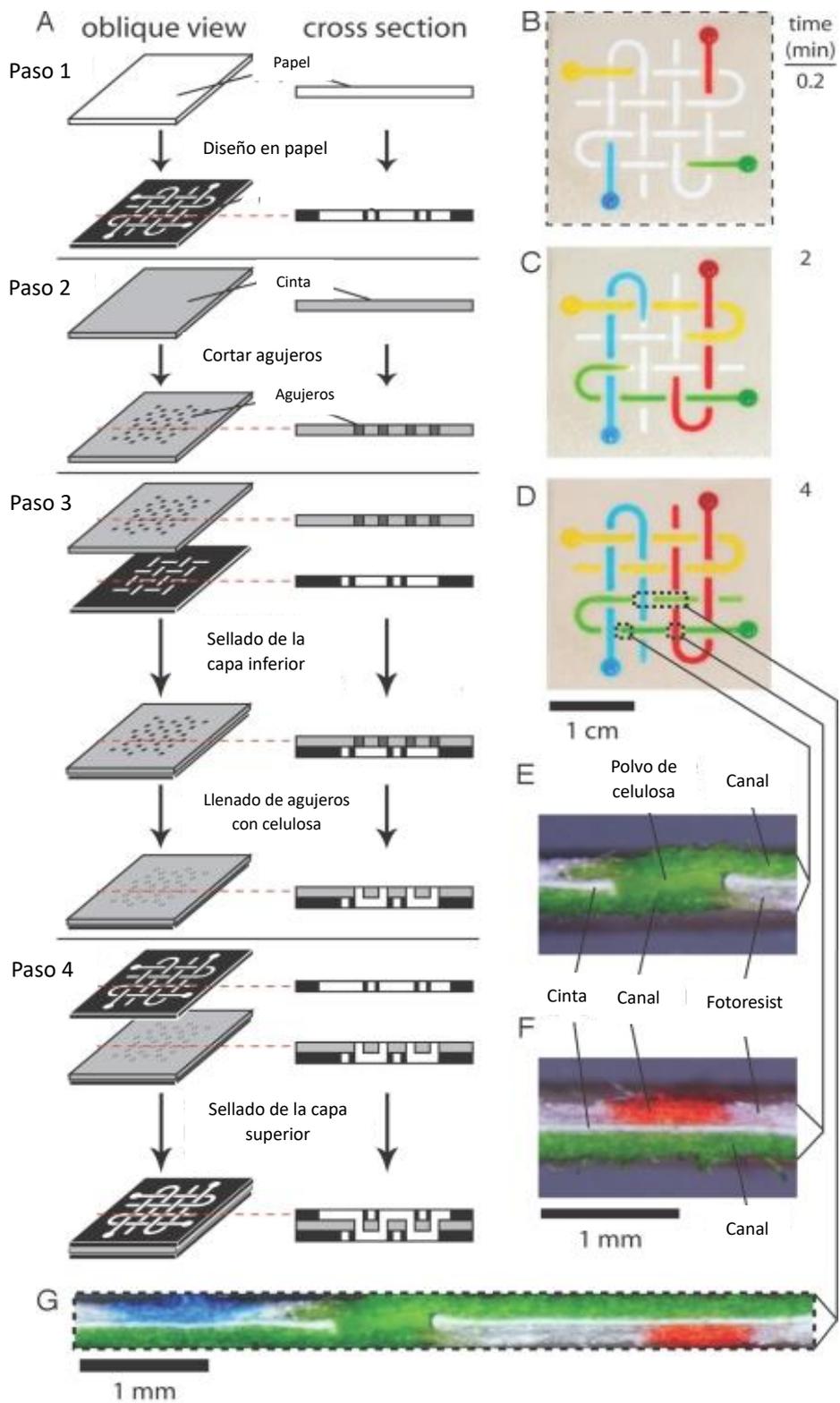


Figura 1.13. Proceso de fabricación de un μ PAD 3D [80].

4.1 Control de flujo

Los dispositivos microfluídicos en los que se mueve el flujo por capilaridad exigen en ocasiones parar, acelerar o ralentizar el flujo de muestra o reactivos. Tratamos en esta sección el control de flujo en estos dispositivos.

Los sistemas de control de flujo requieren la capacidad de parar, redirigir y controlar la velocidad del flujo de fluido a la vez que se manejan y separan las mezclas en la muestra. Los dispositivos microfluídicos convencionales se basan en el uso de diferentes fuerzas como presión, centrífugas o electrocinéticas, así como bombas, válvulas automáticas o neumáticas para controlar los sistemas. Por el contrario, la microfluídica basada en papel provee de una alternativa de flujo sin aplicar fuerzas externas generando el transporte de fluido mediante la capilaridad. Dependiendo de las aplicaciones funcionales prácticas como el transporte, mezclado y detección, se han desarrollado varios métodos para controlar el flujo de fluido en los dispositivos de papel, hilo y tela [34].

El modo más sencillo de controlar el flujo, tanto de muestras como reactivos, es variar la geometría de los canales como puede ser su longitud y anchura. Alternativamente el flujo de fluido puede ser retrasado por manipulación de parámetros como son las características del medio poroso, el ángulo de contacto o la viscosidad del fluido. Otras aproximaciones incluyen alterar la humectabilidad del canal usando diferentes tipos de tratamientos [83].

Toley et al. [33] desarrollaron un sistema microfluídico de papel con una válvula de control de flujo que se abre o cierra con tiras de papel móviles y elementos que se expanden con el flujo de fluido (esponja) y demostraron su uso para la detección en varias etapas de la proteína PfHRP2 de la malaria. Xiao et al. [84] desarrollaron válvulas de control de flujo en un dispositivo de papel que se accionan con un cantiléver (palanca) magnético controlado por un simple circuito integrado. Las válvulas magnéticas pueden abrirse y cerrarse para permitir al fluido pasar en un momento determinado. En cualquier caso, la inclusión del circuito integrado y un electroimán en el dispositivo pueden incrementar los costes de fabricación y la complejidad del dispositivo. Barry et al. [85] han desarrollado redes de papel 2D que emplean el flujo lateral y tienen la

capacidad de reconfigurarlos para permitir la programación de secuencias de reparto de reactivos en varios pasos. Esta red de papel usa múltiples entradas de fluido para controlar la llegada de cada líquido a la zona de detección o cerrar la fuente de fluido en una secuencia de tiempo. De esta manera, se pretende poner a punto una plataforma para el procesamiento fluido autónomo de múltiples pasos.

El control del tiempo para el movimiento del líquido a través del canal puede lograrse usando materiales solubles en agua como barrera, sería el caso de azúcares que aumentan la resistencia al paso del fluido [86–88]. La velocidad de flujo está determinada mayoritariamente por el espesor de las barreras y aumentar este factor lleva a una reducción en el flujo de fluido [34]. Martínez et al. [80] ha fabricado μ PADs 3D que permiten al usuario diseñar la estructura de los canales, controlar el flujo de fluido y controlar las funciones del dispositivo, con un botón de “on” fabricado utilizando la distancia que separa dos capas de papel adyacentes. Para llenar el hueco se emplea material hidrofílico como polvo de celulosa que permite el flujo de fluido a su través.

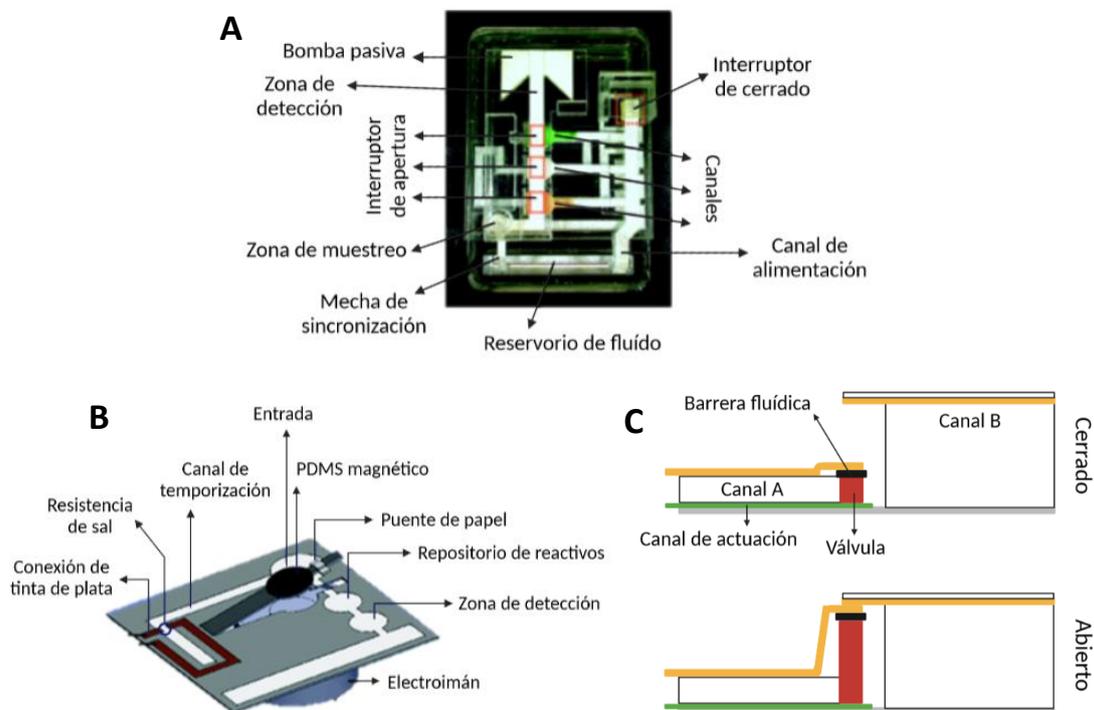


Figura 1.14 Esquemas de los sistemas de control de flujo desarrollados por Lutz et al. [85] (A) Xiao et al. [84] (B) y Toley et al. [33] (C).

4.2 Materiales inteligentes

En su nivel más fundamental, muchas de las sustancias más importantes en los organismos vivos son las macromoléculas con estructuras y comportamientos que varían de acuerdo con las condiciones de su entorno. Una gran variedad de procesos biológicos depende de una respuesta a cierto estímulo como puede ser el caso de las proteínas, ácidos nucleicos y polipéptidos que tienen la capacidad de adoptar conformaciones específicas según el ambiente en el que se encuentran. Una propiedad similar de respuesta a estímulos sería también deseable en polímeros sintéticos, de manera que fuera posible hacerlos participar de un modo más activo en vez de solo como soportes [89].

Los materiales que responden a estímulos, también llamados inteligentes o adaptativos, son materiales capaces de responder a variaciones momentáneas en sus alrededores por cambios en sus propiedades químicas y/o físicas.

Los polímeros inteligentes o capaces de responder a estímulos son aquellos que tienen la capacidad de responder a estímulos externos sufriendo cambios de fase o cambios conformacionales. Esta capacidad que se da en biomoléculas de forma natural se ha intentado replicar para lograr materiales que respondan a pH, temperatura, luz, campos eléctricos, químicos o fuerza iónica.

Hay varias respuestas posibles a esos estímulos como son los cambios en forma, de sus características superficiales, de solubilidad o transiciones sol-gel, entre otras. Los polímeros inteligentes en disolución pueden mostrar alteraciones en las dimensiones de sus cadenas, la solubilidad, la estructura secundaria, o el grado de asociación intermolecular debido a cambios químicos o físicos.

La mayoría de los cambios se limitan a la formación o eliminación de fuerzas secundarias como los enlaces de hidrógeno intermoleculares, las interacciones electrostáticas, los efectos hidrófobos y/o presión osmótica, pero puede incluir también modificaciones considerables en la estructura del polímero [90].

Los polímeros inteligentes tienen aplicaciones en diversos ámbitos como son los tratamientos de aguas, la liberación de fármacos de forma controlada o la catálisis reciclable. Estos materiales pueden adaptarse al entorno que los rodea, regular el

transporte de iones y moléculas, cambiar la humectabilidad y adhesión de diferentes especies, convertir señales químicas y bioquímicas en señales ópticas, eléctricas, térmicas o mecánicas, o viceversa [91–94].

Incorporar diferentes funcionalidades en respuesta a estímulos en un solo polímero hace posible imitar procesos naturales complejos. El estudio de materiales con respuesta a múltiples estímulos es de marcada significación ya que provee más de un mecanismo por el cual las propiedades de un sistema pueden ser ajustadas [90].

4.3 Hidrogeles

Los hidrogeles pueden definirse como redes de polímero que tienen propiedades hidrófilas. Algunas ventajas de los hidrogeles frente a otros materiales tradicionalmente usados en el desarrollo de sensores incluyen [95]:

- Alta estabilidad, capacidad de retención y estabilidad durante el almacenamiento
- Mayor capacidad de absorción tanto de agua como de disoluciones salinas
- Control del tamaño de partícula y la porosidad
- pH neutro, materiales incoloros, inodoros y no tóxicos
- Estabilidad a la luz, bajo contenido soluble y monómero residual
- Bajo precio
- Capacidad de rehidratación. El hidrogel tiene que ser capaz de liberar la disolución absorbida o mantenerla tanto como sea necesario
- Buena biodegradabilidad sin formación de compuestos tóxicos

Clasificación

Los hidrogeles pueden clasificarse dependiendo de varios aspectos como son:

Porosidad. La porosidad del hidrogel se controla aumentando o disminuyendo la densidad de entrecruzamiento entre cadenas de polímero y la hidrofiliidad de los monómeros que lo constituyen. La porosidad es un aspecto esencial de los hidrogeles ya que afecta en gran medida a la capacidad de absorción de disoluciones de este.

Dependiendo del tamaño de poro, los hidrogeles se clasifican en no porosos, macroporosos y microporosos. Las redes macroporosas tienen tamaños de poro dentro del rango de los 100 a los 1000 μm . En ellos, los iones y moléculas se liberan desde la red del gel por difusión o convección. Los hidrogeles no porosos presentan un aspecto similar a la estructura de una malla con tamaños de poro comprendidos entre los 10 y los 100 μm . Finalmente, el tamaño de poro de los hidrogeles microporosos va desde 0.1 hasta 1 μm y en este caso la liberación de las disoluciones ocurre puramente por difusión [96].

Tipo de entrecruzamiento. Las cadenas de polímero de los hidrogeles pueden estar entrecruzadas química o físicamente. En el primer caso, se forman enlaces covalentes entre las cadenas sencillas de polímero mientras que en el segundo, el entrecruzamiento se debe a interacciones débiles como pueden ser las interacciones hidrófobas o iónicas o los enlaces de hidrógeno. El tipo de entrecruzamiento que presente la red de polímero dependerá de los grupos funcionales de las cadenas laterales del polímero y será determinante de las características del hidrogel [97].

Origen. Pueden ser naturales, sintéticos o híbridos. Los monómeros naturales son más adecuados para aplicaciones biocompatibles y biodegradables. Normalmente contienen agentes de reconocimiento biológico. Sin embargo, en muchos casos no poseen las propiedades mecánicas deseadas. Además, los polímeros naturales pueden causar respuestas inmunes o inflamatorias si se introducen en el cuerpo humano, por lo que precisan de una investigación exhaustiva que garantice que no van a provocar mayores daños que beneficios. En contraste, los hidrogeles sintéticos logran fácilmente las propiedades mecánicas deseadas, pero carecen de bioactividad inherente.

Composición polimérica. Pueden ser homopolímeros, copolímeros, redes interpenetradas y multipolímeros. Los homopolímeros contienen un único monómero en sus cadenas mientras que los copolímeros tienen dos o más. Los multipolímeros se sintetizan por reacción simultánea de tres o más monómeros. Por último, las redes interpenetradas se diferencian de las homo-, multi- y copoliméricas en que están formadas con más de un tipo de cadena polimérica, lo cual no ocurre con los demás tipos que están formados por un solo tipo de cadena de polímero [98]. Las redes

interpenetradas presentan la ventaja de tener mejor resistencia y capacidad de absorción en comparación con los homo- y copolímeros [99].

Configuración o cristalinidad. La configuración de los hidrogeles está condicionada por la estereoquímica (isotáctica, sindiotáctica o atáctica) y también es un criterio para clasificar los hidrogeles en amorfos, cristalinos y semicristalinos. Los hidrogeles amorfos consisten en una estructura de red aleatoria mientras que los cristalinos están densamente empaquetados. La evaluación estructural de los hidrogeles revela que las redes ideales raramente se logran; algunos defectos moleculares comunes son los grupos funcionales que permanecen sin reaccionar, las uniones parciales y los bucles en cadena [100].

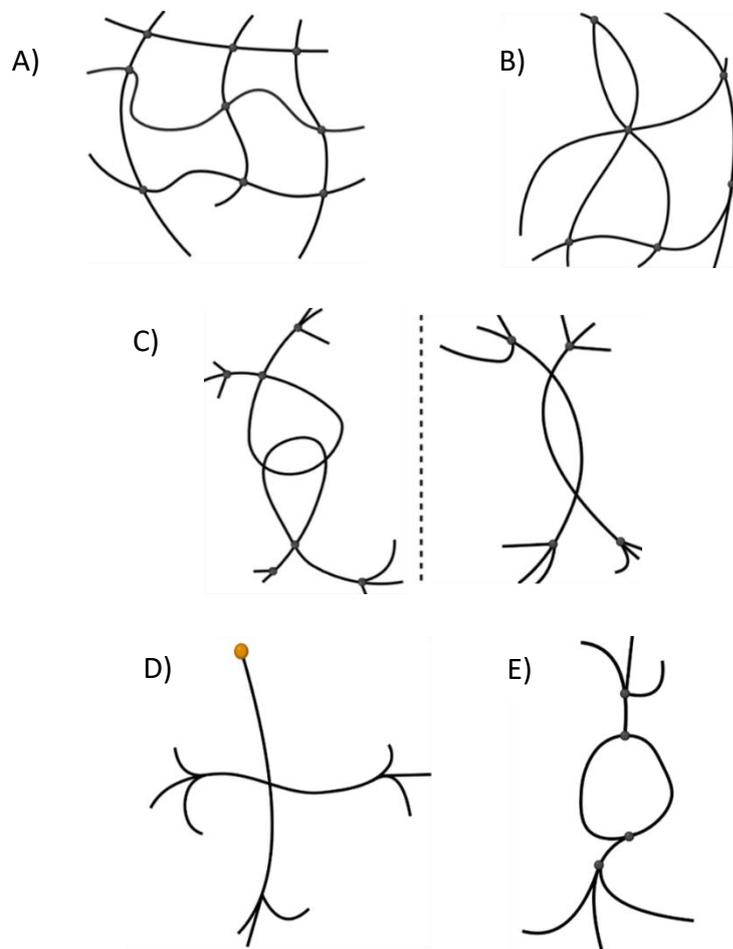


Figura 1.15 A) Red de polímero ideal. B) Uniones multifuncionales. C) Entrecruzamientos moleculares. D) Grupos funcionales sin reaccionar. E) Bucle en cadena

Según su apariencia física pueden ser matrices, películas o microesferas en base a la técnica de polimerización empleada en el proceso de preparación.

Carga eléctrica. Pueden ser no iónicos (neutros), iónicos (aniónicos y catiónicos), anfóteros (contienen tanto grupos ácidos como básicos) o zwitteriónicos (conteniendo tanto grupos aniónicos como catiónicos en cada unidad de repetición). Todos los polímeros iónicos son sensibles al pH debido a la posibilidad de ser ionizados. Algunos ejemplos de polímeros iónicos son el poli(2-dimetilaminoetil metacrilato) (PDEAEMA), ácido poli(metacrílico) (PMAA) y ácido poliacrílico (PAA). Los polímeros anfóteros tienen monómeros con el mismo número de cargas positivas que negativas, como por ejemplo 2-metacriloxietil fosforilcolina [96].

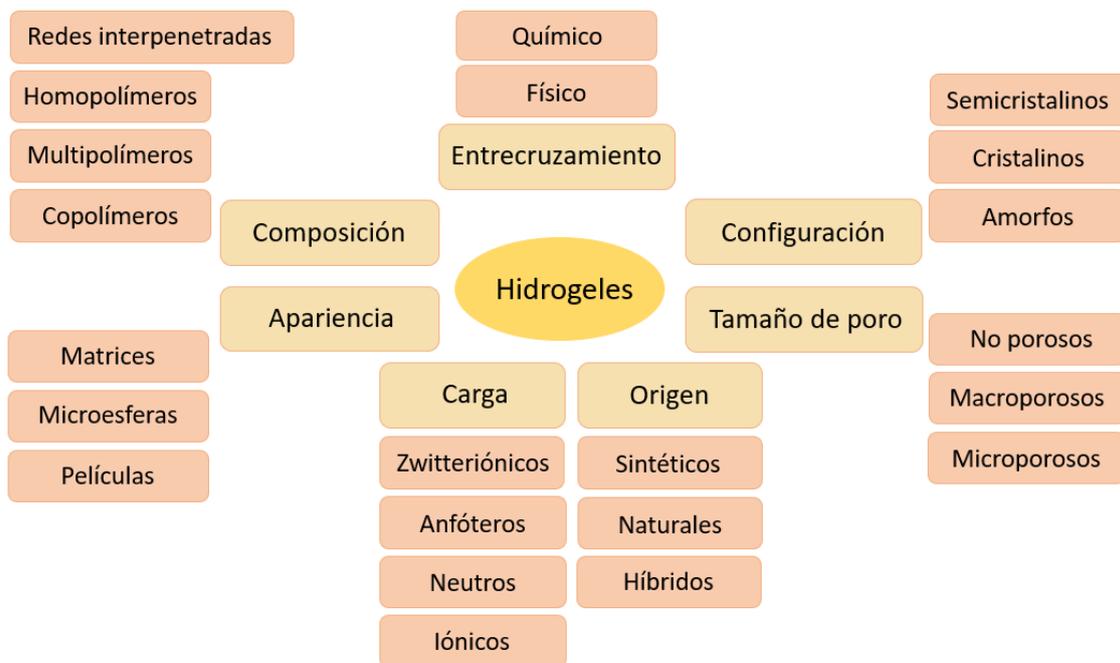


Figura 1.16 Clasificación de los hidrogeles.

Síntesis

De forma resumida se puede decir que un hidrogel es simplemente una red de polímero entrecruzada de algún modo para producir una estructura elástica. Por tanto, cualquier técnica que pueda ser usada para crear un polímero entrecruzado servirá para producir un hidrogel. Las polimerizaciones de radicales libres se usan comúnmente para producir

hidrogeles por reacción de monómeros hidrofílicos con agentes de entrecruzamiento multifuncionales. Los polímeros lineales solubles en agua, tanto naturales como sintéticos, se entrecruzan de varias maneras para formar hidrogeles:

- Uniendo cadenas de polímero por reacción química
- Usando radiación ionizante para generar una cadena principal de radicales libres que puede recombinarse como uniones entrecruzadas
- Interacciones físicas como entrecruzamiento, electrostáticos y formación cristalina

En general los tres agentes principales para la preparación de hidrogeles son el monómero, el iniciador y el agente de entrecruzamiento. Para controlar el calor de la polimerización y las propiedades del hidrogel final se suele usar un disolvente como el agua u otra disolución de base acuosa. Después suele ser necesario lavar el hidrogel sintetizado para retirar las impurezas derivadas del proceso de preparación. Estas incluyen residuos de monómero, iniciadores y agentes de entrecruzamiento sin reaccionar y productos no deseados de reacciones secundarias.

Entre las varias técnicas de polimerización que pueden usarse para formar geles se incluyen la polimerización gruesa, en disolución y en suspensión.

- Polimerización gruesa. Muchos monómeros tipo vinilo pueden ser usados potencialmente para la producción de hidrogeles. Los hidrogeles gruesos pueden formarse con uno o más tipos de monómeros. La amplia variedad de monómeros permite preparar el hidrogel con las propiedades físicas deseadas para una determinada aplicación. Normalmente se añade una pequeña cantidad de agente de entrecruzamiento en la formulación del hidrogel. La reacción de polimerización suele iniciarse con radiación o un iniciador químico.

La elección de un iniciador adecuado depende del tipo de monómeros y disolventes usados. El hidrogel polimerizado puede ser producido en una gran cantidad de formas que incluyen películas, membranas, cilindros, partículas y emulsiones.

Es la técnica de polimerización más sencilla y da lugar a alta velocidad y grado de polimerización debido a la alta concentración del monómero. Sin embargo, la viscosidad

de la mezcla aumenta de forma considerable conforme avanza la polimerización, lo cual genera bastante calor.

En la polimerización gruesa los monómeros forman un hidrogel homogéneo, de aspecto vítreo, transparente con una matriz bastante dura, que cuando se sumerge en agua se hincha hasta convertirse en blanda y flexible.

- Polimerización en disolución. En la polimerización en disolución, los monómeros iónicos o neutrales reaccionan con un agente de entrecruzamiento multifuncional en presencia de un iniciador térmico, redox o UV. La principal ventaja de la polimerización en disolución frente a la polimerización gruesa es la presencia de disolvente que sirve para eliminar el calor de reacción. Sin embargo, también los hidrogeles preparados por esta vía necesitan ser lavados con agua purificada para eliminar los monómeros, iniciadores y agentes de entrecruzamiento que no han reaccionado.

Los disolventes típicos usados en este método incluyen el agua, etanol, las mezclas de etanol y agua y el alcohol benzoico. Por explicarlo de forma resumida, los reactivos se disuelven a la concentración deseada, normalmente entre 10 y 70%. Los grupos como los ácidos carboxílicos se neutralizan parcialmente antes y después de la polimerización. En este proceso, la iniciación es normalmente llevada a cabo por la reacción del agente reductor con un agente oxidante o con especies que se disocian térmicamente como un radical libre azo o un peróxido.

Este método de preparación es difícil de manejar debido a la falta de suficiente control de reacción, la aparición de un producto de reacción sólido o gomoso, la mono o polidispersidad del material y el aumento en el contenido de sólidos debido a la ruptura térmica e hidrolítica descontroladas. En cualquier caso, esta técnica es rápida, menos cara y tiene buenas propiedades de absorción, por lo que este método se prefiere tanto a escala de laboratorio como industrial.

- Polimerización en suspensión. En la polimerización en suspensión, la disolución de monómero se dispersa en el disolvente formando gotas muy finas que se estabilizan mediante la adición de un estabilizante. El proceso se inicia con radicales debido a la

descomposición térmica del iniciador, siendo necesario en este caso también el lavado posterior.

Recientemente, para los geles basados en poliacrilamida se emplea una técnica de suspensión inversa que elimina fácilmente el monómero residual, que resulta peligroso. En la suspensión inversa se aplica un sistema más versátil con gran capacidad de llenado y una cinética de absorción rápida. Cuando el iniciador se disuelve en la fase dispersa (agua), cada partícula contiene todas las especies reactivas. Por tanto, cada una se comporta como un pequeño reactor de polimerización aislado, que es fácil de eliminar por centrifugación o filtración. Por tanto, el método de suspensión inversa tiene ventajas suplementarias en comparación con otros métodos, como son el control de la eliminación del calor de reacción, la regulación de la mono o polidispersidad y la modificación del tamaño de partícula.

El proceso de polimerización en suspensión es muy similar al proceso de polimerización en disolución, pero con un rendimiento máximo, una distribución de tamaño más estrecha, suavidad, esfericidad y claridad, además de la formación de menos partículas indeseables [101].

La fabricación de hidrogeles con distintas propiedades depende de la variación del tipo y grado de entrecruzamiento y la presencia o ausencia de cristalinidad, haciéndolos adecuados para diversas aplicaciones. El entrecruzamiento además afecta inversamente a la elasticidad y viscosidad; un aumento en la densidad de entrecruzamiento aumenta la rigidez del hidrogel.

Es necesario tener en cuenta que los atributos funcionales de los hidrogeles y sus propiedades fisicoquímicas están influenciados por el método de entrecruzamiento usado. En general hay dos tipos de entrecruzamiento, el físico y el químico. El entrecruzamiento ocurre físicamente a través de enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas y tratamiento térmico. Usando el entrecruzamiento físico, los hidrogeles no covalentes pueden formarse y estabilizarse por interacciones físicas de cadena. Por otro lado, el entrecruzamiento químico mayoritariamente tiene lugar a través de interacciones covalentes que implican

reacciones de condensación, enzimáticas, polimerizaciones por radicales libres, química click o reacciones de bases de Schiff, entre otras [102].

Entrecruzamiento físico. Enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones electrostáticas, apilamiento π - π , interacciones iónicas, formación de estereocomplejos, cristalización y otras fuerzas secundarias mantienen las cadenas de estos polímeros juntas y normalmente forman hidrogeles débiles y de fase reversible. Por tanto, los hidrogeles con un entrecruzamiento puramente físico carecen de propiedades mecánicas fuertes, aunque puedan tener propiedades de autorreparación.

Es una aproximación simple, en la que la gelificación no requiere modificación de las cadenas de polímero. Debido al hecho de que dichos hidrogeles no necesitan agentes de entrecruzamiento tóxicos para prepararse, los hidrogeles físicos se consideran biomédicamente seguros y están siendo cada vez más utilizados. Por tanto, es posible diseñar estos hidrogeles como hidrogeles bioactivos para encapsular células vivas y distribuir moléculas terapéuticas.

Algunas de las formas de entrecruzamiento físico más importantes son:

- Interacciones iónicas. El entrecruzamiento iónico no requiere necesariamente polímeros cargados, pero sí la presencia de iones metálicos que puedan provocar la gelificación. El proceso de gelificación rápida puede lograrse a temperatura ambiente y pH fisiológico, haciendo de este un método factible. La principal ventaja de este método es la fácil biodegradabilidad debido a que hay especies iónicas en los fluidos extracelulares que compiten con los componentes del gel y provocan la pérdida del entrecruzado, mientras que las desventajas asociadas al entrecruzado iónico son la debilidad mecánica, la liberación de iones metálicos en el cuerpo y la pobre capacidad de apilamiento.

- Formación de un complejo polielectrolítico. En este caso los polímeros que participan deben estar ionizados y poseer cargas opuestas. La presencia de estas genera fuertes interacciones electrostáticas para dar un complejo polielectrolítico autoensamblado (PEC). Hay múltiples factores que pueden influenciar / influir en las

propiedades de los hidrogeles generados por PEC, incluyendo la densidad de carga de cada polímero y la cantidad y proporción de cada polímero.

- Enlaces de hidrógeno. Una de las interacciones no covalentes más significativas es el enlace de hidrógeno. Puede formar interacciones intermoleculares entre hidrógeno y átomos electronegativos. Los grupos hidroxilo (-OH), carboxilo (-COOH) y amino (-NH₂) pueden dar lugar a enlaces de hidrógeno o interactuar con otros grupos electrófilos. En cualquier caso, un solo enlace de hidrógeno tiene una energía de enlace baja, por tanto, se requiere un enlace de hidrógeno multivalente para lograr hidrogeles estables y robustos.

- Congelado-Descongelado. Otra forma de entrecruzamiento físico es el método de congelado-descongelado que puede lograrse a través de ciclos sencillos repetidos evitando el uso de compuestos tóxicos. Durante el proceso de congelado, el agua en la fase pobre en polímero se transforma en hielo mediante enfriamiento, induciendo una separación de fase líquido-líquido. Conforme los cristales de hielo expulsan las partes amorfas y la cristalización de la mayor parte de agua reduce el espacio entre cadenas de polímero, estas se acumulan y se alinean en las microfases semicongeladas y sin congelar. Las interacciones no covalentes entre grupos funcionales -COOH, -OH y -NH₂ en las cadenas de polímero permiten que se asocien en la microfase líquida. Además, el descongelado tiene como resultado que los cristales de hielo se fundan y se liberen de la red de hidrogel, lo cual crea una estructura porosa. Los enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares dentro de las uniones en la red polimérica estabilizan la estructura del gel.

- Calentamiento-Enfriamiento. Otra forma de polimerización física consiste en calentar y enfriar. Muchos polisacáridos como la gelatina o la agarosa se calientan para lograr homogenización y al enfriarlo posteriormente a temperatura ambiente se gelifican. La separación de fase lleva a la agregación de las cadenas del polisacárido, dando como resultado una zona cristalizada a través de interacciones físicas. De hecho, los polímeros formados a través de procesos de calentamiento y enfriado son altamente cristalinos. Estas zonas cristalinas, al igual que en los polímeros físicos formados por

congelado y descongelado, se forman en los nudos de unión de la red física y los enlaces de hidrógeno estabilizan estos nudos para crear el hidrogel.

- **Interacciones hospedador- invitado.** Es posible integrar polímeros de un modo fácil y reversible a través de la inclusión del invitado en el hospedador, facilitando la construcción del hidrogel. A menudo las moléculas hospedadoras tienen grandes cavidades que pueden interactuar con invitados de una forma complementaria. La inclusión hospedador- invitado puede ser facilitada por una variedad de interacciones no covalentes incluyendo las formas moleculares, los enlaces de hidrógeno, π - π , Van der Waals, interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. Habitualmente las disoluciones acuosas comúnmente implican el encapsulado de moléculas invitado hidrófobas en cavidades hidrófobas. A pesar de la fuerte unión, la inclusión hospedador- invitado exhibe una geometría fija y una direccionalidad que puede responder al pH o a estímulos físicos adicionales.

Entrecruzamiento químico. En el entrecruzamiento químico se crea una red de hidrogel basada en un polímero tridimensional, lo cual implica un menor tiempo de gelificación, una mayor estabilidad y fuerza mecánica y una menor degradación con el tiempo, aunque estas características también dependen del tipo de enlaces químicos y de las unidades estructurales del polímero.

Las uniones covalentes ayudan a los hidrogeles químicamente entrelazados a controlar sus propiedades fisicoquímicas incluyendo la densidad, tamaño de poro y funcionalización química, expandiendo así el horizonte de sus aplicaciones.

El entrecruzamiento químico en hidrogeles, en contraste con el físico, previene tanto la dilución de la matriz como la difusión del polímero desde el sitio de implantación. Es posible controlar el proceso de entrecruzamiento de una manera espacial y dinámica usando métodos de entrecruzamiento químico.

Retirar los monómeros que no han reaccionado, iniciadores, agentes de entrecruzamiento y los otros productos no deseados es esencial durante la preparación del hidrogel, ya que pueden dañar las células en caso de desearse su uso para fines biomédicos. Es por ello que los hidrogeles químicos típicamente necesitan ser

purificados después de su producción. Algunos métodos de entrecruzamiento químico son los siguientes:

- Unión con moléculas pequeñas. Hay moléculas pequeñas bifuncionales, como el glutaraldehído, por ejemplo, que se emplean como agentes entrecruzantes y se unen covalentemente con el monómero principal para la preparación de hidrogeles. Este entrecruzamiento permite generar hidrogeles más fuertes tanto mecánica como estructuralmente. En ausencia de las moléculas fortificantes adecuadas, la baja rigidez puede dar lugar a una rápida degradación del polímero.
- Química click. En los últimos años, la química click se ha usado cada vez más para diseñar y fabricar hidrogeles funcionales. Con ella se logran altos rendimientos en condiciones moderadas, un alto grado de especificidad y selectividad y se producen menos subproductos.

Entre las reacciones click se incluyen las que emplean bases de Schiff, las Diels-Alder y las adiciones de Michael. Las reacciones con bases de Schiff ocurren entre un grupo aldehído y un grupo amino para formar un enlace imina en condiciones ambientales. Además, el grupo aldehído puede unirse firmemente a los órganos y tejidos, haciéndolo un bloque de construcción excelente para la formación *in situ* de un hidrogel. En estos hidrogeles los enlaces imina pueden desacoplarse y reacoplarse resultando en cierta capacidad de autorreparación.

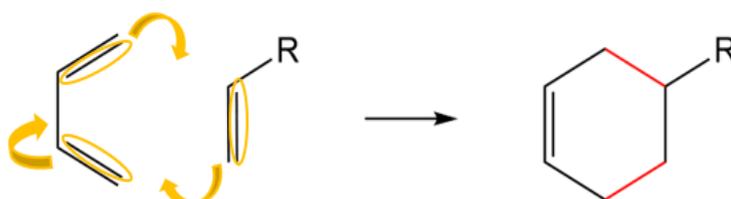


Figura 1.17 Mecanismo de las reacciones de Diels-Alder.

La reacción de Diels-Alder también es muy conocida por formar aductos en condiciones acuosas sin necesidad de catálisis y sin productos secundarios. El entrecruzado del hidrogel a través de una reacción de Diels-Alder puede ser lograda con gran selectividad, reducido número de derivados, menor consumo de energía y disolventes más seguros.

En cualquier caso, formar estos hidrogeles a alta temperatura requiere tiempos de reacción largos.

Por otro lado, la adición de Michael implica la adición de un nucleófilo entre múltiples enlaces carbono-carbono entre nucleófilos (donores de Michael) y olefinas electrofílicas activadas o alquinos (aceptores de Michael). Los donores incluyen los nucleófilos enolatos y los no enolatos, en concreto fosfinas, tioles y aminas. Al mismo tiempo un aceptor deberá poseer resonancia electrónica y la capacidad para estabilizar la carga del intermedio aniónico. Estos aceptores incluyen el acrilonitrilo, ésteres de acrilato, maleimidas, acrilamidas, vinilsulfonas, cianoacrilatos y alquilmecrilatos. Una de las ventajas de la adición de Michael es que es regioselectiva, eficiente y que transcurre de manera rápida.

- Polimerización con radical libre. El proceso de polimerización con radical libre con bajo peso molecular se usa también para desarrollar hidrogeles químicamente entrecruzados. Los agentes de entrecruzado contienen al menos dos dobles enlaces polimerizables mientras que los monómeros son moléculas solubles en agua en las que se entrelazan los dobles enlaces por completo. Se logra un adecuado número de radicales libres a partir de iniciador en condiciones discretas, como la electrolisis, la irradiación o el calentamiento.

- Reacción de condensación. En la mayoría de los casos, los hidrogeles se preparan por reacciones de condensación entre polímeros que contienen hidroxilos, aminas y ácidos carboxílicos o sus derivados. Una reacción de condensación ocurre entre dos reactivos que facilitan la producción de una mayor cantidad de producto seguidos por un producto minoritario, como por ejemplo el agua.

- Entrecruzado por fotoirradiación. El método de entrecruzado por fotoirradiación requiere la presencia de fotoiniciadores y grupos funcionales sensibles a la luz. Estos fotoiniciadores ayudan a la formación de la red de hidrogel cuando se expone a fotoirradiación con diferentes longitudes de onda, como la luz UV (250-370 nm) y luz visible (400-800 nm). Los hidrogeles destinados a las aplicaciones biomédicas requieren iniciadores fotocompatibles como la riboflavina fosfonato entre otras. La fotoirradiación activa los carbonos con doble enlace en estos grupos, promoviendo la polimerización de

crecimiento de cadena libre de radicales. Este método forma redes de hidrogeles rápidamente bajo condiciones fisiológicas y regulando las reacciones de entrecruzamiento se puede conseguir modificar las propiedades mecánicas de los hidrogeles. En cualquier caso, hay riesgos asociados con la luz UV. El entrecruzado por fotoirradiación con luz UV puede causar daños en las células y tiene el potencial de dañar compuestos bioactivos. Así pues, como el rango de longitudes visibles no daña las células, usar luz visible puede ser más ventajoso.

- Copolimerización de injerto. Los injertos suponen unir diferentes bloques a través de cadenas laterales a la cadena principal del polímero huésped. Los científicos usan los injertos para modificar polímeros nativos dotándolos de las propiedades deseadas como son la solubilidad, reactividad, elasticidad, temperatura de transición vítrea, permeabilidad, etc. Para llevar a cabo una polimerización efectiva se pueden emplear distintos sistemas iniciadores de reacciones como pueden ser redox, irradiación gamma, etc. Durante la copolimerización de injerto se introducen grupos ionizables en la cadena principal del polímero, mejorando la sensibilidad a estímulos de estos hidrogeles.

- Red de interpenetración (IPN). Las redes interpenetradas han sido definidas por la IUPAC como “Polímeros que contienen dos o más redes moleculares parcialmente entrelazadas a nivel molecular, que no están unidas covalentemente y que no pueden ser separadas a no ser que se rompan los enlaces químicos. No debe confundirse con la combinación de dos o más redes de polímero preformadas” [103]. Las semi-INPs, sin embargo, difieren de estas en que contienen una o más redes en las que al menos una es penetrada a escala molecular por polímeros lineales o ramificados formados sin agente entrecruzante [104]. A diferencia de los IPNs, los semi-IPNs pueden separar sus polímeros constituyentes, sean lineales o ramificados, sin necesidad de romper los enlaces químicos. Estos mejoran las propiedades de los hidrogeles como pueden ser propiedades mecánicas, resistencia química, estabilidad térmica, por nombrar algunas.

Entrecruzamiento híbrido. Se ha descrito que pueden emplearse métodos de entrecruzamiento híbridos para fabricar hidrogeles. Las ventajas de los

entrecruzamientos químicos y físicos pueden combinarse en hidrogeles doblemente entrecruzados para dar una excelente fuerza mecánica y estabilidad [102].

Hidrogeles que responden a estímulos

Estos hidrogeles responden a estímulos ambientales y experimentan cambios en su crecimiento, estructura de red, fuerza mecánica y permeabilidad. También reciben el nombre de sensibles al ambiente o hidrogeles inteligentes.

Hidrogeles que responden a pH

Patel y Mequanint [105] describieron hidrogeles con grupos iónicos colgantes que pueden aceptar o donar protones en respuesta a variaciones ambientales de pH. En un hidrogel capaz de responder a cambios de pH, a una determinada concentración de H^+ el grado de ionización cambia fuertemente. Este cambio brusco en la carga neta de los grupos iónicos colgantes causa una transición de volumen rápida debida a las fuerzas repulsivas electrostáticas, lo cual crea una gran fuerza osmótica de llenado.

Hay dos tipos de hidrogeles que responden a pH: los aniónicos y los catiónicos. Los hidrogeles aniónicos tienen como grupos colgantes ácidos carboxílicos o sulfónicos, donde ocurre una desprotonación cuando el pH ambiental está por encima del pK_a . Esto provoca la ionización de los grupos y aumenta el llenado del hidrogel. Por otro lado, los hidrogeles catiónicos tienen como grupos colgantes los grupos amino, en los que tiene lugar la ionización por debajo del pK_b y aumenta el llenado debido al aumento de repulsiones electrostáticas.

El grado de llenado de los hidrogeles iónicos se controla con dos factores principales. El primero son propiedades de los polímeros como la concentración, la densidad de entrecruzado, la carga iónica, el pK_a y el pK_b de los grupos ionizables, la hidrofilia o hidrofobicidad y el grado de ionización. El segundo factor incluye las propiedades del medio en el que se llena el hidrogel, como pueden ser el pH, la fuerza iónica, los contraiones presentes, etc.

La principal limitación de los hidrogeles que responden a pH actualmente es la falta de biodegradabilidad, que, si bien no es un problema para ciertas aplicaciones, como la administración de fármacos orales, sí es un problema importante en aplicaciones como

el reparto de fármacos, por lo que es preciso en un futuro dirigir la atención al desarrollo de hidrogeles sensibles al pH, biodegradables y biocompatibles.

Hidrogeles que responden a temperatura

Hasta ahora la temperatura es el desencadenante más utilizado para el diseño de polímeros que responden a estímulos [106]. Los hidrogeles que responden a temperatura se caracterizan por su capacidad para hincharse y deshincharse cuando la temperatura cambia en el fluido que los rodea, lo cual significa que el comportamiento de llenado y vaciado depende mayoritariamente de la temperatura ambiental. Los hidrogeles que responden a la temperatura pueden clasificarse en varios tipos:

- Hidrogeles de temperatura positiva. Se conocen por su Temperatura Crítica de Disolución Superior (UCST) [107]. Esto significa que cuando la temperatura está por debajo de la UCST, los hidrogeles se contraen y liberan los disolventes o fluidos de la matriz (deshidratación). A temperaturas superiores a la UCST se da el hinchamiento. Teniendo en cuenta esto, se pueden concluir que este tipo de hidrogeles son retrógrados a temperaturas negativas. Los hidrogeles de temperatura positiva se vacían a bajas temperaturas debido a la formación de una estructura de complejo por enlaces de hidrógeno. La estructura se disocia a alta temperatura debido a la rotura de enlaces de hidrógeno y el gel se llenará hasta el máximo posible rápidamente por encima de la UCST.

Kashyap et al. [108] estudiaron los hidrogeles termosensibles entrecruzados físicamente y concluyeron que pueden sufrir una transición de fase sol-gel en vez de un cambio de volumen a una temperatura crítica de disolución. Los hidrogeles más estudiados con respuesta a la temperatura son los que emplean quitosán como copolímero.

- Hidrogeles de temperatura negativa. Este tipo de hidrogeles tiene un parámetro crítico llamado Temperatura Crítica de Disolución Inferior (LCST), lo cual significa que el hidrogel se vaciará cuando la temperatura sea superior a la LCST y mostrará comportamiento de llenado a temperaturas inferiores a la LCST. Además, estos hidrogeles tienen dos partes, la hidrófila -CONH- y la hidrófoba -R- [109]. La LCST es el parámetro más importante para los hidrogeles sensibles a la temperatura negativos y puede modificarse de varias maneras como por ejemplo mezclando una pequeña

cantidad de copolímero iónico en el gel o cambiando la composición de disolvente. En general, cambiando la relación contenido hidrófobo/hidrófilo en el polímero se puede modificar la LCST del hidrogel de temperatura negativa: Cuanto más hidrófobos los constituyentes, más baja su LCST[110].. [109]. A temperaturas por debajo de la LCST el agua o fluido interacciona con las partes hidrofílicas formando enlaces de hidrógeno. Debido a estos enlaces de hidrógeno, la disolución y el llenado mejorarán. Conforme la temperatura aumenta por encima de la LCST, la interacción con las partes hidrófobas será más fuerte y al mismo tiempo los enlaces de hidrógeno se harán más débiles. Por tanto, tendrá lugar el vaciado de la muestra debido a la asociación de cadenas en el interior del polímero.

- Hidrogeles termorreversibles. Este tipo de hidrogeles tienen la misma estructura y contenido que los hidrogeles de temperatura positiva o negativa. La diferencia con las dos categorías previas radica en el tipo de enlace. Las cadenas de polímero en esta clase no se entrecruzan covalentemente, y el gel puede sufrir una transición de fase sol-gel en vez de una transición de llenado-vaciado. Ciertas interacciones moleculares como las asociaciones hidrófobas y los enlaces de hidrógeno, juegan un papel vital en el cambio de volumen abrupto de estos hidrogeles a la Temperatura Crítica de Disolución (CTS). En estado hinchado las moléculas de agua forman enlaces de hidrógeno con grupos polares del polímero dentro de los hidrogeles y se organiza alrededor de los grupos hidrófobos. A la CST los enlaces de hidrógeno entre el polímero y el agua se vuelven poco favorables en comparación con las interacciones agua-agua y polímero-polímero, lo cual fuerza la rápida deshidratación del sistema y la liberación de agua fuera del hidrogel con un aumento considerable de la entropía que da lugar al colapso de la estructura polimérica. Los hidrogeles reversibles térmicamente representan la clase más importante de hidrogeles, ya que pueden sufrir transiciones sol-gel en respuesta a ciertos estímulos. Los polímeros con dominios hidrófobos pueden sufrir entrecruzamiento en un medio acuoso por gelificación térmica inversa, que es aquella en la que segmento hidrófobo y segmento hidrófilo se unen por copolimerización o injerto. El segmento hidrófobo se acopla al segmento hidrófilo por copolimerización o injerto. Si la temperatura aumenta, la entropía del disolvente aumenta y los dominios hidrófobos se unen para reducir su superficie. Por tanto, la temperatura necesaria para

que tenga lugar la gelificación depende de la concentración de polímero, los bloques hidrófilos e hidrófobos y la naturaleza química de los polímeros.

Dentro de los hidrogeles capaces a responder a cambios de temperatura se encuentran los polímeros de N-isopropilacrilamida (NIPAM), que serán de especial interés en esta Tesis Doctoral. Las limitaciones de los hidrogeles basados en el NIPAM y sus derivados son la falta de biocompatibilidad y biodegradabilidad de sus monómeros y agentes de entrecruzamiento, que pueden dar lugar a efectos tóxicos, carcinogénicos y teratogénicos. Las observaciones de que los polímeros basados en acrilamida activan las plaquetas al ponerse en contacto con la sangre, junto con el metabolismo poco claro del NIPAM requiere estudios de toxicidad más detallados antes de aplicarlo. Además, el desarrollo y mejora en la producción de nuevos hidrogeles termosensibles biodegradables y biocompatibles es necesario para explotar en toda su extensión las propiedades útiles de estos hidrogeles.

Hidrogeles que responden a glucosa.

Los hidrogeles sensibles a glucosa son mezclas de transportadores de la insulina y glucosa oxidasa. La glucosa oxidasa es la enzima más ampliamente usada en el sensado de glucosa ya que oxida la glucosa a ácido glucónico, cambiando el pH del sistema, lo que permite el uso de una variedad de hidrogeles sensibles a pH para el control del reparto de insulina. Bajar el pH en los hidrogeles basados en el poli(dimetilaminoetilmetacrilato) (PDEAEM) da como resultado un hinchamiento debido a la ionización y liberación de la insulina u otros fármacos.

Los hidrogeles sensibles a glucosa son prometedores, pero muestran una respuesta demasiado lenta y no vuelven a su estado original lo suficientemente rápido después de haber respondido a la concentración de glucosa. Otro problema es la necesidad de que sean biocompatibles, ya que hay algunos sistemas que inducen respuestas inmunes indeseables. Necesitan muchas mejoras para ser clínicamente útiles, siendo la principal que los hidrogeles deben responder a todos los cambios en la concentración de glucosa en todo momento con buena reproducibilidad, rápido y durante un período prolongado [95].

Hidrogeles que responden o se basan en proteínas

Estos hidrogeles están específicamente diseñados con bloques de reconocimiento de péptidos y proteínas. El propósito de estos es mediar en el autoensamblaje de estas macromoléculas en estructuras tridimensionales. Los hidrogeles que responden a proteínas aprovechan la tecnología de ADN recombinante y la de ingeniería de tejidos pudiendo aprovechar las propias proteínas en espiral de polímeros sintéticos lineales solubles en agua como agentes de entrecruzamiento en las estructuras de los hidrogeles. [111]. Además, se puede lograr la respuesta a temperatura y pH manipulando las secuencias de aminoácidos de ciertos dominios y la interacción celular puede mejorarse conociendo la secuencia polipeptídica hidrofílica. [111,112].

Hidrogeles que responden a antígenos.

Los hidrogeles que responden a antígenos se diseñan uniendo antígenos a la cadena de polímero hidrofílica para enviar biomoléculas a una zona específica. Estos hidrogeles pueden mezclarse con anticuerpos entrecruzados con las cadenas de polímero hidrofílicas [113]. En ausencia de antígenos libres, la estructura del hidrogel se pliega debido a las uniones antígeno-anticuerpo dentro de la red de polímero. Formular un dispositivo para el monitoreo de antígenos puede hacerlos biomateriales útiles para biomoléculas, proteínas y administración de fármacos en lugares específicos, donde un aspecto importante es el reconocimiento molecular específico en los hidrogeles sensibles a antígenos. Puede haber una competición por unirse a los anticuerpos en presencia de antígenos libres lo cual da un cambio en el volumen del hidrogel que se debe a la rotura de estos enlaces no covalentes dentro del polímero. Además, también se ha descrito que los hidrogeles muestran memoria de forma y permeación pulsátil de las proteínas a través de una red por cambios graduales en la concentración de antígenos [114]

Aplicaciones de los hidrogeles

Los hidrogeles son candidatos ideales para su uso como biomateriales debido a su consistencia blanda, elasticidad, biodegradabilidad, biocompatibilidad y similitud con los tejidos corporales y esto les da un gran rango de aplicaciones como son el reparto de fármacos, la ingeniería de tejidos, implantes y muchos otros. Algunos ejemplos se presentan a continuación:

- Aplicaciones biomédicas. Los hidrogeles copian el comportamiento de los órganos humanos siendo capaces de responder a cambios ambientales como variaciones de pH, temperatura, presencia o ausencia de enzimas o campos eléctricos, etc. Esto resulta especialmente prometedor en el ámbito de los implantes [115,116]. Los hidrogeles usados en los catéteres urinarios pueden prevenir la colonización bacteriana y proveer una superficie suave y resbaladiza para mejorar su biocompatibilidad. Una de sus aplicaciones más avanzadas ha sido convertir los estímulos electroquímicos en trabajo mecánico (contracción), por ejemplo, la contracción reversible y relajación cuando se aplica un estímulo fisicoquímico para el desarrollo de músculos artificiales que funcionan como los músculos humanos y tejidos, pero en este caso actuados mediante corriente eléctrica [95].

- Aplicación biotecnológica. Los hidrogeles han sido usados como membranas en sensores aprovechando su elasticidad, difusión selectiva del analito e índice de refracción. Los hidrogeles inteligentes se han usado para concentrar las disoluciones acuosas de solutos macromoleculares, incluyendo proteínas y enzimas, sin perturbar la actividad de la enzima ajustando la temperatura o pH del ambiente dependiendo del tamaño y carga netas [117]. Inmovilizar los adsorbentes en hidrogeles como la agarosa o el gel de alginato de calcio es una forma efectiva de prevenir el ensuciamiento del adsorbente por contaminantes coloidales. Cambiando las propiedades de llenado se ha comprobado que los hidrogeles controlan las reacciones de sustratos con enzimas inmovilizadas [118].

- Aplicaciones farmacéuticas. Entre las aplicaciones más comunes de los hidrogeles basados en poli(vinilalcohol) (PVA) se encuentran fármacos para la insulina, el estómago, el riñón, el colon, el cerebro, la sangre, el sistema nervioso o tumores. La liberación controlada del fármaco es un factor importante para la aplicación de hidrogeles en la industria farmacéutica. Kim y Lee [119] estudiaron un hidrogel de PVA para la liberación controlada de fármacos con una estructura de doble capa con la conclusión de que el tiempo de liberación puede ser extendido aumentando el tipo de PVA y el grado de entrecruzamiento. Otro tipo de hidrogeles posibles para la liberación controlada de fármacos y la regeneración de tejidos son los diacrilatos de

poli(etilenglicol) (PEG) y poli(caprolactona) (PCL), que exhiben una respuesta negativa de llenado frente a la temperatura debido a sus copolímeros hidrofílicos e hidrofóbicos. Los ensayos de degradación in vitro muestran que la degradación se dio tras un periodo de entre 3 y 8 meses. Por lo tanto, debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad, elasticidad y funcionalidad, estos hidrogeles son aptos para aplicaciones farmacéuticas.

- **Tecnologías de separación.** La contaminación de aguas es un problema medioambiental masivo debido a que la enorme cantidad de colorantes usados en el plástico, papel, cosméticos y en la industria textil se descargan en grandes cantidades y son no biodegradables, tóxicos y carcinogénicos. Las aproximaciones convencionales como la coagulación, la precipitación química, la extracción con disolventes, la filtración con membrana, la oxidación y el tratamiento biológico se utilizan para la eliminación de estos contaminantes de las aguas de residuo industriales, aunque no siempre son eficaces. Aquí la adsorción resulta un método económico y eficaz para retirar estos colorantes con propiedades como la flexibilidad en la selección del absorbente adecuado, y en el tratamiento y limpieza de efluentes aptos volver a ser usados. Así pues, recientemente han ganado interés los intentos de preparar membranas con velocidades de adsorción/desorción, separación y regeneración rápidas y capacidades de adsorción altas [120,121].

- **Hidrogeles electroconductores y biosensores.** Los hidrogeles electroconductores son mezclas poliméricas o co-redes que combinan íntegramente Polímeros Conductores Electroactivos (CEPs) con hidrogeles altamente hidratados. Los hidrogeles electroconductores pertenecen a la clase general de materiales inteligentes multifuncionales. Como clase emergente, estos materiales buscan combinar creativamente las propiedades inherentes de los materiales constituyentes, para dar lugar a un aumento de las propiedades tecnológicamente relevantes para dispositivos y sistemas como la capa de membrana de biorreconocimiento en muchos biosensores. Por ejemplo, un hidrogel electroconductor se sintetizó a partir de un hidrogel basado en poli(hidroxietilmetacrilato) (HEMA) y polianilina se utilizó en un biosensor para la incorporación del citocromo recombinante P450-2D6. Este hidrogel electroconductor se caracterizó completamente por sus propiedades eléctricas, de conmutación y

propiedades ópticas y demostró ser más rápido conmutando que su contraparte [122,123]

- Lentes de contacto. Los hidrogeles son candidatos ideales para la fabricación de conjuntos microópticos con longitudes focales que puedan cambiar de forma dinámica. Los métodos de fabricación de las microlentes tradicionales frecuentemente requieren varios pasos precisos de fabricación y dan como resultado lentes con longitudes focales fijas, por lo que esto supone un avance notable [124].

Además, más recientemente se ha descrito la fabricación de conjuntos de microlentes que se modifican con la luz. Estos se fabricaron depositando microgeles de poli-NIPAM-AA con nanopartículas de oro en la superficie. La excitación del plasmón de las nanopartículas mediante irradiación a 520 nm dio lugar a una transferencia de energía a los microgeles en forma de calor. La modulación de la longitud focal de los conjuntos de microlentes se investigó por su iluminación con láseres de luz de varias potencias a diferentes temperaturas y pH [125].

Dada su transición de volumen inherentemente rápida, sus simples técnicas de fabricación y la dinámica cambiante de la lente focal, los conjuntos de microlentes son dispositivos prometedores para el desarrollo futuro de los hidrogeles.

- Industria de envasado alimentario. Varios grupos de investigación y compañías industriales en todo el mundo están desarrollando ahora soluciones de envasado amigables con el medio ambiente para explicar las ventajas ecológicas de los biopolímeros en aplicaciones como el envasado de alimentos. Los biopolímeros directamente extraídos de la biomasa o los microorganismos además de algunos producidos por síntesis química clásica se han usado para desarrollar nuevas estructuras para el desarrollo de aplicaciones envasado alimentario de los biopolímeros, lo cual ha dejado atrás los materiales de uso médico debido a su alto coste, baja fuerza y escasa resistencia al agua. Hasta hace poco, las rutas más usadas para superar estos factores limitantes implicaban la mezcla de polímeros sintéticos y naturales juntos o incorporando rellenos inorgánicos. Como alternativa, los hidrogeles pueden ofrecer también nuevas oportunidades para el diseño de material de envasado eficiente a base de biopolímeros con propiedades deseables. La naturaleza específica de los

biopolímeros influencia críticamente las propiedades alcanzables de los complejos. Polisacáridos rígidos lineales como la pectina y la goma xantana, cuando se mezclan con proteínas tienden a formar complejos adecuados para producir geles en forma de láminas, membranas o recubrimientos. En contraste, polisacáridos más globulares y flexibles como la goma acacia generan estructuras esféricas que pueden encapsular compuestos activos y embeberlos en películas. De manera similar, proteínas de alto peso molecular flexibles son las más adecuadas para desarrollar pares proteína-polisacárido, debido a la capacidad de aguantar los cambios en la conformación del biopolímero implicado en los diferentes tipos de asociaciones [126].

- **Industria cosmética.** El desarrollo continuo de nuevos ingredientes activos para cosmética y productos de cuidado personal es una de las áreas más importantes en la investigación en esta industria. Hay un número significativo de productos cosméticos nuevos basados en esta nueva generación de ingredientes activos. Hay nuevos materiales basados en el quitosán que han sido aceptados recientemente por el Consejo de Productos de Cuidado Personal como nuevos ingredientes de cosméticos con el nombre INCI de Carboximetil Caproil Quitosán. El Ácido Quitosánico® es un ingrediente cosmético nuevo, derivado del quitosán, soluble en agua y con alto valor de balance hidrofílico-lipofílico. Este ácido puede formar estructuras de nanoredes cuando su concentración es mayor que 0.5% y puede autoensamblarse en estructura de nanoesferas cuando su concentración es menor a 0.2%. El Ácido Quitosánico® tiene una actividad antimicrobiana muy potente contra las bacterias gram-positivas, las bacterias gram-negativas y los hongos. El Ácido Quitosánico® también tiene una moderada actividad de recogida de residuos de radicales DPPH. Adicionalmente, este ácido exhibe buena actividad de hidratación para absorber y retener moléculas de agua. Desde el punto de vista de la seguridad, el Ácido Quitosánico® no tiene citotoxicidad para las células L-929 si su concentración es menor al 0.5%. Además, tiene buena compatibilidad con muchos ingredientes que se usan normalmente en cosméticos [127].

5. Sistemas de detección

Tras discutir los tipos y modos de fabricación de los dispositivos microfluídicos capilares, conviene revisar posibles transductores:

Electroquímicos. Han revolucionado los análisis modernos y han ganado considerable atención debido a su simplicidad técnica, sus respuestas rápidas y sensibles, la posibilidad de fabricarlos a escala industrial, su bajo coste y la posibilidad de miniaturización [128]. Los sensores electroquímicos usualmente generan respuestas eléctricas en presencia de un determinado analito. En la *Tabla 1.2* se recogen algunos de los principales métodos electroquímicos y las propiedades eléctricas que miden.

La *Tabla 1.2* indica que en general, las respuestas electroquímicas monitorizadas con diferentes métodos se basan principalmente en diferencias de potencial, resistencia y corriente eléctrica, las tres propiedades básicas que permiten caracterizar un flujo de corriente eléctrica.

Cuando se emplean técnicas electroquímicas como método de análisis, se las puede dividir en dos grupos principales:

- Los métodos de interfase. Son métodos que responden directa o indirectamente a la presencia del analito en la superficie del electrodo, que constituye la unidad sensora en este caso, dando como resultado una modificación en la señal eléctrica que puede ser medida. Se pueden dividir los métodos de interfaz a su vez en dos subgrupos: Los métodos estáticos y los dinámicos. Los métodos estáticos se definen como aquellos en los que la corriente eléctrica es nula y no hay alteración de esta, mientras que los métodos dinámicos son aquellos que en los que ocurre una transferencia de electrones entre el electrodo y el analito (se da una reacción redox).

Un método de interfaz estático sería la potenciometría, que es uno de los métodos electroquímicos más utilizados para aplicaciones analíticas. Un ejemplo de potenciometría de sobra conocido sería el electrodo de pH, que suele basarse en electrodos de membrana de vidrio como indicadores de la concentración (actividad) de iones H^+ en disolución. En general el electrodo de vidrio compara la actividad de los iones H^+ a ambos lados de la membrana de vidrio cuya concentración interna está fija y es

conocida. Las diferencias de potencial de las disoluciones a ambos lados de la membrana se convierten en pH mediante la ecuación de Nernst.

Tabla 1.2 Principales métodos electroquímicos para el desarrollo de sensores.

Método electroquímico	Propiedad eléctrica medida	Unidades
Potenciometría	Diferencia de potencial	V
Conductimetría	Resistencia	Ω
Amperometría Voltimetría	Corriente en función del potencial aplicado	I
Culombimetría (Q)	Corriente en función del tiempo	$C = I \cdot s$
Capacitancia (C)	Relación entre carga eléctrica y diferencia de potencial	$F = C \cdot V^{-1}$

Entre los métodos de interfaz dinámicos se encuentran la amperometría, voltimetría y culombimetría como técnicas en las que se controla el potencial y las valoraciones culombimétricas como técnica en la que se controla la corriente.

- Métodos no de interfaz. Miden la disolución en su conjunto en vez de estar condicionados exclusivamente por los procesos que ocurren en la interfaz electrodo-disolución. Es el caso de la conductimetría, por ejemplo [129].

Como el principio fundamental de cualquier sensor electroquímico es el reconocimiento de analitos a través de una capa activa del material que lo compone y la subsiguiente transducción de la señal, se puede concluir que los sensores electroquímicos están casi siempre basados en métodos de interfaz.

Piezoeléctricos. Reciben también el nombre de sensores basados en la masa. Los sensores piezoeléctricos emplean materiales en los que se produce una polarización de la carga eléctrica al aplicar una deformación mecánica. Típicamente se usan cristales de cuarzo y el campo eléctrico oscilante producido depende de la naturaleza, tamaño, forma y masa del cristal. La interacción del analito con el transductor hace que haya un cambio de masa y, por tanto, cambia la frecuencia de oscilación. Un tipo de sensor piezoeléctrico habitual es la microbalanza de cristal de cuarzo [130].

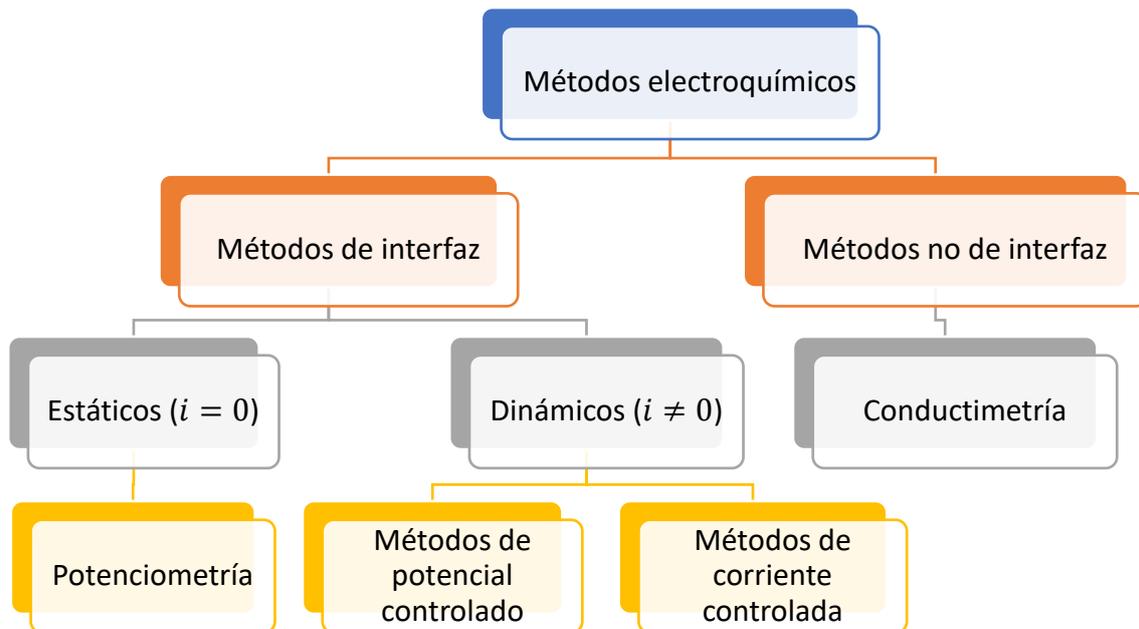


Figura 1.18 Clasificación de los métodos electroquímicos para sensores.

Ópticos. Los dispositivos ópticos transforman cambios en propiedades ópticas que se dan como resultado de la interacción entre el analito y el receptor en señales digitales/eléctricas para dar información sobre el analito [131].

Los diferentes sensores ópticos posibles son: Sensores de fibra óptica, sensores directos y sensores indirectos.

Los primeros sensores de fibra óptica (FOS) se diseñaron para obtener información a través de fibras ópticas basándose en el hecho de que las alteraciones de propiedades físicas específicas de un medio dan lugar a un cambio predecible en las características de transmisión de luz de la fibra óptica. Sin embargo, ahora es posible medir también propiedades químicas mediante técnicas basadas en fibras ópticas. Estas se dividen en métodos extrínsecos e intrínsecos. Los métodos intrínsecos implican la medida directa del analito a través de un cambio ópticamente detectable en un indicador inmovilizados en el extremo de la fibra. En este caso la fibra no se usa como tal para la medida mientras que en los métodos intrínsecos sí juega un rol activo en las funciones de medida. Durante la operación de medida la interacción de la luz del analito tiene lugar en el elemento de fibra óptica. Estos sensores no miden directamente el analito, pero sí los

efectos de este sobre propiedades ópticas como son el índice de refracción, la absorción, la emisión o la polarización.

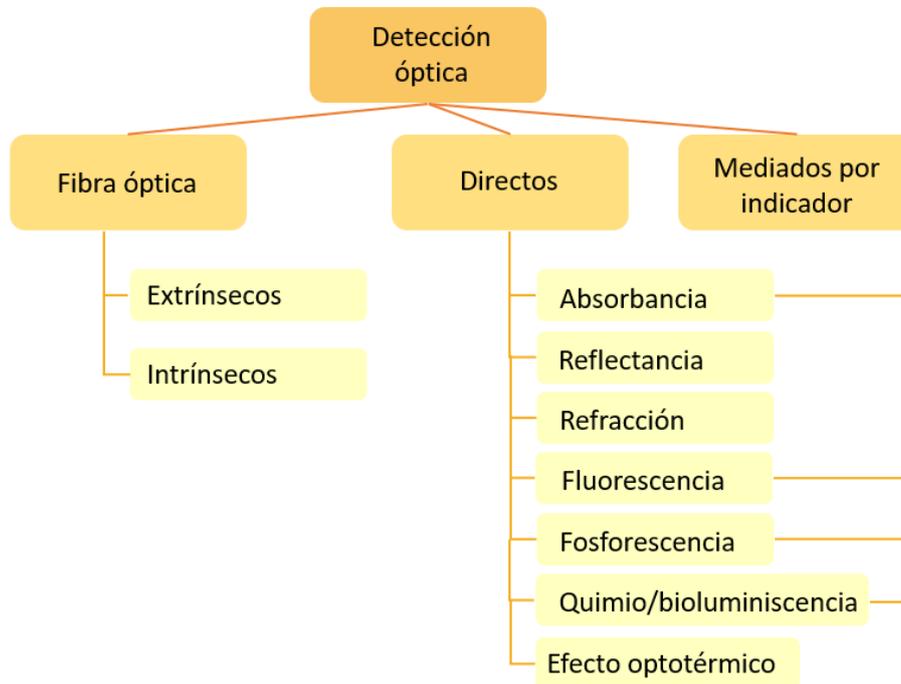


Figura 1.19 Tipos de sensores ópticos.

Por otra parte, en los sensores ópticos directos se mide una propiedad óptica intrínseca del analito para relacionarla con la presencia/ausencia o concentración de este. Sin embargo, hay casos en los que el analito no tienen una propiedad óptica intrínseca que pueda ser medida directamente por lo que se aplican esquemas en los que intervienen otros reactivos para mediar la respuesta óptica. Casi todos los sensores mediados por un indicador se basan en medidas de absorción o luminiscencia [132].

Entre los posibles métodos de transducción óptica se encuentran:

- Reflectancia. Indica la proporción de radiación electromagnética reflejada y se suele medir en un medio no transparente, usualmente usando un indicador inmovilizado.
- Fluorescencia y fosforescencia. Ambas describen procesos en los que una molécula emite radiación dentro del rango visible tras haber sido excitada por una radiación de mayor energía. La diferencia fundamental entre ambas radica en que el

estado excitado en el caso de la fluorescencia es un estado singlete mientras que en el caso de la fosforescencia es un estado triplete además de que los tiempos entre la absorción y la emisión de la radiación son más lentos en la fosforescencia que en la fluorescencia [133].

- Químio-/bioluminiscencia. Estimado por la intensidad de la luz emitida por una reacción química en el sistema receptor.

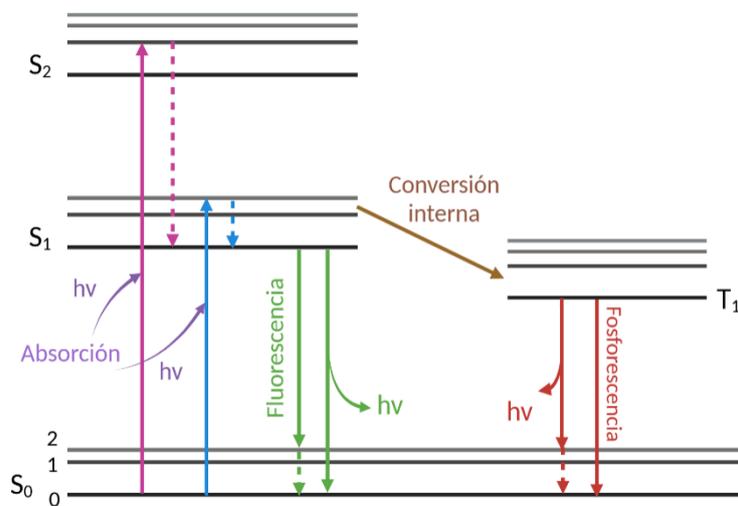


Figura 1.20 Diagrama de Jablonski de la fluorescencia y la fosforescencia.

- Refracción. Expresado a través de la variación del índice de refracción con la variación de composición de la muestra analizada.
- Efecto optotérmico. Basado en medidas del efecto térmico causado por absorción de luz.
- Dispersión de luz. Partículas de diferente tamaño presentes en la muestra analizada pueden provocar la dispersión de la luz aportando información estructural útil [134].
- Absorbancia. Provocada por la capacidad de absorber radiación ultravioleta (UV) en un rango de longitudes de onda que va desde 200 nm a los 400 nm. Se mide en un medio transparente y la absorción puede deberse al analito en sí mismo o a la reacción de este con un indicador adecuado.

Entre las formas de detección ópticas de absorción es especialmente relevante la colorimetría debido a su rapidez, bajo coste, posibilidad de ser usada en zonas remotas, facilidad de operación y estabilidad tras la detección [135].

5.1 Colorimetría

“Colorimetría” es la combinación de dos palabras: color y “metrein” (que en griego significa “medir”) y es la ciencia que estudia procesos relacionados con el color definiendo métodos que permiten la descomposición, análisis y descripción de la luz visible para cuantificar la información que aporta el color para el análisis con diversos objetivos [136]. Para describir el color es necesario hablar de acciones físicas, como es producir un estímulo en forma de luz, y resultados subjetivos, como son recibir e interpretar los estímulos en el sistema visual correspondiente.

5.1.1 Visión humana.

La luz que entra en nuestros ojos es proyectada en la parte posterior del globo ocular, la retina, donde los receptores de luz absorben una porción de la luz incidente y generan una señal que el cerebro luego interpreta. En muchos aspectos la formación de la imagen es similar a la que se produce en una cámara fotográfica. La calidad de la imagen depende de las propiedades de absorción, dispersión y enfoque de la córnea, el cristalino y los fluidos que llenan el globo ocular (humores acuoso y vítreo). Estos elementos ópticos influyen en el funcionamiento de los receptores de luz.

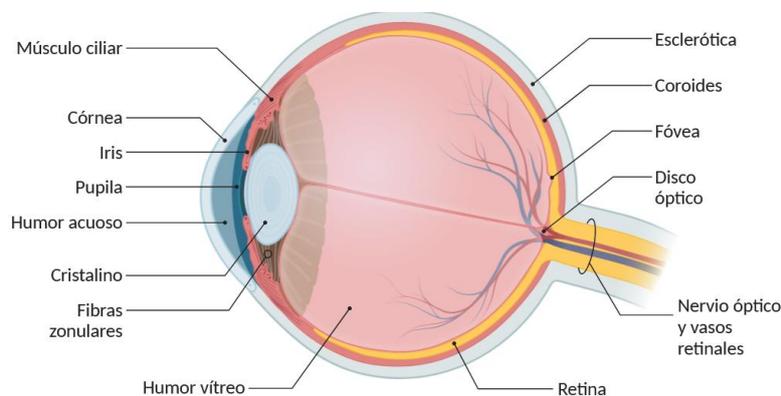


Figura 1.21. Elementos del ojo humano.

Hay dos tipos de receptores, los bastones y los conos, llamados así de acuerdo con su forma. Los bastones detectan cantidades muy pequeñas de luz, incluso un solo fotón puede producir señal, pero debido a que solo hay un tipo de pigmento en los bastones, estos solo permiten ver los objetos como tonos de gris. Conforme aumenta la cantidad de luz, los bastones pierden sensibilidad y dejan de mandar señales al cerebro. Durante el día o en una habitación bien iluminada los bastones se encontrarán inactivos. Los conos, que son el segundo tipo de receptores, son los receptores del color y tienen mucha menos sensibilidad a la luz incidente. Las sensaciones de color son el resultado de tener tres tipos de conos que responden de manera diferente a diferentes longitudes de onda. Los estímulos que producen diferentes colores tienen diferentes señales en los conos. Se suelen usar las letras L, M, y S para representar los tres tipos de conos con sus máximos de sensibilidad repartidas respectivamente en las regiones de longitud de onda larga, media y corta respectivamente. Hay cierto solapamiento entre los conos, especialmente entre los L y M, lo cual mejora la discriminación de colores. Si los receptores no solaparan en sus sensibilidades espectrales, solo sería posible percibir tres tonalidades en el espectro.

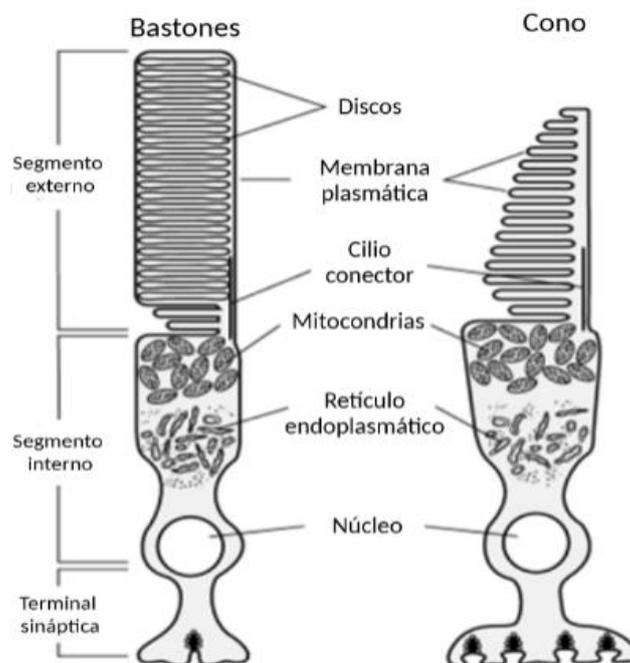


Figura 1.22 Estructura celular de los conos y bastones presentes en la retina humana [137].

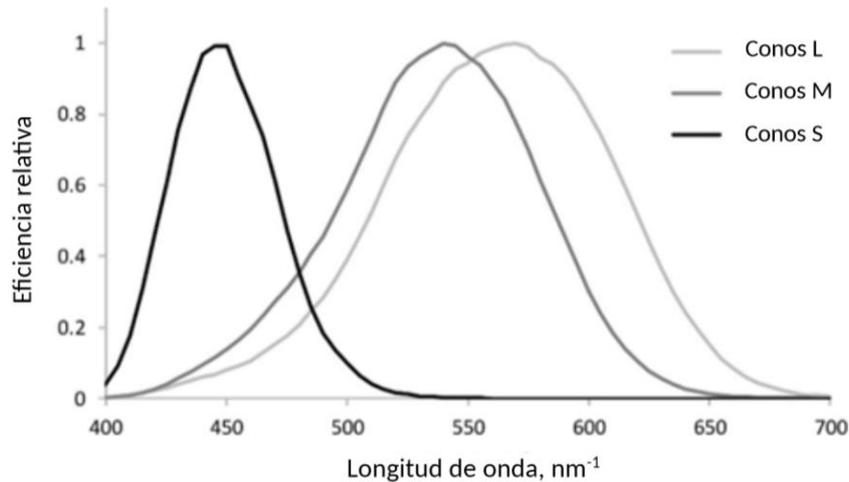


Figura 1.23 Espectro de absorción de los diferentes tipos de conos ([138]).

Cuando dos estímulos, bien sean luces coloreadas o materiales iluminados, generan las mismas señales en los conos, los dos estímulos coinciden en color. Los conos, como cualquier detector de radiación, integran la luz de todas las longitudes de onda que inciden en ellos. Cada integración de todas las longitudes de onda incidentes reduce el espectro entero de la luz incidente a tres señales, una por cada tipo de cono, resultando lo que llamamos tricromatismo. El tricromatismo permite que estímulos que no tienen exactamente las mismas propiedades espectrales puedan coincidir en color y gracias a ello, la reproducción de colores es posible.

Los conos y bastones del ojo forman un mosaico retinal. Los detectores están empaquetados densamente como en un mosaico en el que el patrón varía a lo largo de la retina. En el centro del ojo (fóvea) solo hay conos presentes. La visión fóvea se usa para distinguir detalles muy finos como puede ser leer y ver objetos a cierta distancia. Fuera de la fóvea el número de conos se reduce bastante y se sitúan unos aparte de otros, quedando los huecos entre conos ocupados por bastones. No hay una conexión separada con el cerebro por cada receptor individual, sino que estos se encuentran interconectados con la retina formando campos de recepción. Por tanto, la resolución, es decir, la capacidad de ver detalles finos depende tanto del mosaico espacial de los receptores como de cómo se interconectan.

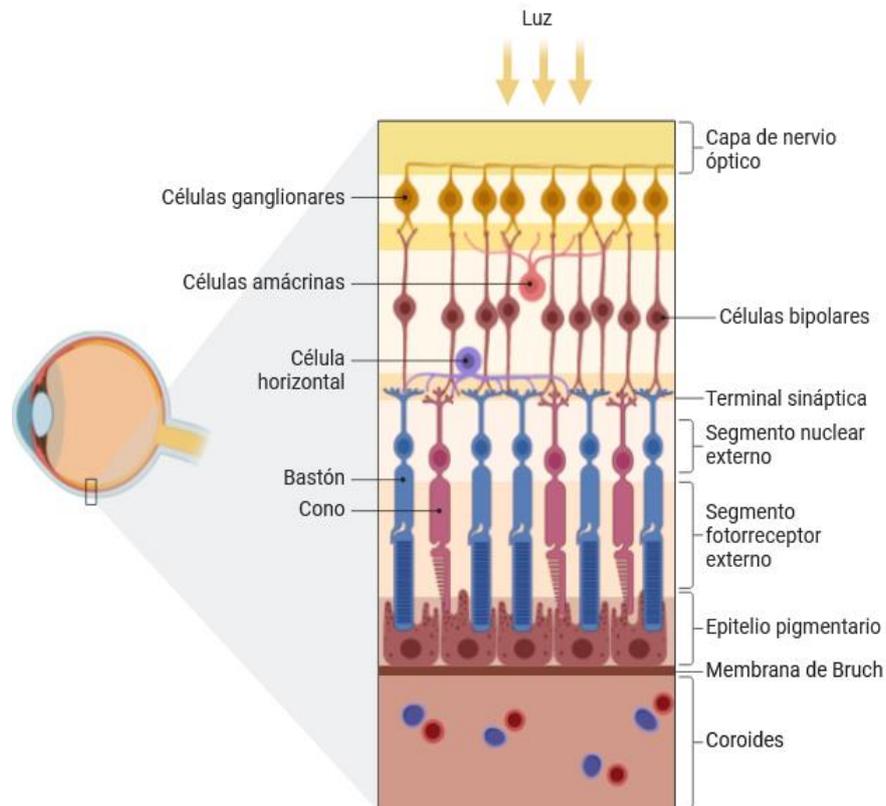


Figura 1.24. Mosaico retinal del ojo.

Hay más conos L y M que S. La ratio específica es debatida aún, pero se estima que se encuentra en torno a 6:3:1 para L:M:S. Ya que la capacidad óptica del ojo tiene limitaciones inherentes, las longitudes de onda cortas de la luz ya están algo borrosas cuando llegan a la retina, por lo que es innecesario tener un mayor número de conos S.

Al formarse los campos receptores, las señales individuales de los conos pueden ser sumadas o sustraídas unas de otras. Ya que los conos L, M y S tiene diferentes sensibilidades, diferente número y diferentes mosaicos, los campos receptivos tienen propiedades también bastante distintas. Una simplificación típica es asumir que hay tres tipos de campos receptivos del color, llamados canales opuestos. El canal blanco-negro o luminancia resulta de la suma de los conos L y M; tiene la mayor resolución espacial. El canal rojo-verde es mayoritariamente el resultado de sustraer los conos M de los L y su resolución espacial es algo menor que la del canal de luminancia. El canal amarillo-azul resulta de la adición de las señales de L y M y la sustracción de las S; tiene muy baja resolución espacial.

Por desgracia, hay diferencias en la visión entre humanos. Los compuestos químicos que forman los receptores de color varían a lo largo de la población y también lo hacen la forma de los receptores. Cada persona tiene diferentes absorciones en el cristalino y propiedades de dispersión. Por lo tanto, la visión del color incluso entre observadores “con una visión normal del color” varía significativamente. Además, entre un 8% y un 0.5% de la población tienen problemas de visión del color con uno o más tipos de receptores perdidos o uno de los conos con una sensibilidad espectral desplazada en longitud de onda. La consecuencia más importante de la variabilidad en la visión del color, tanto entre personas con “visión normal” como con personas con defectos en la percepción del color, es que a veces dos colores que se ven igual para cierto observador en unas ciertas condiciones, no lo hace para otro en las mismas [139].

Es por ello por lo que, más allá de describir la física de la radiación de los materiales o la fisiología del ojo, sería interesante poder describir los colores de forma unívoca. Los nombres de colores como “naranja” o “gris” evocan percepciones bastante consistentes. De hecho, hay 11 nombres de colores básicos que han sido identificados: Blanco, gris, negro, rojo, amarillo, verde, azul, naranja, morado, rosa y marrón. Sin embargo, dos muestras pueden ser “rojo” y sin embargo diferir mucho una de la otra [140].

5.1.2 Dispositivos de captura de imágenes

Para captar el color de forma objetiva se recurre a dispositivos de imagen. La visión por ordenador aplicada a los dispositivos microfluídicos se refiere al uso de dispositivos para la detección óptica para recibir e interpretar de forma automática la imagen de un objeto con el objetivo de obtener información química. Estos sistemas de visión pueden variar de unos a otros, pero en general suelen constar de un dispositivo analítico que cambia de color al entrar en contacto con el analito, un dispositivo de captura de imágenes conectado a un ordenador o microcontrolador, un sistema de iluminación y un software con el que se controla y procesa el conjunto [136].

A pesar de la desventaja de no ser instrumentos específicamente diseñados con fines analíticos (frente a los espectrofotómetros, que sí lo son) la amplia disponibilidad de este tipo de dispositivos de toma de imágenes y su bajo coste van en la línea de los objetivos previamente descritos para los sistemas POC y PON [136].

Entre los posibles dispositivos de imagen se encuentran:

- Escáneres. Un escáner óptico es un dispositivo usado en química analítica para digitalizar la imagen de placas de cromatografía de capa fina, geles de electroforesis y membranas sensoras ópticas entre otros materiales analíticos susceptibles de necesitar la toma de imágenes. Existen varios tipos de escáneres que pueden ser usados como los de transmisión, reflexión, fluorescencia, de película, portátiles, etc. pero los más comunes son los de superficie plana y reflexión. En este tipo de escáner se coloca el material analítico del que se precisa la imagen sobre el cristal y debajo de este hay una fuente de luz móvil y los sensores alineados monodimensionalmente capturan la luz reflejada cuando la fuente de luz ilumina el elemento analítico de interés y la convierte en señal eléctrica [136]. Algunos ejemplos del uso de escáneres en microfluídica son el dispositivo microfluídico multianalito desarrollado por Abe et al. [141] o el test colorimétrico de análisis de Fe (III) propuesto por Kompany-Zareh et al. [142].

- Cámaras digitales y webcams con sensores CCD o CMOS. Los sensores CCD son semiconductores que transfieren cargas usando pozos de potencial. Cada bloque elemental de un sistema CCD genera carga cuando la luz incide sobre él y esta carga, proporcional a la luz incidente, es posteriormente transferida píxel a píxel de forma secuencial hasta alcanzar un amplificador. Por su parte, los sensores CMOS surgieron de forma posterior a los CCD y tienen como ventaja que todas las cargas se pueden procesar al mismo tiempo, por lo que presentan tiempos de respuesta más bajos además de un menor consumo y tamaño. Existen bastantes ejemplos de análisis químicos que emplean como forma de detección óptica las cámaras tanto con detector CCD, bien sean webcams [143,144], cámaras de vídeo [145] y cámaras digitales comerciales [146,147], como con detector CMOS [148,149].

- Teléfonos móviles. El uso más común de los sensores CMOS en la actualidad realmente son las cámaras de los teléfonos móviles ya que el 90% de estos usan tecnología CMOS para la captura de imágenes. Tradicionalmente esto se debía a que los sensores CMOS producen imágenes con menos ruido y mejor aspecto, pero ahora su menor consumo de batería también es importante. La diferencia entre usar una cámara de fotos o un teléfono móvil es que los móviles combinan la respuesta rápida y la

simplicidad de análisis con la posibilidad de comunicar a tiempo real los resultados mediante tecnologías como el Bluetooth, la NFC (Near Field Communication), RFID (Radio Frequency Identification), Wifi o 3G/4G/5G, además de ofrecer una alta capacidad de almacenamiento [150]. Por si fuera poco, las últimas generaciones de móviles, los llamados smartphones, incluyen una gran variedad de sensores como acelerómetro y termómetro para detectar datos a partir de múltiples fuentes, procesadores multicore con una gran capacidad de computación y una interfaz fácil de usar para interactuar con el mundo externo por lo que para hacer de ellos los detectores ópticos ideales y más extendidos los investigadores solo tienen que desarrollar las instalaciones auxiliares que puedan necesitarse (fuentes de luz, soportes para mantener el dispositivo microfluídico en una posición determinada respecto a la cámara, conexiones a procesadores de datos o aplicaciones desarrolladas para interpretar la información, etc.) [151]. Algunos ejemplos de dispositivos POC y PON que emplean el smartphone como detector óptico se presentan en la *Tabla 1.3*.

Las imágenes adquiridas con los dispositivos de imagen reseñados pueden procesarse con aplicaciones específicamente desarrolladas para ello o con ayuda de programas disponibles para ordenador como ImageJ, Adobe Photoshop, Adobe Illustrator, Matlab y Python, siendo ImageJ el software libre más usado [160].

Tabla 1.3 Ejemplos de dispositivos POC y PON que emplean el smartphone como detector.

Muestras	Descripción corta	Ref.
Vitamina D	El sistema consiste en un accesorio de smartphone, una app y una tira sensora que emplea nanopartículas de oro para determinar colorimétricamente los niveles fisiológicos de 25-hidroxivitamina D con una precisión de 10 nM.	[152]
Cortisol en saliva	El biosensor consiste en un inmunoensayo de flujo lateral quimioluminescente que emplea un smartphone para cuantificar el cortisol en saliva. Se utiliza un inmunoensayo competitivo usando peroxidasa-conjugado del cortisol y se añade como sustrato quimioluminescente luminol/potenciador/peróxido de hidrógeno. La cámara del móvil detecta la luz y una aplicación específica analiza los datos. Con este biosensor se logró un rango de cuantificación de 0.3 a 60 ng/mL.	[153]

Hematocrito en sangre	Usando una cámara integrada en el smartphone, se toman imágenes de la sangre humana en un microcanal y se analizan con una aplicación de smartphone logrando una sensibilidad de 0.53 GSV (a.u.)/%hematocrito.	[154]
Glucosa y urea	Un smartphone equipado con una aplicación de análisis de color se combina con ensayos colorimétricos de glucosa y urea de la empresa Vitros®. Con un R2 de 0.9994 o 0.9996 para rangos de concentraciones relevantes tanto de la glucosa (30-515 mg/dl) como del nitrógeno uréico en sangre (2-190 mg/dl).	[155]
Sarcoma de Kaposi	El sarcoma de Kaposi es un cáncer infeccioso provocado por un herpesvirus (KSHV). En este trabajo se detectan los ácidos nucleicos del KSHV mediante un ensayo colorimétrico que emplea nanopartículas logrando detectar secuencias de DNA del KSHV incluso por debajo de 1 nM.	[156]
Cocaína	El ensayo se basa en la diferencia de afinidad entre el ADN de cadena simple y el de cadena doble por las nanopartículas de oro. Para facilitar el análisis se desarrolló una aplicación de Android para caracterizar automáticamente la colorimetría. Además la actividad del ensayo puede mantenerse hasta dos meses.	[157]
Metales pesados (Cu, Ni, Cd y Cr)	Consiste en un dispositivo microfluídico 3D basado en papel para la determinación de metales pesados en aguas. Las reacciones cromogénicas de sensado se capturan con la cámara del móvil y son analizadas con un ordenador empleando procesamiento de imágenes y software de análisis. Los límites de detección logrados fueron: 0.29 ppm para el Cu (II), 0.33 ppm para el Ni (II), 0.19 ppm para el Cd (II) y 0.35 ppm para el Cr (VI).	[158]
Trinitrotolueno (TNT) en suelo	La cámara de un smartphone se usó para capturar los resultados de un ensayo colorimétrico rápido para determinar la concentración de TNT en suelos.	[159]

Para convertir la imagen de un dispositivo analítico en valores numéricos, se suele dividir la imagen en una red regular bidimensional de píxeles que posteriormente son procesados digitalmente. El proceso de segmentación de la imagen que hace posible mediante segmentación por control de umbral (thresholding), segmentación en torno a un eje o segmentación por regiones [136]. A continuación, en caso de ser necesario, se

emplean una serie de operaciones matemáticas como la reducción del ruido, la corrección del nivel de grises y la corrección de los difuminados para mejorar la calidad de la imagen y eliminar defectos y finalmente, se selecciona la región de interés (ROI) de la imagen, siendo esta la zona del sensor en la que se esperan observar cambios en el color relacionados con las variaciones en concentración o la presencia/ausencia de analito en la muestra, y extrae la información del color de esta, obviando los colores del fondo [136].

5.1.3 Espacios de color

Una vez tomadas las imágenes, realizados los ajustes pertinentes y seleccionados los ROI, es preciso encontrar una manera de cuantificar el color. Para ello, es necesario especificar un mínimo de tres cantidades (a las que llamaremos “coordenadas de color”) en unas condiciones de iluminación y observación específicas. Esto hace posible organizar los colores en base a sistemas de tres dimensiones, lo que se conocen como “espacios de color”. Independientemente del significado que se les asigne a las variables, con tres es suficiente para describir todos los colores posibles, aunque haya casos en los que se añadan más para completar una teoría o mejorar la reproducibilidad. Por ejemplo, en los procesos tradicionales de imprenta se añade negro (K) a las tintas cian, magenta y amarillo (CMY) para obtener mejor las tonalidades oscuras. Estas variables añadidas no son dimensiones adicionales por sí mismas ya que no son totalmente independientes de las coordenadas primarias, por ejemplo, algunos de los colores generados por mezcla de tintas adicionales a las primarias se podrían generar solo por mezcla de los primarios originales, aunque supusiera una dificultad añadida [161].

En base a la literatura hay muchos sistemas de color, algunos que datan de miles de años. Para el propósito de esta Tesis se consideran tres tipos: de mezclado de color (gobernados por la física del color), de percepción del color y de coincidencia de color (gobernados ambos por experimentación visual) [139].

Los sistemas de mezclado del color ejemplifican las relaciones entre los colores primarios y sus mezclas intermedias. El set de primarios definido depende del método de coloración. El sistema más sencillo quizás sea el mezclado de la luz coloreada, cuyos

colores primarios son el rojo, el verde y el azul. Cuando las cantidades de los colores primarios están en su mínimo, resulta el negro. Cuando las cantidades de los tres están en su máximo, resulta el blanco. Aumentar o reducir las cantidades de los colores primarios individuales o sus varias combinaciones entre en mínimo y máximo en incrementos pares produce una descripción sistemática de los colores.

Mientras que los sistemas de mezclado del color evolucionan a partir de definir un conjunto de primarios, los sistemas de percepción del color evolucionan de definir un conjunto de percepciones visuales. Estos sistemas se generan en nuestra mente, por lo que no requieren un conjunto de muestras, aunque ejemplificarlos tenga numerosas ventajas. Sin las muestras, es imprescindible que las percepciones sean inequívocas y consistentes de una persona a otra. También en estos el espaciado es par, estando explícito en este caso el concepto de espaciado visual igual. Esto permite interpolar visualmente y facilita la clasificación de los colores en incrementos pequeños. De todos modos, cuando se quieren producir muestras que ejemplifiquen el sistema, hay muchos aspectos críticos que tener en cuenta. El primero tiene que ver con la visualización y la iluminación ambiente pero la elección de materiales es igualmente crítica. El set de estímulos no debería ser sensible a cambios ambientales. Esto incluye cambios causados por la humedad y la temperatura, por aclarado o amarilleado con el tiempo, etc.

Un ejemplo de un sistema de color percibido sería el Sistema de Color Natural (NCS). Este sistema se basa en que hay seis colores elementales que son el amarillo, el rojo, el azul, el verde, el blanco y el negro, que son los que se corresponden con nuestras sensaciones de color más simples, percibiendo el resto como combinaciones de 2, 3 e incluso 4 de estos colores. El espacio de color se define en base a tres coordenadas: negrura, cromaticidad y tonalidad, expresadas en porcentajes [162].

El último tipo de sistemas de color son los basados en la coincidencia de colores. El color a reproducir debe coincidir con el color de la muestra vista e iluminada en unas condiciones específicas. Si estamos comparando luces coloreadas con muestras materiales simplificamos las condiciones de manera que la luz emitida por el dispositivo coincida con la luz reflejada por el material.

Esta clasificación de los sistemas de color es útil porque dependiendo de para qué se vaya a usar la medida del color, se elige un espacio de color u otro [139].

La principal diferencia entre espacios de color es la dependencia del dispositivo. Las coordenadas de color de espacios independientes del dispositivo son siempre las mismas sea cual sea el medio de salida. Los espacios xyY y su equivalente, la representación XYZ , estarían dentro de esta categoría. Para que se entienda, un estímulo que sea caracterizado por un trio de valores XYZ se percibirán como el mismo color que otro estímulo procedente de una fuente diferente pero que tenga el mismo trio de valores XYZ . Esto se debe a que el espacio XYZ se basa en como el ojo humano percibe la luz y, por tanto, es independiente del medio en el que se encuentre el color. Por otro lado, estarían los espacios de color que dependen del dispositivo, que tendrán diferentes coordenadas para un mismo color si se presenta en diferentes dispositivos de salida. Los espacios RGB y $CMYK$ caen dentro de la categoría de espacios dependientes del dispositivo porque se definen con relación a unos colores primarios muy específicos. Así pues, un trio de valores RGB en un ordenador Apple Macintosh no representará el mismo color que ese mismo trio de valores en un ordenador Windows.

Otra distinción a tener en cuenta es la facilidad con la que las coordenadas pueden asociarse mentalmente con el color que codifican. Por ejemplo, el espacio de color HSB se ha popularizado debido a lo fácil que resulta visualizar un trio de valores de sus coordenadas mientras que un conjunto de valores de RGB o $CMYK$ puede ser difícil de visualizar y los de xyY son casi imposibles de imaginar para un usuario inexperto [161].

Algunos de los espacios de color más comúnmente usados en el desarrollo de sensores ópticos se presentan a continuación.

Espacio RGB

Es el espacio de color más común en los dispositivos de captura ya que funciona de manera similar a la visión humana y se usa como espacio de color a partir del cual se obtienen otros espacios de color.

RGB viene de los nombres en inglés de rojo (R), verde (G) y azul (B), que son las tres coordenadas de color de las que se vale este espacio de color aditivo para describir de forma unívoca cualquier color. Los valores pueden variar desde el trio $[0, 0, 0]$, que representa el color negro, al trio de valores $[2^{n-1}, 2^{n-1}, 2^{n-1}]$ (Blanco) siendo n el número de bits digitalizados para cada canal del dispositivo [136].

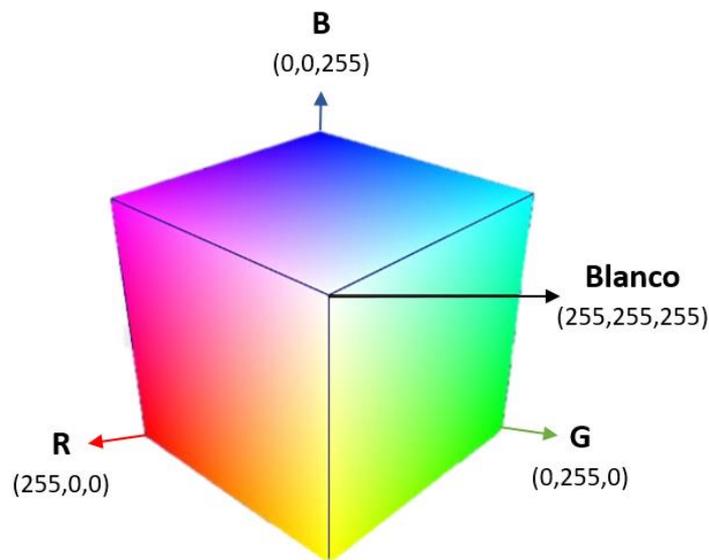


Figura 1.25 Representación del espacio de color RGB mediante vectores 3D [163].

Al depender del dispositivo, el espacio RGB no está globalmente estandarizado y un trio de valores RGB puede representar visualmente dos colores diferentes en dos dispositivos distintos. Se han hecho valiosos intentos de estandarizarlo (Por ejemplo, Adobe RGB) pero, a pesar de ello, su fuerte dependencia con la iluminación ha impedido su uso en algunas aplicaciones de alta resolución.

Para paliar este efecto de la iluminación y poder aprovechar la simplicidad y capacidad de medida directa con detectores de imagen electrónicos de este espacio de color, lo que se hace cuando se emplea en el desarrollo de sensores ópticos es, en vez de usar las tres coordenadas por separado, emplear una combinación de las coordenadas RGB o definir una magnitud llamada “intensidad” para definir la contribución colorimétrica de la luz incidente sobre los elementos sensores del detector [136].

Espacio HSV

Este espacio de color describe totalmente un color en base a 3 coordenadas: la tonalidad (H), la saturación (S) y el brillo (V). La tonalidad se suele definir como la longitud de onda dominante del espectro de radiación de un color. La saturación consiste en la pureza del color y finalmente, el brillo, representa la intensidad de la luz presente en el color descrito.

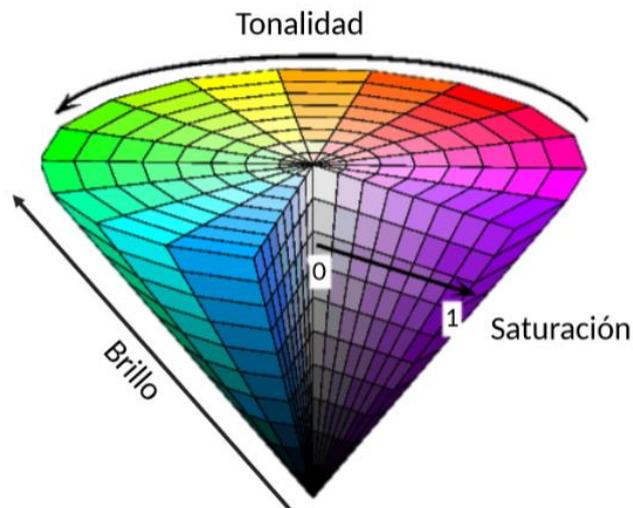


Figura 1.26 Representación del espacio de color HSV.

Las coordenadas HSV pueden obtenerse fácilmente a partir del espacio de color RGB, transformándolo en un espacio perceptualmente uniforme y, por tanto, clasificando los colores puramente en relación a como el ojo humano los percibe. Este tipo de espacios de color que emplean la tonalidad, saturación y brillo se conocen también como espacios de color fenomenológicos [136].

En este contexto también existe el espacio de color HSI en el que la I es por “Intensidad” y el HSL donde la L es la luminancia del color. Todos ellos se consideran espacios de color orientados con la tonalidad, aunque no sean equivalentes debido a la definición de saturación. Para HSV la saturación se entiende que está definida entre blanco y color saturado mientras que en HSI y HSL va desde el gris hasta el color saturado.

6. Aplicaciones de los μ PADs, μ TADs y μ CADs

Algunas áreas en las que se aplican los dispositivos microfluídicos basados en fibras son:

- Farmacia y toxicología. En los últimos años se han desarrollado tecnologías de cribado de alto rendimiento para encontrar nuevos fármacos, sin embargo, la productividad de la investigación de nuevos fármacos ha caído en parte debido al alto coste de las tecnologías disponibles actualmente [164]. Es por ello que la miniaturización de los ensayos a través del uso de dispositivos microfluídicos es una aproximación prometedora y aún lo es más el empleo de fibras como soporte, ya que estas tienen bajo coste, pueden conducir el flujo por capilaridad y son idóneas como plataformas de cultivo celular. La actividad de múltiples fármacos contra el cáncer (entre ellos la cicloheximida, el etopósido y la camptotecina) se ha comprobado a través de la apoptosis del crecimiento de células en soportes de fibra.

También para el análisis de la calidad de los fármacos en formato de dosis para el suministro, son útiles. Hay fármacos que pueden verse afectados por las condiciones de transporte y almacenamiento y los métodos instrumentales convencionales pueden ser muy costosos frente a los dispositivos microfluídicos más baratos y portátiles. De hecho, Manmana et al. [165] propusieron un ensayo colorimétrico de análisis de dopamina en formato inyectable usando un μ PAD.

Los medicamentos falsificados son medicamentos con fórmulas farmacéuticas que carecen de principios activos, contienen cantidades incorrectas de principios activos, contienen impurezas o tienen etiquetas incorrectas. Son falsificados intencionalmente, elaborados por fabricantes no registrados que no cumplen las normas de calidad establecidas [166]. Estos medicamentos, además de poner en riesgo la salud de quienes los consumen, son antibióticos en su mayoría, por lo que su uso se ha relacionado con un riesgo creciente de resistencia antimicrobiana, que es uno de los mayores problemas del sector sanitario en la actualidad. Además, debido a la prevalencia de los medicamentos falsificados en áreas en las que es difícil llevar a cabo un control de calidad tradicional, los dispositivos microfluídicos basados en fibras juegan un papel importante como herramienta de screening en este caso. De hecho, la detección de

antibióticos β -lactama como la amoxicilina se puede llevar a cabo con ensayos colorimétricos [167].

En el ámbito de la toxicología, la microfluídica también es esencial ya que permite análisis *in situ* con pequeños volúmenes de muestra [168]. Por ejemplo, recientemente se ha demostrado que el arsénico promueve un cambio estructural en los nanoprismas de plata, dando como resultado un cambio de color. Basándose en este hecho Saadati et al. [169] propusieron un dispositivo basado en papel para detectar arsénico en orina, mostrando un límite de cuantificación comparable o incluso mejor que el de los dispositivos que se emplean habitualmente.

- Medio ambiente. Se encarga del análisis de contaminantes medioambientales, que engloba el análisis de suelos (en busca de residuos de explosivos o de contaminantes como los metales pesados, por ejemplo), del aire (en busca de contaminantes gaseosos o en suspensión), el análisis ecológico (pesticidas, insecticidas, fungicidas), el de aguas (microorganismos), etc.

Conforme la tecnología ha avanzado, el medio ambiente ha sufrido mayores contaminaciones por metales pesados, nutrientes, microorganismos, contaminantes orgánicos, pesticidas, etc. Muchos de estos contaminantes son extremadamente perjudiciales para la salud humana y por ello es muy importante desarrollar técnicas instrumentales capaces de detectar bajas concentraciones de analitos en diversas matrices. En muchos casos los métodos analíticos empleados requieren equipos costosos y personal especializados para llevarlos a cabo. Sin embargo, los dispositivos microfluídicos basados en fibras presentan la ventaja de requerir pequeños volúmenes de muestra y dar respuestas rápidas *in situ* a problemas analíticos. Los dispositivos microfluídicos son una oportunidad para monitorizar mayores extensiones geográficas con costes reducidos. Algunos ejemplos de problemas medioambientales que se pueden evaluar gracias a estos dispositivos son el análisis de suelos en busca de contaminantes que puedan reducir su fertilidad o impedir su capacidad de retener nutrientes o agua, la detección de residuos de explosivos (p.e. detección de TNT en ropa, pieles o sobres) [170], la contaminación con metales pesados (p.e. Nam y An propusieron un dispositivo de papel efectivo y fácil de usar para evaluar la toxicidad del cobre y el níquel en el suelo

con algas) [171] o el análisis de contaminantes en el aire, como por ejemplo los pesticidas organofosforados y carbamatos, los bisfenoles [172,173], el amoníaco o el sulfuro de hidrógeno [174–176].

- Alimentario. El ejemplo más avanzado de sistemas PON orientado al control alimentario son los envases inteligentes, que llevan el control alimentario más allá de la cadena de producción, incluyendo también la distribución y el período de tiempo comprendido entre la compra del producto hasta su consumo.

El envasado inteligente se refiere a los sistemas de envasados que llevan incluidos sensores alimentarios. Se usan para extender la vida útil de un producto, controlar su frescor, mostrar información sobre la calidad y mejorar la seguridad de los consumidores. El envasado inteligente es el futuro en sociedades en las que el desperdicio de alimentos alcanza cifras extremadamente altas y permite a los consumidores tomar decisiones mejor informadas acerca de los alimentos que compran [177].

Un ejemplo de desarrollo de envases inteligentes sería el propuesto por Grazioli et al. [178]. El malondialdehído es un producto secundario de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados que se determina a menudo en una reacción lenta con ácido tiobarbitúrico. El producto de la reacción es un aducto de color rosáceo fácilmente detectable por medios ópticos por lo que en la investigación se desarrolló una etiqueta colorimétrica a partir de discos de papel sumergidos en una disolución del ácido tiobarbitúrico. También ha habido avances hacia la incorporación de la cúrcuma, que exhibe cambios de color frente a variaciones de pH, en películas de biopolímeros como son la gelatina o el ácido poliláctico [179].

- Médico. Entre los múltiples avances en medicina que se están logrando con los dispositivos microfluídicos de tela, hilo y papel, cabe resaltar los sistemas vestibles.

Los dispositivos vestibles son dispositivos analíticos que se colocan en alguna parte del cuerpo de una persona de manera que resulten cómodos, como puede ser ropa, vendajes, relojes, gafas, lentes de contacto y anillos, y que proporcionan información

fisiológica del portador o su entorno con la ventaja de ser portátiles, sencillos de usar y fácilmente adaptables al entorno [180].

Los dispositivos vestibles se desarrollaron sustancialmente en la década pasada gracias al desarrollo de la electrónica miniaturizada e impresa pero han estado especialmente orientados al control de parámetros físicos como puede ser el ritmo cardiaco, el nivel de oxígeno en sangre, la temperatura corporal, el movimiento del cuerpo, la actividad cerebral y la presión sanguínea entre otros, habiendo muchos menos dispositivos vestibles orientados a la obtención de información química del portador [181].

El seguimiento de biomarcadores en fluidos biológicos como el sudor, la saliva o las lágrimas supone la ventaja de evitar perforaciones más o menos dolorosas en la piel propias del muestreo de sangre y su combinación con la portabilidad de los dispositivos vestibles aumenta la frecuencia de obtención de la información, dando lugar a alertas tempranas de variaciones en el estado de salud del portador, que repercuten en la toma de decisiones médicas [182].

Algunos ejemplos de dispositivos vestibles desarrollados en los últimos años son el vendaje inteligente desarrollado por Kassal et al. [183] para el control de las variaciones de pH del líquido exudado por heridas, de manera que sirva para relacionarlo con la correcta cicatrización o la infección de la herida o el interés creciente en el control a tiempo real de fármacos para mejorar las terapias individualizadas que presentan Bian et al. [184].

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Figura 1.1 Tira sensora de pH de la casa comercial Panreac.</u>	32
<u>Figura 1.2 Esquema de los componentes de un inmunoensayo de flujo lateral.</u>	34
<u>Figura 1.3 Línea temporal de los materiales usados en dispositivos microfluídicos.</u>	38
<u>Figura 1.4 Esquema de las fuerzas implicadas en la microfluídica en papel.</u>	41
<u>Figura 1.5 Montaje para serigrafía.</u>	51
<u>Figura 1.6 Corte con plotter de una película de acetato.</u>	52
<u>Figura 1.7 Corte láser de una pieza de conglomerado.</u>	54
<u>Figura 1.8 Esquemas de los sistemas de control de flujo desarrollados por Lutz et al. [85] (A) Xiao et al. [84] (B) y Toley et al. [33] (C).</u>	58
<u>Figura 1.9 A) Red de polímero ideal. B) Uniones multifuncionales.</u>	62
<u>Figura 1.10 Clasificación de los hidrogeles.</u>	63
<u>Figura 1.11 Mecanismo de las reacciones de Diels-Alder.</u>	70
<u>Figura 1.12 Clasificación de los métodos electroquímicos para sensores.</u>	84
<u>Figura 1.13 Tipos de sensores ópticos.</u>	85
<u>Figura 1.14 Diagrama de Jablonski de la fluorescencia y la fosforescencia.</u>	86
<u>Figura 1.15 Estructura celular de los conos y bastones presentes en la retina humana [134].</u>	88
<u>Figura 1.16 Espectro de absorción de los diferentes tipos de conos ([135].</u>	89
<u>Figura 1.17 Representación del espacio de color RGB mediante vectores 3D [160].</u> ...	98
<u>Figura 1.18 Representación del espacio de color HSV.</u>	99

ÍNDICE DE TABLAS

<u>Tabla 1.1 Ejemplos de ensayos que se realizan con dispositivos POC.....</u>	30
<u>Tabla 1.2 Principales métodos electroquímicos para el desarrollo de sensores.....</u>	83
<u>Tabla 1.3 Ejemplos de dispositivos POC y PON que emplean el smartphone como detector.....</u>	93

CAPÍTULO 2:

METODOLOGÍA

CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA

1. Reactivos, materiales e instrumentación

1.1 Reactivos

Todos los productos químicos empleados durante esta Tesis Doctoral fueron de grado analítico, se adquirieron en la casa comercial Merck y se presentan en las *Tablas 2.1, 2.2 y 2.3* separados en reactivos, disolventes y gases respectivamente.

Tabla 2.1 *Relación de reactivos utilizados en esta Tesis Doctoral.*

No CAS	Nombre del reactivo	Abreviatura
85-85-8	1-(2-Piridilazo)-2-naftol	PAN-Cu
91-10-1	2,6-Dimetoxifenol	
931-36-2	2-Etil-4-metilimidazol	EMIES
1193-02-8	4-Aminotiofenol	
596-01-0	α -Naftolftaleina	
4767-03-7	Ácido 2,2-bis(hidroximetil) propionico	DMPA
64-19-7	Ácido acético	AcOH
7647-01-0	Ácido clorhídrico	
7664-93-9	Ácido sulfúrico	
79-06-1	Acrilamida	AAM
57-09-0	Bromuro de cetiltrimetilamonio	CTAB
497-19-8	Carbonato de sodio	
9004-57-3	Etilcelulosa	
7447-41-8	Cloruro de litio	
9004-54-0	Dextran	
701921-71-3	Dicianamida de trihexiltetradecilfosfonio	PDCA
7778-77-0	Dihidrógeno fosfato de potasio	
77-77-0	Divinilsulfona	DVS
1310-58-3	Hidróxido de potasio	
1310-73-2	Hidróxido de sodio	
17756-58-0	Hidróxido de tetraoctilamonio	TOAOH

	(E)-2,6-dimetoxi-4-((4-((2-vinilsulfonil)etil)tio)fenil)diazenil fenol	AD-VS-1
548-62-9	Indicador cristal violeta	
7758-11-4	Monohidrógeno fosfato de potasio	
2210-25-5	N-isopropilacrilamida	NIPAM
110-26-9	N,N'-metilenobis(acrilamida)	MBAA
110-18-9	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina	TEMED
31175-20-9	Nafión 5 wt %	
7632-00-0	Nitrito de sodio	
37682-29-4	Nitrofeniloctiléter	NPOE
7727-54-0	Persulfato de amonio	APS
34725-61-6	Sal de sodio de azul de bromofenol	
13590-82-4	Sulfato de cerio	
7783-20-2	Sulfato de amonio	
78-10-4	Tetraetoxisilano	TEOS
126-73-8	Tributilfosfato	TBP
121-44-8	Trietilamina	
2996-92-1	Trimetoxifenilsilano	PTMOS
77-86-1	Tris-(hidroximetil)-aminometano	Tris base

Tabla 2.2 *Relación de disolventes empleados en esta Tesis Doctoral.*

No CAS	Disolventes	Abreviatura
67-63-0	2-Propanol	
67-64-1	Acetona	
142214-04-8	Diclorometano	
2679-89-2	Dietiléter	
67-68-5	Dimetilsulfóxido	DMSO
64-17-5	Etanol	EtOH
110-54-3	Hexano	
67-56-1	Metanol	MeOH
108-88-3	Tolueno	

Tabla 2.3 Relación de gases empleados en esta Tesis Doctoral.

No CAS	Gases
7783-06-4	Ácido sulfhídrico
7664-41-7	Amoniac
124-38-9	Dióxido de carbono
7727-37-9	Nitrógeno

Se han preparado disoluciones tampón fosfato de pH comprendidos entre 4 y 10 de concentración 0.1 M por dilución a partir de dos disoluciones madre de la misma concentración de monohidrógenofosfato de potasio y dihidrógenofosfato de potasio ajustando con disoluciones diluidas de ácido clorhídrico e hidróxido de sodio.

Se preparó una disolución de carbonato de sodio de concentración 1 M para el lavado de hilos y telas previo a la retención del indicador y se disolvió en disolución acuosa de base Trizma para preparar una disolución tampón de pH 9.5 para realizar un primer lavado de las telas con indicador covalentemente unido.

Como espesante de las tintas se preparó una disolución de 20 g de etilcelulosa en 100 mL de etanol. Una vez se logró formar una disolución homogénea se adicionaron 5 mL de TBP.

1.2 Instrumentos y equipos

Los instrumentos y equipos empleados durante la realización de esta Tesis Doctoral se recogen a continuación:

- Espectrómetro de matriz de diodos Agilent modelo 8453 (Connecticut, EE.UU.) conectado mediante la interfaz InfiniBand HP a un ordenador con procesador Pentium MMX 200 con una memoria RAM de 64 Mb, sistema operativo Windows 95, y disco duro de 4,3 Gb
- Espectrómetro Varian Direct Drive 400 MHz de la casa comercial Varian Medical Systems Iberica S.L. (Madrid, España)

- Espectrómetro Waters LCT Premier XE de la casa comercial Waters (Massachusetts, EE.UU.)
- Teléfono móvil Samsung Galaxy S4 Zoom con la aplicación Open Camera (Seúl, Corea del Sur)
- Teléfono inteligente Samsung Galaxy S7 de la casa comercial Samsung (Seúl, Corea del Sur)
- Balanza analítica de precisión modelo DV215CD con una precisión de 0.1 mg de la casa comercial Ohaus (Nueva Jersey, EE.UU.)
- Balanza analítica modelo BWL51 de la casa comercial Boeco (Hamburgo, Alemania)
- pHmetro Crimson micropH 2000 de la casa comercial Hach Lange España (Barcelona, España)
- Cámara de fotos Sony DSC-HX300 de la casa comercial Sony (Tokio, Japón) con zoom óptico de 50x y sensor CMOS Exmor R® de 20.4 megapíxeles

1.3 Aparatos de laboratorio

- Ultrasonidos Ultrasons HD con sistema calefactor de la casa comercial JP Selecta S.A. (Barcelona, España)
- Vortex V2H de la casa comercial Boeco (Hamburgo, Alemania)
- Estufa ULM500 Memmert (Schwabach, Alemania)
- Frigorífico LKexv 3600 MedLine de la casa comercial Liebherr Iberica, S.L. (Madrid, España)
- Bomba peristáltica Minipuls 3 de la casa comercial Gilson (Berlín, Alemania)

- Cortadora láser de CO₂ Rayjet 50 de la casa comercial Trotec Laser (Trotec, Austria)
- Osciloscopio de señal mezclada MSO4101 de la casa comercial Tektronix (Oregón, EE.UU.)
- Multímetro Digital 8 1/2-bit 3158A de Agilent Technologies (California, EE.UU.)
- Generador de Formas de Onda de 15 MHz modelo 33120A de Agilent Technologies (California, EE.UU.)
- Fuente de alimentación DC modelo E3630A de Agilent Technologies
- Fresadora mecánica modelo ProtoMat S100 de la casa comercial LPKF Laser & Electronics AG (Garbsen, Alemania)
- Microcontrolador Altium Designer 19.1.7 de la casa comercial Altium Limited (Nueva Gales del Sur, Australia)
- Impresora 3D de escritorio Witbox 2 de la casa comercial BQ (Madrid, España) que emplea filamentos de poliuretano negro y filamentos de ácido poliláctico de diámetro 1.75mm de la casa comercial Filaflex.
- Impresora 3D Form 3+ de la casa comercial Formlabs (Berlín, Alemania)
- Microondas Start Milestone de la casa comercial Gomensoro S.A. Instrumentación Científica (Madrid, España)
- Bomba de jeringa Model 11 de Harvard Apparatus (Massachusetts, EE.UU.)
- Máquina de serigrafía semiautomática MSM-004V de la casa comercial Croma Ibérica SL (Girona, España)
- Pantallas de serigrafía de 120 hilos de nylon por centímetro (T·cm⁻¹)
- Regulador de flujo másico controlado por ordenador de Iberfluid Instruments (Madrid, España)

- Cámara climática VCL4006 de Vötsch Industrietechnik (Oberhausen, Alemania)
- Caja de luz con dos tiras de luz LED (50 LEDs cada una, de 550 lúmenes, temperatura del color 5600 K) de la casa comercial PULUZ (China)
- Estación Milli-Q Milli-RO 12 plus de la casa comercial Millipore (Bedford, MA, EE.UU.)
- Plotter de corte X-Y de la casa comercial Secabo GmbH (Wolnzach, Alemania)
- Sistema corona de la casa comercial Tantec (Chicago, EE.UU.)
- Equipo de spin coating modelo WS-400BZ-6NPP/LITE (REV. MS) de la casa comercial Laurell Technologies Corporation (Gales, Reino Unido)
- Fuente de alimentación modelo E3616A de la casa comercial Hewlett Packard (Madrid, España)
- Secador modelo SP-213 220-240V~/50Hz/2000W de la casa comercial Ansonic (Nanjing, China)
- Laminadora térmica de 420 W modelo LM-320 de la casa comercial PrideMatik (Barcelona, España)
- Mezclador de gases de Iberfluid Instruments S.A. (Madrid, España)

1.4 Materiales de laboratorio

- Hilo de algodón blanco de calibre 12 y NTex 94 de Finca Presencia Hiladuras S.A. (España)
- Telas de la casa comercial telas.es:
 - Jersey algodón blanco (95% algodón 5% licra, 195 g/m², No 205_10007_012)
 - Sarga blanca (100% algodón, 240 g/m², No 81_2888_050)
 - Poliéster blanco (100% poliéster, 148g/m², No 81_2795_050)

- Poliéster blanco (100% poliéster, 146g/m², No 63_5350_02)
- Piqué tipo gofre – blanco (100% algodón, 235.00 g/m², No 81_02903_050)
- Puños blancos (93% algodón 7% elastán, 270 g/m², No 37_1033_001)
- Sudadera blanca (94% algodón 6% elastán, 245 g/m², No 81_2188_050)
- Suéter blanco (100% algodón, 300 g/m², No 37_1035_001)
- Muselina/doble arruga blanca (100% algodón, 135 g/m², No 81_3001_050)
- Franela de algodón (100% algodón, 165 g/m², No 4_panbrush_10)
- Corduroy fino blanco (100% algodón, 166 g/m², No 81_9471_051)
- Papeles de la casa comercial Filter Lab (Barcelona, España):
 - Papel de filtro (ref. 1420, peso base 80 g/m², espesor 170 μm, retención 14-18 μm)
 - Papel filtro de análisis cuantitativo 1246 de filtración muy lenta, gramaje 100 gr/m², espesor 0.200 mm, porcentaje de cenizas inferior al 0.01% y tamaño de poro 1-3 μm
 - Papel filtro de análisis cuantitativo 1240 de filtración media, gramaje 80 gr/m², espesor 0.170 mm, porcentaje de cenizas inferior al 0.01% y tamaño de poro 14-18 μm
 - Papel filtro de análisis cuantitativo 1242 de filtración medio-lenta, gramaje 80 gr/m², espesor 0.170 mm, porcentaje de cenizas inferior al 0.01% y tamaño de poro 7-9 μm
 - Papel filtro de análisis cuantitativo 1238 de filtración rápida, gramaje 80 gr/m², espesor 0.180 mm, porcentaje de cenizas inferior al 0.01% y tamaño de poro 20-25 μm
 - Papel filtro de análisis cuantitativo 1244 de filtración lenta, gramaje 80 gr/m², espesor 0.160 mm, porcentaje de cenizas inferior al 0.01% y tamaño de poro 2-4 μm

- Papel filtro de análisis cualitativo bajo en cenizas 1248 de filtración rápida, gramaje 80 gr/m², espesor 0.180 mm, porcentaje de cenizas inferior al 0.06% y tamaño de poro 25-30 μm
- Papel filtro de análisis cualitativo bajo en cenizas 1249 de filtración muy rápida, gramaje 80 gr/m², espesor 0.210 mm, porcentaje de cenizas inferior al 0.06% y tamaño de poro 25-30 μm
- Papel filtro de análisis cualitativo bajo en cenizas 1254 de filtración lenta, gramaje 80 gr/m², espesor 0.150 mm, porcentaje de cenizas inferior al 0.06% y tamaño de poro 2-4 μm
 - Papel Whatman grado 1, de 180 μm de grosor, porcentaje de cenizas inferior al 0.06% y tamaño de poro de 11 μm (Cat N°: 1001-824) de la casa comercial Whatman (Inglaterra, Reino Unido)
 - Película de acetato de celulosa de 0.5 mm de espesor y densidad 1.3 g/cm³, de la casa comercial Goodfellow (Londres, Reino Unido)
 - Papel MF1 Cat N°. 8122-2250 de la casa comercial Whatman (Buckinghamshire, Reino Unido)
 - Papel LF1 Cat N°. 8121-1750 de la casa comercial Whatman (Buckinghamshire, Reino Unido)
 - Membrana de transferencia de nailon Nytran SPC de 0.45 μm Cat N°. 10416294 de la casa comercial Whatman (Buckinghamshire, Reino Unido)
 - Politereftalato de Etileno (PET) de espesor 0.25 mm orientado biaxialmente de la casa comercial Goodfellow (Buckinghamshire, Reino Unido)
 - Politereftalato de Etileno (PET) de espesor 0.125 mm orientado biaxialmente de la casa comercial Goodfellow (Buckinghamshire, Reino Unido)
 - Kapton de espesor 250 μm de la casa comercial DuPont (París, Francia)

- Ácido poliláctico (PLA) 100% de colores negro, blanco y rojo de la casa comercial BQ (Madrid, España)
- Placas de aluminio de cromatografía fina con una matriz de gel de sílice 60 modelo F245 de la casa comercial Merck (Nueva Jersey, EE.UU.)
- Picnómetro Gay-Lussac de 10 mL calibrado de Boro 3.3 de la casa comercial Pobel (Bryne, Noruega)
- Calibre digital de acero inoxidable de 150 mm de precisión 0.01 mm casa comercial Laste inc. (Madrid, España)
- Lámpara UV modelo VL-6.LC de la casa comercial Vilber Lourmat (Collégien, France)
- Cinta adhesiva de doble cara de Miarco (Valencia, España)
- Tintas de plastisol de colores ultramarino (1575), rojo brillante (5254), amarillo limón (5152) y negro (5051) de la casa comercial Marancolor (Madrid, España)
- Tinta textil ecológica de base acuosa Serie A-1002 Base Mezcla de la casa comercial Tiser (Madrid, España)
- Laca textil de base acuosa Serie L-2002 Base Mezcla de la casa comercial Tiser (Madrid, España)
- Plastex opaque White DK01 de la casa comercial SunChemical (Nueva Jersey, EE.UU.)
- Emulsión de serigrafía VARIOCOAT 10019 Violet de la casa comercial Marancolor (Madrid, España)
- Limpiatintas Varioclean S 4306 de la casa comercial Marancolor (Madrid, España)
- Desengrasante Varioprep 3002 de la casa comercial Marancolor (Madrid, España)
- Pantallas de serigrafía de entre 32 y 120 hilos con marcos de madera o aluminio de la casa comercial Marancolor (Madrid, España)

- Limpiadora de agua a presión modelo K2.120 de la casa comercial Karcher (Winnenden, Alemania)
- Soporte de gelificación Mini-Protean modelo 1658050 de la casa comercial Bio-Rad con cristales espaciadores de 0.75, 1.0 y 1.5 mm (California, EE.UU)
- Material superabsorbente de marca registrada Flexicel (Barcelona, España)
- Material volumétrico (matraces aforados y Erlenmeyer, vasos de precipitado, probetas, etc.) de la casa comercial Afora (Salamanca, España)
- Juego de pipetas para volúmenes comprendidos entre 0.5 μ L y 10 mL modelo Nichipet EX II de la casa comercial Nichiryō (Tokio, Japón)

1.4 Software empleado

Para la obtención y el procesamiento de datos se emplearon los softwares proporcionados por las casas comerciales de los instrumentos y equipos anteriormente citados (ChemStation UV-Vis para el espectrofotómetro UV-Vis, Rayjet Commander para la cortadora láser, el software de fuente abierta Cura para controlar los parámetros de la impresora 3D de filamento y el software FlowView versión 1.23 de Bronkhorst High-Tech B.V. para el mezclador de gases) y softwares libres para el procesamiento de vídeos e imágenes (Avidemux para la extracción de fotogramas de vídeos e ImageJ para el análisis de imágenes).

Para programar el software incorporado del microcontrolador se empleó el programa MPLAB X IDE v5.40 de la casa comercial Microchip Technology Inc. (Arizona, EE.UU.).

Los diseños 3D para la impresora 3D Form 3+ se realizaron con el programa SketchUp 2020 y los aplicados en la cortadora láser con Adobe Illustrator CC 2014.

Además, tanto para la pulsera de medida de pH a tiempo real como para la medida de los códigos sensores fue necesario el desarrollo de aplicaciones de Android™. Estas se llevaron a cabo con el programa Android Studio 4.2.2 y se testaron frente a API 26, siendo compatibles con versiones previas de Android también.

2. Desarrollo de sensores

El desarrollo de sensores consta de una serie de etapas que garantizan que el dispositivo obtenido es capaz de cumplir con su función de manera adecuada y durante las cuales se suele procurar aplicar los principios de la química verde [185].

2.1 Diseño

2.1.1 Consideraciones previas

Antes de que se construya el prototipo del sensor es necesario definir o tener al menos una idea aproximada de una serie de aspectos del dispositivo final como son [186]:

- El usuario final del sensor y el ambiente en el que este va a ser empleado. A veces se pretende que el usuario sea el propio paciente, como en el caso de los glucómetros que emplean las personas con diabetes, siendo probable que este no tenga entrenamiento en este tipo de análisis. Sin embargo, en otros casos, el usuario final será un médico o técnico sanitario con cierta experiencia en su uso. Esto son factores a tener en cuenta a la hora de plantear el sensor. Además, en ocasiones se han diseñado dispositivos con la intención de ser usados en países en vías de desarrollo sin tener un conocimiento suficiente de los recursos médicos disponibles en ese país [187]. Por lo que definir quién lo va a usar y dónde y entender sus potencialidades y limitaciones es clave para mejorar la viabilidad y un manejo adecuado del sensor, repercutiendo en la fiabilidad del ensayo analítico.

- La operación del usuario. Hay muchos pasos incorporados en la operación de usuario que se suelen pasar por alto. En este apartado se distingue entre la recolección de la muestra, su procesado, la operación del dispositivo, la detección y la lectura o interpretación.

- Recolección de muestra. La variabilidad en el tipo de matrices de muestra es enorme en el campo de los sensores. Hay dispositivos diseñados para trabajar con fluidos biológicos (como puede ser el caso de la sangre, la orina o la saliva), muestras medioambientales (como tierras o aguas) o muestras de medicamentos o alimentos. Como es lógico, el nivel de dificultad para obtener la muestra varía considerablemente dependiendo de cada caso y determina también el volumen de muestra disponible, un

aspecto clave en el diseño del dispositivo. Conforme el desarrollo del sensor avanza, se debe considerar el método de deposición de la muestra, si se precisa un aplicador y, por supuesto, será necesario ser coherente, no puede suponerse que un paciente será capaz de extraer muestras complejas (por ejemplo, la sangre procedente de venopunción [188]), por lo que esta etapa es crucial también a la hora de determinar quién es el usuario final del dispositivo. También es preciso tener en cuenta el material auxiliar que pueda necesitarse para la toma de muestra y cómo influye en el dispositivo final, en su portabilidad y facilidad de uso.

- Procesado de muestra. Algunas pruebas requieren que la muestra sea tratada antes de ser aplicada a un dispositivo. Las etapas de este tratamiento se suelen llevar a cabo en un tubo, fuera del sensor como tal. Algunos ejemplos de estos procesos son la centrifugación para separar el plasma de las células sanguíneas [189], la lisis de células [190] o el enriquecimiento bacteriano [191]. Cuantos más pasos haya entre la recolección de la muestra y su adición al dispositivo, aumenta el error potencial del usuario y con ello, la posibilidad de que el dispositivo falle. Es por ello que se debe procurar siempre el mínimo procesado posible y que en caso de que la muestra lo requiera, que esté bien automatizado e incluido dentro del propio dispositivo para reducir la posibilidad de error [9].

- Operación del dispositivo. La operación del dispositivo incluye los pasos que van desde que se adiciona la muestra hasta que el sensor devuelve un resultado de salida. Idealmente, según la guía de la FDA, los errores que puedan causar daños o degradar el tratamiento médico se deben eliminar o reducir en la mayor extensión posible [192], por lo que, al igual que ocurre con la etapa anterior, se procurará que no haya pasos adicionales a realizar por el usuario avanzando hacia la automatización y la integración para aquellos tests que requieran múltiples pasos [193]. Cada vez se están introduciendo más sistemas de control de flujo que permiten controlar tiempos de incubación y favorecer el avance de fluido en unos canales frente a otros. En el caso de ser imprescindible la implementación de etapas extra por parte del usuario final, se incluirán instrucciones claras que minimicen los errores. Si se emplea como lector una cámara de móvil serán necesarias también instrucciones claras acerca de las condiciones necesarias para tomar la imagen [194] y/o se incluirá una unidad de alojamiento del

dispositivo que solo permita la entrada del dispositivo microfluídico con la orientación adecuada. Además, lo ideal sería que la aplicación de procesamiento de la imagen pueda corregir desalineamientos o variaciones en la iluminación.

- Detección y lectura/interpretación. A pesar de que son dos pasos distintos merece la pena discutirlos juntos. Es aconsejable que el módulo de visualización presente los resultados directamente al usuario sin necesidad de interpretación adicional y en el menor tiempo posible. Esta interfaz puede establecer cuando la lectura se realiza a simple vista o con asistencia de un lector externo. La principal desventaja de la detección colorimétrica a simple vista es que hay una gran tendencia a que se vea sesgada por el usuario o las condiciones ambientales en las que se está observando. Para la detección colorimétrica cada vez hay más lectores externos e incluso los teléfonos móviles pueden servir para eliminar ese sesgo y lograr una buena cuantificación del analito de interés, especialmente si van acompañados de las unidades de alojamiento del dispositivo microfluídico previamente mentados [45].

- Pruebas *in-situ* para la evaluación de la utilidad. Las pruebas reales son un método excelente de evaluar la utilidad de un sensor y es una parte esencial en el desarrollo de dispositivos POC comerciales, aunque en algunas ocasiones aún se omiten en las publicaciones académicas. Cuando sea posible será conveniente plantear estrategias para probar en situaciones reales la utilidad de los sensores desarrollados.

Una vez llevada a cabo esta evaluación previa se seleccionan los materiales que mejor concuerden con la aplicación deseada, teniendo en cuenta que no deben dar interferencias y deben poseer las propiedades mecánicas necesarias para soportar el análisis.

2.1.2 Selección de materiales

Algunos criterios a la hora de seleccionar el soporte para la química de reconocimiento son los siguientes:

Los materiales que se emplean en los sensores pueden tener un rol activo o pasivo. Los materiales pasivos serían aquellos que se usan como soporte y para establecer conexiones entre las diferentes partes del sistema mientras que los activos son los que

intervienen directamente en el proceso de reconocimiento. En el caso de los materiales pasivos serán de especial interés aspectos como la resistencia mecánica, que se le pueda dar la forma deseada sin problemas, un bajo coste y la disponibilidad del material. Sin embargo, en el caso de los materiales activos, el material elegido deberá tener unas características más concretas para ser seleccionado.

La selección de material es crucial y requiere tener en cuenta múltiples factores. No hay un único material ideal para los análisis, las características que resultan beneficiosas en ciertos casos pueden ser perjudiciales en otros por lo que hay que realizar una selección cuidadosa y adaptada a cada caso. Sin embargo, hay una tendencia generalizada hacia la búsqueda de materiales biodegradables y poco contaminantes para la fabricación de sensores, de acuerdo con los 12 principios de la química verde enunciados por Graluszka [185,195]. Es por ello que, entre los materiales más usados, se encuentran papel, hilo y tela debido a su abundancia, biodegradabilidad, la posibilidad de movimiento de fluidos por capilaridad sin necesidad de un sistema externo de bombeo y con volúmenes de muestra muy reducidos [196–199].

En el caso de papeles, hilos y telas sería aconsejable tener en cuenta [200]:

- **Color/Opacidad.** La opacidad es una propiedad que describe cuanta luz se trasmite a través del material. En cuanto al color, para lograr el color blanco, que es especialmente adecuado para que resalten variaciones de color de los indicadores, es necesario realizar ciertos tratamientos. En el caso del papel, durante el proceso de fabricación de la pasta de papel, toda la lignina se elimina de la celulosa, haciendo que el papel se vuelva blanco. Y en el caso de telas e hilos, se suele recurrir a un proceso de blanqueo con peróxido de hidrógeno, hipoclorito de sodio o clorito de sodio [201].

- **Tamaño de poro y tamaño de retención de partículas.** El tamaño de poro se relaciona con la retención del líquido en sustratos microfluídicos como el papel, el hilo o la tela. Un tamaño de poro grande permite que el fluido se mueva más rápidamente que el tamaño de poro normal. Los diferentes tamaños de poro son lo que diferencia algunos grados de papel como el Whatman 1 y el Whatman 2.

- **Espesor.** El espesor del material poroso también desempeña un papel importante en la fabricación de dispositivos microfluídicos ya que del volumen de los poros de este

depende la cantidad de muestra necesaria para realizar con éxito la prueba. Si el espesor es alto, se requieren grandes cantidades de muestra para saturar el material de fluido y si es baja, en el caso de papeles, se volverán más frágiles debido al mojado que los que son más gruesos.

- Porosidad. La porosidad es el porcentaje de espacios vacíos presentes en un sustrato. Depende de la forma de partícula, grado de empaquetamiento y ordenación, no así del tamaño de partícula. Si los espacios huecos son más grandes, la velocidad de avance del flujo de fluido es más alta.

- Capacidad de mojado o humectabilidad. La humectabilidad es una medida de la cantidad de agua que recoge el material. Diferentes tipos de tela, hilo o papel tienen diferentes humectabilidades dependiendo de los grupos funcionales que presenten, los tratamientos a los que hayan sido sometidos durante su fabricación, etc.

- Compatibilidad química. El papel es un sustrato emergente cuyo análisis estructural es muy difícil. Es muy importante asegurar que la estructura de poros del papel o la superficie son coherentes con los componentes químicos o biológicos que se desean retener. La temperatura, el tiempo de flujo laminar y la concentración de la muestra juegan un rol crucial en la compatibilidad química.

- Tasa de flujo volumétrico. La velocidad a la que un líquido viaja desde el origen del sensor hasta la línea final puede definirse en torno a la tasa de flujo volumétrico, que es el volumen de fluido que atraviesa una sección de papel, hilo o tela en una unidad de tiempo. El flujo de líquido en el papel puede ser menor o mayor debido a su tamaño de poro o tamaño de retención de partícula.

2.2 Técnicas de preparación de dispositivos microfluídicos

Una vez seleccionado el material a usar es necesario dar forma a la plataforma microfluídica, añadiendo una o varias zonas de detección y adaptando el diseño al problema analítico.

2.2.1 Corte y grabado láser

Tratar con láser la superficie de un material hidrofóbico puede dar lugar a la creación de canales de profundidad determinada. El proceso emplea una cortadora láser de CO₂ que puede cortar o grabar sobre todo tipo de sustratos. Los trazos realizados pueden hacerse con muy buena precisión tanto para líneas rectas como curvas y a diferentes profundidades, lo cual permite una gran variabilidad de diseños y tamaños.

Este método presenta como ventaja una gran reproducibilidad y rapidez a la hora de manufacturar los dispositivos microfluídicos, sin embargo, en el caso del papel en los bordes queda un residuo de cenizas que es necesario eliminar puesto que modifican el flujo de los fluidos y acidifican el medio.

El proceso de lavado de los μ PADs que han sido cortados con la cortadora láser consiste en poner en agitación durante 1 hora los papeles en una mezcla de agua: etanol (50:50) y posteriormente dejarlos secar a temperatura ambiente sobre una superficie plana, evitando en la medida de lo posible que queden arqueados o doblados, de manera que no se formen canales de paso preferentes debido a esta etapa de fabricación del dispositivo.



Figura 2.1 Cortadora láser Rayjet cortando vinilo blanco.

En el caso de materiales plásticos es muy importante elegir correctamente el material. Plásticos de poco espesor como el mylar o el PET son muy difíciles de grabar puesto que

tienden a fundirse a temperaturas relativamente bajas, sin embargo, materiales como el vinilo o metacrilato sí pueden grabarse con buena precisión, pero presentan rugosidad en la superficie grabada, lo cual puede afectar a la retención de ciertos compuestos.

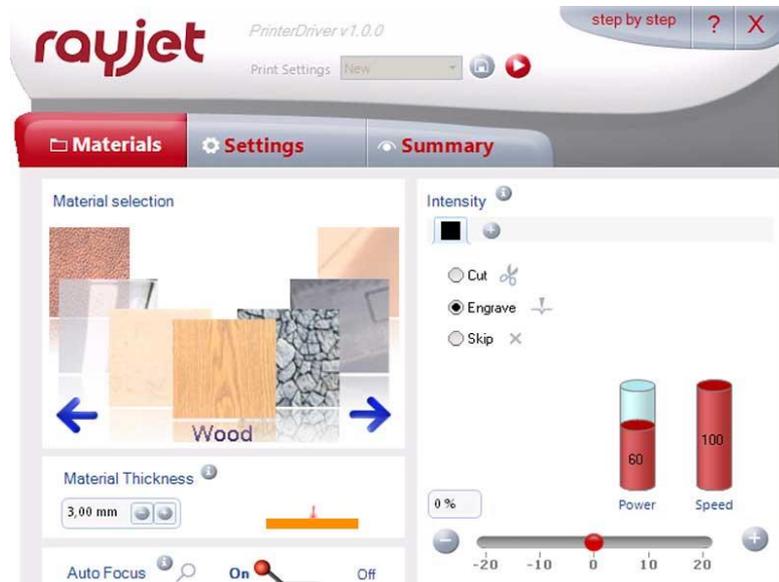


Figura 2.2 Software de configuración de parámetros de grabado y corte en Rayjet Commander.

Los parámetros que controlar cuando se graba o corta un material empleando una cortadora láser son los siguientes:

- Espesor y material de la pieza a cortar. Ayuda a fijar a qué distancia de la lente se debe dirigir el láser para cortar en toda la profundidad de la pieza o grabar tan solo en las capas más superficiales.
- Velocidad del haz. Cuanto mayor es la velocidad, menor capacidad de penetración del haz de CO₂ y menor probabilidad de que la pieza se sobrecaliente y acabe fundiéndose o quemándose.
- Potencia del haz. Cuanto mayor potencia, la capacidad de penetración en el material y el calentamiento generado en el material aumentan.

2.2.2 Corte con plotter

Un plotter de corte es una máquina que dispone de una cuchilla y puede modular la velocidad y profundidad con la que esta corta materiales de diverso grosor, que van desde el papel hasta maderas delgadas.



Figura 2.3 Plotter de corte X-Y de la casa comercial Secabo GmbH.

Entre los parámetros que son necesarios fijar para un buen corte se encuentran:

- La fuerza de corte. Es la potencia con la que trabaja en cada momento el plotter. Dependerá de la dureza y espesor del material al cortar. Antes de comenzar a hacer los cortes que se precisan para la elaboración del sensor es preciso hacer una prueba con el material y la fuerza de corte seleccionada a fin de comprobar que es capaz de atravesarlo sin dañar la malla protectora que se coloca debajo.
- La velocidad. Al aumentar la velocidad se reduce el tiempo de fabricación de los sensores, pero aumenta la probabilidad de que los cortes no sean lo suficientemente profundos.
- La cuchilla. Existen diferentes tipos de cuchillas, con diferentes ángulos y se pueden afilar conforme se van desgastando por el uso, otro factor por el que es importante la calibración previa a realizar los cortes definitivos.

El plotter de corte es mejor con trazos rectos que curvos, ya que, en estos últimos, dependiendo de lo delgado que sea el material y del diseño que se esté intentando aplicar, puede rasgarse con facilidad.

2.2.3 Laminado

El laminado emplea una lámina previamente hecha o extruida adherida a otro sustrato, generalmente de forma térmica o química. No suele requerir curado y permite el uso de varias capas, bien del mismo material o de diferentes [202].

Debido a la falta de resistencia mecánica del papel, los sustratos de este material se usan normalmente unidos a una cubierta trasera de polímero. Un ejemplo sería la cubierta de poliéster o la cinta adhesiva de protección, ambas aportan suficiente resistencia mecánica.

Proteger los sustratos de papel, hilo o tela entre películas de polímero es un procedimiento sencillo que permite un mejor manejo del dispositivo y la protección de los materiales internos frente a daños ambientales. Otro aspecto de protección importante es que evita la evaporación de fluido (permitiendo un mayor avance del fluido y mayores tiempos de incubación), la desactivación de reactivos o la contaminación ambiental.

Además, las láminas de polímero pueden jugar un rol esencial en la funcionalidad del dispositivo. Por ejemplo, en un sensor piezorresistivo la laminación puede mantener las partes del dispositivo en su lugar manteniendo estable la señal de salida del sensor. Debido a su fácil diseño estas aproximaciones son candidatos populares para modelar dispositivos microfluídicos.

Hay dos métodos fundamentales de conjugar sustratos porosos con polímeros: 1) Cubrir uno de los lados del medio poroso con cinta adhesiva seguido del corte que le da forma y 2) Darle forma primero al medio poroso y luego aplicar capas de polímero tanto en la cara superior como la inferior del medio. Esta última aproximación marca la primera aparición de los dispositivos de papel completamente laminados, que minimiza la evaporación del líquido, mejora la protección y reduce la necesidad de empaquetado [203].

La idea del laminado de dispositivos de papel con láminas de polímero lo propuso por primera vez Cassano et al. en 2013 [73]. Después del diseño y de darle forma al sustrato de papel, se usaron películas de poliéster para laminar las piezas de papel haciéndolas pasar por rodillos calentados a 104°C. Ya que el proceso de calentamiento puede dañar

los reactivos que sean sensibles al calor, como es el caso de enzimas, estos reactivos deben ser aplicados al dispositivo después de la laminación. Además, se observó que el flujo se reduce si ha habido laminación debido a la compresión del sustrato de papel durante el proceso, donde la compresión depende del espacio entre los rodillos de la laminadora [203].



Figura 2.4 Laminadora térmica de la casa comercial PrideMatik.

2.2.4 Serigrafía

La serigrafía, también llamada impresión con pantalla, se usa en muchos procesos de producción industrial en los que se requiere depositar películas finas. Es una tecnología de bajo coste y ha sido ampliamente usada para hacer carteles publicitarios, para decorar camisetas o para imprimir cristales en la industria del automóvil, entre otras aplicaciones.

La serigrafía es un proceso de impresión en el que una pantalla (un marco cubierto con tejido de malla) presenta un dibujo o patrón con la información que se desea imprimir. Ese dibujo constituye las zonas abiertas de la pantalla mientras que el resto de la pantalla está constituido con lo que se conoce como zonas cerradas. La tinta se aplica a través de la pantalla empujándola con una rasqueta y recubre el material que se encuentra bajo la pantalla tan solo en las zonas abiertas, transmitiendo el dibujo de la pantalla al sustrato elegido (ver *Fig. 2.5*).

La imagen de la pantalla por lo general se obtiene recubriendo toda la malla de la pantalla con una emulsión sensible a la luz y aplicando luz de forma selectiva solo en aquellas partes de la pantalla que se desean hacer impermeables a la tinta. Las zonas

radiadas se endurecen mientras que las zonas abiertas, en las que no se ha permitido el paso de la luz, se lavan, quedando libres de emulsión. Posteriormente la tinta se transfiere a través de las zonas abiertas de la malla al sustrato empujándola con una rasqueta.

En la práctica hay tres métodos en los que se puede usar la serigrafía:

- Método plano-plano. Tanto el sustrato como la plancha de la pantalla son planos. La tinta se transfiere a través de las aperturas de la malla al sustrato de impresión con los movimientos de la rasqueta.
- Serigrafía sobre superficies curvas. La plancha de la pantalla es plana e imprime sobre el sustrato en un cilindro rotador.
- Método circular-circular. La pantalla, el sustrato y la pieza que presiona la tinta son cilindros que se mueven de forma sincronizada. La tinta se transfiere desde dentro a través de la plancha de impresión cilíndrica hacia el sustrato.

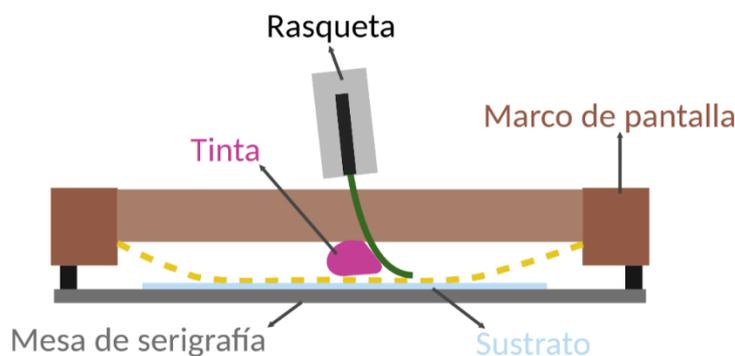


Figura 2.5 Esquema del método plano-plano de serigrafía.

El dibujo de la pantalla juega un rol crucial en la serigrafía. La selección del patrón correcto (ver Fig. 2.6), que debería reproducirse siempre con la misma calidad, es un prerrequisito importante para obtener buenos resultados de serigrafía. Cuando se selecciona un patrón, este debe estar optimizado para el trabajo de impresión. Otros factores relevantes en la calidad de la serigrafía son la elección de la malla de la pantalla, de la emulsión y de la técnica de recubrimiento, el tiempo de exposición y la estructuración del proceso de impresión, los cuales se desarrollarán a continuación.



Figura 2.6 Serigrafiado de un sustrato plano de papel con tinta de plastisol.

Malla de pantalla de serigrafía

Hay una amplia variedad de materiales que pueden fijarse al marco de la pantalla, como, por ejemplo, algodón, seda, nylon, poliésteres de mono y multifilamento o metal. El número de hilos es uno de los parámetros más importantes en la serigrafía, determinante en su calidad. Se mide en hilos por cm. Hay mallas desde los 10 hasta los 200 hilos/cm, aunque los más frecuentemente usados se encuentran comprendidos en el rango de 40 a 120 hilos/cm. Cuanto mayor es la densidad de hilos en la malla, más precisión se logra en la impresión, pero más cuesta que las tintas espesas la atraviesen.

Además, la calidad del tejido también está determinada por el grosor de los hilos empleados. Este aspecto se suele indicar con un máximo de 4 grosores, que van desde “ligeros” a “pesados”. Estas medidas y el espesor del dibujo en la emulsión influyen la cantidad de tinta que se transfiere a través de la pantalla por lo que resultan muy relevantes.

Una mala coordinación entre la resolución de la pantalla y el espesor de la capa de tinta que la traspasa da como resultado defectos del tipo moiré. El material elegido para la impresión con pantalla debe ser tan fuerte como sea posible para evitar que se raje cuando se estire, ser dimensionalmente estable y no afectarse por la humedad o los

compuestos de uso común en la serigrafía. Además, los materiales deberían ser inertes e inmunes a los químicos que se van a emplear en ella.

Los monofilamentos y los multifilamentos son dos categorías básicas en la elección de pantalla de serigrafía.

Los tejidos multifilamentos consisten en múltiples hebras retorcidas para formar un único hilo. Hilos que posteriormente se tejen juntos para formar la malla de la pantalla. Los tejidos de este tipo que se usan para aplicaciones de serigrafía son la seda y el poliéster.

Las sedas son las fibras naturales más fuertes. Sin embargo, los hilos de seda pueden ensancharse con el uso y eso puede provocar aperturas irregulares en la malla y distorsionar la imagen de la impresión por lo que este material solo será adecuado para procesos de impresión que no requieran detalles finos. La seda ha sido progresivamente reemplazada por el poliéster, debido principalmente a la dificultad para limpiarla tras la impresión. Estas dificultades son consecuencia de la estructura superficial rugosa de la seda, que hace que las partículas de tinta se queden atrapadas en las hebras.

Las mallas de multifilamento de poliéster tienen unas aperturas de malla mucho más uniformes y no se expanden tanto como la seda durante el proceso de impresión. Otro factor importante en el reemplazo de la seda por el poliéster es que este no se ve afectado por los productos químicos normalmente empleados en serigrafía. Incluso así, el poliéster de multifilamento está lejos de ser la solución perfecta ya que sus fibras tienden a aflojarse más en las intersecciones de hilos que las fibras de monofilamento, lo cual provoca aperturas en la malla que se perciben en las impresiones como bordes difusos de la imagen.

Cuando se comparan tejidos de monofilamento y de multifilamento, los segundos tienen una superficie mucho más rugosa y espesa. Estos tejidos son ideales para pintar grandes posters, textiles y superficies con textura o contorno, en todos los casos en los que se requiere depositar una tinta pesada.

La estructura de una superficie suave es característica de los tejidos de monofilamento, que producen aperturas uniformes de la malla. Los tejidos de monofilamento más comunes son el poliéster, nylon, los hilos de metal y el poliéster metalizado.

El nylon de monofilamento tiene unas características de constitución similares al poliéster de monofilamento con la excepción de la estabilidad, siendo una fibra muy elástica. El nylon es una elección adecuada para imprimir formas irregulares o con contorno. Sin embargo, la elasticidad es una característica indeseable cuando se requiere una precisión crítica. Cuando se emplean fibras de nylon, los principales factores que influyen en el registro multicolor son la temperatura y la humedad.

La malla de cable por su parte se emplea habitualmente con tintas muy abrasivas o para impresión de cerámicas extremadamente afiladas, cuando se requiere depositar una capa de tinta espesa y para impresión de circuitos. La malla de cable es extremadamente estable y puede reutilizarse muchas veces.

La malla metálica es un nuevo tipo de tejido. Tiene la composición de una fibra sintética de monofilamento (nylon o poliéster) recubierta con una capa extremadamente fina de metal. En esta combinación la malla de nylon o poliéster metalizado tiene las ventajas del cable y los tejidos sintéticos de un único filamento. Limpiar una pantalla que tiene recubrimiento metálico es mucho más fácil que limpiar fibras sintéticas. La malla metalizada tiene muy buena estabilidad dimensional y puede usarse para muchas pasadas en las que se requiere una buena precisión.

La decisión del tejido de la pantalla es una decisión muy importante. Algunas pautas que ayudan en serigrafía a elegir correctamente el tejido de la malla son las siguientes:

- El área de malla abierta es el área entre hilos y permite el paso de la tinta. Esto implica que en caso de que se requiera una mayor cantidad de tinta, se debe usar un mayor porcentaje de área de malla abierta.
- El tamaño promedio del pigmento está correlacionado con la apertura de malla. La apertura de malla debe ser al menos tres veces mayor o la pantalla se quedará atascada durante el proceso de impresión.
- El número de hilos de la malla varía de acuerdo con el diámetro del hilo. Hilos con menor tamaño de diámetro producen mallas más finas.

- Para la reproducción de detalles finos en el diseño, se requiere una malla más fina.

La tensión de pantalla correcta es un parámetro importante para lograr una buena calidad en la impresión. No debe haber una distorsión de la imagen como resultado de la fuerza de cizallamiento aplicada por la rasqueta durante el proceso de impresión ni tampoco la tensión de la pantalla debe alcanzar el límite elástico del material, de lo contrario se dañaría la pantalla. Se debe prestar especial atención a este aspecto cuando se realiza una impresión multicolor o cuando se imprimen circuitos, en los que se requiere una precisión muy buena de la impresión. La tensión de la pantalla depende del material, la cantidad de hilos, la calidad del tejido y el límite elástico que estos aspectos determinan. La carga de la pantalla debe estar entre 0 y 25 N/cm. La tensión que se ha aplicado en la fabricación de la pantalla disminuye dependiendo de la naturaleza del tejido de la pantalla, el estrés al que se somete al imprimir y el paso del tiempo. Por tanto, es posible, en el caso de tejidos sintéticos, por ejemplo, que la tensión caiga hasta un 50% después de múltiples usos, dependiendo del tipo de tecnología de adhesión empleada. Además, los marcos flexibles llevan a una tensión desigual que puede resultar en distorsiones en la imagen.

Marco de pantalla de serigrafía

El principal propósito del marco de la pantalla de serigrafía es asegurar una tensión de malla constante durante los procesos de emulsión e impresión. Para lograrlo, el marco debe tener una cierta rigidez ya que la malla que se va a anclar a él crea una tensión considerable. Además, el marco también está expuesto a las sustancias químicas que se aplican durante los procesos de producción, impresión y limpieza por lo que deberá ser resistente a ellas.

Los materiales más típicamente usados para serigrafía son:

- Madera. Se emplean por su bajo peso, bajo coste y fácil manufactura. Sin embargo, tienen importantes desventajas como que no son muy estables o que no se suelen hacer de dimensiones mayores a los 50 cm en cada lado.

- Metal. Los más usados son el acero y el aluminio. Los marcos metálicos tienen mucha mejor estabilidad que los de madera y son muy importantes cuando se quieren realizar grandes diseños. Tanto el acero como el aluminio presentan ventajas y desventajas. Los marcos de acero ofrecen una mayor rigidez, estabilidad y durabilidad, resistencia a cambios de temperatura y menor precio los de aluminio. Sin embargo, el peso de los marcos de aluminio es casi la mitad de los de acero por lo que para diseños muy grandes se suelen preferir estos últimos. Además, el acero puede corroerse fácilmente mientras que los marcos de aluminio son mucho más resistentes a la corrosión, pero no tanto a químicos básicos o ácidos, que suele ser el caso de los desengrasantes.

Rasqueta de serigrafía

Se puede decir que la rasqueta es uno de los componentes más importantes para la serigrafía. La rasqueta es una hoja de goma o plástico fijada a un mango para la impresión manual o para encajarla en la máquina de serigrafía automática. Si se va a utilizar un número elevado de pasadas, la hoja de la rasqueta se suele componer de materiales sintéticos como el polivinilo y el poliuretano en vez de goma, ya que esta última tiende a perder su eje más rápidamente. La hoja de la rasqueta se emplea para forzar el paso de la tinta a través de la malla de manera que controla el avance de la tinta a través de la pantalla. Presiona la pantalla contra el sustrato adaptando la malla a la superficie de este. Además, elimina el exceso de tinta de la malla. El espesor de tinta en la impresión se puede controlar con la presión que se aplica a la rasqueta. Hay diferentes posibilidades para el borde de las rasquetas dependiendo del formato de las pantallas y los sustratos, pero para el caso de la serigrafía plano sobre plano el más elegido es el borde cuadrado con una dureza intermedia.

Emulsión para serigrafía

Después del proceso de entelado de la pantalla, el tejido debe prepararse para recibir el dibujo. En este proceso, la persona encargada de la impresión debe conocer el trabajo de impresión y las propiedades de la emulsión, como el contenido en sólidos y la viscosidad. Un alto contenido en sólidos permite un valor de rugosidad superficial más

bajo. Un recubrimiento de alta viscosidad es recomendable para mallas más gruesas. Las emulsiones foto para líneas finas deberían tener buena resolución y un alto contenido en sólidos, sin embargo, siguen teniendo que asegurar una exposición adecuada.

La emulsión es un material que reacciona o se endurece al ser expuesto a la luz UV. Las partes que no reciben luz se mantienen blandas.

En el método directo, la emulsión se aplica a ambos lados de la pantalla, primero en el lado de la impresión y luego en el de la rasqueta. Para obtener una buena calidad de dibujo en la emulsión directa son necesarias varias capas de emulsión aplicadas con secado horizontal entremedias. La emulsión normalmente es una mezcla de polivinilacetato y polivinilalcohol y se le añade un colorante para hacer el dibujo visible en la pantalla.

En el método directo-indirecto, una hoja de poliéster se recubre en una cara con la emulsión, normalmente con una mezcla de polivinilalcohol y polivinilacetato, que no es sensible a la luz. La pantalla se coloca encima de esta película con la cara recubierta hacia arriba. Después una emulsión sensible a la luz (la misma que se usa en el método directo) se aplica con la rasqueta en la parte superior de la pantalla. La emulsión sensibiliza a la luz la película que se encuentra por debajo y también se une a la pantalla.

En el método indirecto, la película de gelatina húmeda se coloca, con la emulsión hacia arriba, en contacto con la cara de la impresión de la pantalla.



Figura 2.7 Proceso de emulsión de la pantalla de serigrafía.

Ya se ha explicado que hay muchos factores que influyen en la calidad final de la impresión, pero considerando el dibujo hay dos parámetros especialmente significativos como son la rugosidad de la superficie del dibujo en la cara de la impresión y su perfil o espesor. Con menores rugosidades superficiales el dibujo puede impedir el avance de la tinta alrededor del área de la imagen y la impresión tendrá una buena definición. El perfil o espesor además de la malla de la pantalla, define la cantidad de tinta que se imprime, el conocido como depósito de tinta. Algunas aplicaciones requieren mayores espesores de la capa de tinta y otras se benefician de películas más finas.

Las técnicas de producción de dibujos se pueden dividir en dos grupos más amplios. La preparación directa del dibujo o patrón, en la que los dibujos formados por separado se adhieren al tejido de la pantalla, y se prepara el dibujo directo, en el que el portador de imagen se prepara directamente sobre la pantalla. En la producción de sensores es mucho más común la segunda, que acelera los tiempos de preparación y es más sencilla.

La preparación de los dibujos se puede realizar de tres maneras diferentes:

- Cortándolos. Inicialmente se cortaban a mano, pero actualmente se puede hacer también con un plotter de corte o una cortadora láser. Los primeros se hacían en papel y se adherían a la parte posterior de la pantalla, pero hoy, la mayoría se hacen en películas solubles en agua o en lacas. Estas películas constan de dos capas, la posterior o de soporte, hecha de papel transparente, vinilo o poliéster y la capa de la emulsión. Se corta la emulsión de la capa de soporte y se pega a la pantalla con agua.

- Diseño foto. Es el más comúnmente usado para la serigrafía desde la mitad de los 50. Para formar las zonas que dejan pasar la tinta y las que no se emplea radiación UV selectiva. En el positivo la imagen/áreas de impresión son opacas, absorbiendo la luz UV, pero las zonas de sin impresión son transparentes y permiten que la luz brille a su través y endurezca la emulsión. Después de la exposición a la luz UV las zonas que no se han endurecido con luz (blandas y solubles) se lavan con agua u otro fluido formando la parte abierta del dibujo de la pantalla mientras que las partes endurecidas de la emulsión fotodiseñada forma las áreas no impresas. En el diseño foto indirecto las láminas de transferencia son muy similares a los diseños cortados a mano en cuanto a estructura y procedimiento de aplicación. Consisten en un plástico transparente que se usa como

soporte y en una capa de emulsión fotosensible. Después de la exposición y desarrollo del proceso, la lámina preparada se aplica a la parte trasera de la pantalla con la emulsión hacia arriba. Este tipo de diseño permite la mayor resolución de impresión y definición del dibujo mayoritariamente debido al contacto directo entre el diseño y el sustrato de impresión y la técnica de secado (la capa de plástico transparente impide cualquier forma de contracción de la emulsión durante el secado). En el diseño foto directo, también conocido como emulsión directa, se hacen con emulsión fotográfica líquida aplicada directamente sobre la malla de la pantalla sin ningún tipo de película de sujeción. Esta emulsión se deja secar antes de la etapa de exposición a la luz, durante el que el positivo debe estar en contacto directo con la capa de emulsión aplicada. Después, las áreas que no han sido expuestas a la luz se lavan igual que en proceso indirecto y se deja secar la pantalla.

En el caso de la fabricación de dispositivos la emulsión empleada fue VARIOCOAT 10019 VIOLET, se extendió sobre ambas caras de la pantalla con una regleta procurando que cubra por completo la malla con el espesor mínimo posible, se secó en una estufa a 30°C durante 30 minutos y a continuación se expuso a la luz en una insoladora a través de una película de acetato en la que se han impreso en negro las partes de la pantalla que se desean dejar abiertas al paso de la tinta.



Figura 2.8 Proceso de secado de la emulsión de serigrafía en horno.

Durante la exposición de la pantalla a la luz será preciso tener en cuenta el número de hilos de la malla, cuanto mayor sea este más tiempo se requerirá para garantizar que se ha endurecido bien la emulsión por toda la zona descubierta a la luz. Para las pantallas empleadas en la preparación de los sensores la relación de número de hilos/tiempo es la que aparece en la *Tabla 2.4*:

Tabla 2.4 Relación entre el número de hilos de la malla de serigrafía y el tiempo exposición requerido para la emulsión.

Número de hilos	Tiempo de exposición
150	2'
120	2'20"
90	3'50"
43	4'40"
32	5'30"

Como este tipo de diseño foto no tiene ninguna película de sujeción se produce una cierta contracción durante ese último proceso de secado, que será mayor cuanto mayor sea el contenido líquido de la emulsión. Para eliminar la contracción del diseño y lograr una capa más espesa y homogénea de emulsión, la emulsión se debe aplicar por ambos lados de la pantalla. La ventaja del método directo es que logra diseños más fuertes y duraderos en comparación con el indirecto.

- Sistemas del ordenador a la pantalla. Las zonas de impresión y no impresión de la pantalla se definen directamente usando un ordenador. Los diseños así producidos son duraderos y tienen una alta resolución de impresión de imagen. No hay película positiva en el proceso de preparación del diseño por lo que se requiere un menor tiempo de exposición y no hay distorsión de imagen ya que se elimina rebajando el diseño. Los sistemas de inyección de tinta, basados en la técnica piezo convencional de impresión piezoeléctrica, crean una imagen recubierta directamente sobre la pantalla previamente recubierta con una emulsión fotosensible [204,205].

Recuperación de pantallas

Una vez finalizado el estampado del sustrato deseado se hace necesario retirar los restos de tinta de la malla de la pantalla con un estropajo húmedo y jabón. Resulta esencial durante la manipulación de la pantalla, especialmente durante su lavado, pero también en el resto de etapas, evitar el contacto directo de la piel con la malla de serigrafía, sujetando siempre la pantalla por el marco y con guantes, puesto que la malla es muy sensible y puede rajarse.

Deberán darse pasadas suaves con la parte blanda del estropajo por el mismo motivo, siempre manteniendo la malla húmeda.

Una vez retirada la parte más gruesa de los restos de tinta, se debe aplicar un limpiatintas que sea compatible con la tinta que se haya empleado para la serigrafía y frotar con un cepillo para extraer los restos de tinta que hayan quedado ocluidos en los espacios entre hilos. Además, el limpiatintas tiene que ser escogido con cuidado para evitar que pueda deteriorar la capa de emulsión aplicada en la pantalla. Las compatibilidades de unos y otros productos de serigrafía pueden encontrarse en la casa comercial del distribuidor junto con recomendaciones de uso en función de la aplicación que se vaya a dar al material.

Las pantallas de serigrafía, empleadas adecuadamente pueden ser reutilizadas con numerosos diseños a lo largo de años por lo que resulta importante también ser capaz de retirar la emulsión una vez se ha acabado de trabajar con un diseño para dejar la pantalla disponible para un nuevo uso. Para ello se aplica dejando resbalar desde el marco un recuperador de la pantalla. Este se deja actuar durante un par de minutos antes de cepillar la pantalla con un cepillo diferente al empleado con el limpiatintas y finalmente se aplica agua a presión.

La limpieza tanto para retirar una tinta como para retirar la emulsión debe realizarse por las dos caras de la malla y repetirse hasta que se logre que la pantalla quede completamente libre de residuo.

Es importante que no haya cambios bruscos de temperatura durante el proceso de recuperación de la pantalla puesto que esto también contribuye a que los filamentos de las mallas se deterioren o puedan incluso llegar a romperse.



Figura 2.9 *Proceso de eliminación de emulsión de la pantalla de serigrafía.*

2.2.5 Spin coating

El spin coating es la técnica empleada de forma predominante para producir capas finas de materiales orgánicos con un espesor del orden de micrómetros y nanómetros. Los análisis pioneros de spin coating se llevaron a cabo hace más de 50 años por Emil et al. [206], quien lo estudió centrándose en la física de la expansión de una capa fina asimétrica de fluido newtoniano en un sustrato que rota con una velocidad angular. En muchos casos el material de recubrimiento es polimérico y se aplica en forma de una disolución de la que se evapora el disolvente.

Este proceso se ha empleado extensamente en la manufactura de circuitos integrados, espejos ópticos, pantallas de televisión en color y discos magnéticos para almacenamiento de datos. La fuerza centrífuga impulsa el líquido radialmente hacia el exterior. La fuerza viscosa y la tensión superficial causan una película fina para estar retenida en un sustrato plano. La capa se hace fina por combinación del flujo de fluido hacia el exterior y la evaporación [207].

El proceso de spin coating se puede dividir en varios pasos [208]:



Figura 2.10 Equipo de *spin coating* de la casa comercial Laurell Technologies Corporation.

Deposición. Durante esta etapa la disolución se vierte sobre el sustrato. Para un volumen concreto de disolución, resulta irrelevante llevar a cabo la deposición como una lluvia densa en todo el perímetro deseado o como una gota gruesa en el centro o alrededor del centro de rotación del sustrato escogido, ya que en etapas posteriores se producirá el reparto y homogenización de la disolución sobre la superficie del sustrato.

Aceleración. Esta segunda etapa se caracteriza por acelerar el sustrato hasta alcanzar la velocidad de rotación deseada. Debido a esa aceleración, se produce una fuerza centrífuga que provoca que la disolución se expanda radialmente. Durante este movimiento pueden formarse brevemente vórtices espirales en la disolución como resultado de la inercia estática que sufre la capa superior del fluido mientras que el sustrato es acelerando. Eventualmente, al alcanzar una altura crítica, el espesor del líquido es lo suficientemente pequeño como para estar en rotación simultánea con el sustrato desapareciendo esos vórtices.

Salida hacia el exterior estable. La tercera etapa es cuando el sustrato está girando a velocidad constante y las fuerzas viscosas del fluido dominan los procesos de reducción del espesor de este. Los tratamientos matemáticos del comportamiento del flujo muestran que durante esta etapa el líquido presenta una viscosidad newtoniana y su espesor es inicialmente uniforme a lo largo del sustrato.

Evaporación. Cuando la etapa de acelerado finaliza, empieza la etapa de secado de la película. Durante esta fase el fluido comienza a evaporarse. En los bordes, el líquido

evaporado va siendo sustituido por líquido procedente del centro gracias a la fuerza centrífuga, lo cual favorece los “coffee rings” [209]. La ratio de evaporación depende, entre otros factores, de la diferencia en la presión parcial de cada especie de la disolución entre la superficie libre de la capa de líquido y el aire flotando a su alrededor. Durante la evaporación los sólidos en suspensión o disueltos pueden aumentar su concentración en la superficie del líquido hasta dar lugar a una alta viscosidad e incluso a un recubrimiento sólido.

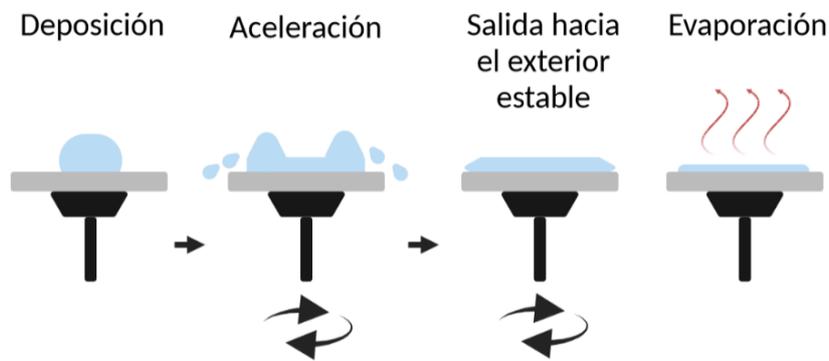


Figura 2.11 Etapas del proceso de formación de una membrana por spin coating.

Física del spin coating [210]: La física de la rotación del sustrato lleva a una condición de flujo de fluido donde las aceleraciones rotacionales se equilibran con el arrastre viscoso que se da dentro de la disolución. Esta condición es la base sobre la que se han fundado posteriormente muchos otros estudios, entre ellos el de Meyerhofer, que considera el hecho de que la evaporación de disolvente está ocurriendo simultáneamente fuera de la capa superior de la capa de disolución. El tratamiento de Meyerhofer permite predecir el espesor final del recubrimiento, h_f , en términos de varios parámetros clave de la disolución, de acuerdo con la ecuación 2.1:

$$h_f = x \left(\frac{e}{2(1-x)K} \right)^{1/3} \quad (\text{Ecuación 2.1})$$

Donde e y K son las constantes de evaporación y flujo respectivamente, definidas más adelante, y x es el contenido sólido efectivo en la disolución. Las constantes de evaporación y flujo constantes se definen como:

$$e = C\sqrt{\omega} \quad (\text{Ecuación 2.2})$$

$$K = \frac{\rho\omega^2}{3\eta} \quad (\text{Ecuación 2.3})$$

Donde ω es la velocidad angular, ρ es la densidad de la disolución, η es su viscosidad, y C es una constante de proporcionalidad que depende de si el flujo de aire sobre la superficie es laminar o turbulento, y de la difusividad de las moléculas de disolvente en el aire.

Los espesores logrados con esta técnica suelen estar por debajo de 1 micra, dependiendo en parte de la carga sólida de la disolución.

Algunos defectos comunes las membranas generadas con spin coating son los siguientes [210]:

- Defectos de estriado. Estos defectos consisten en crestas radiales y ondulaciones de espesor que apuntan casi directamente a la dirección del fluido durante el proceso de revestimiento por rotación. Los defectos de estriado se conocen como resultado de las fuerzas capilares que se desequilibran durante el revestimiento como resultado del proceso de evaporación de disolvente. La forma más fácil de prevenir la formación de estrías es evitar la evaporación durante el giro, pero esto da como resultado capas mucho menos espesas o puede requerir una placa calefactora para eliminar el disolvente una vez acabado el giro.

Estos defectos se dan muy fácilmente cuando se preparan membranas de sol-gel porque su preparación se basa en el uso de agua para hidrolizar grupos alcóxido liberando alcohol en la disolución. Pero, las mezclas alcohol-agua pueden ser inestables para este tipo de procesos de evaporación. El etanol se evapora más rápido que el agua así que la capa superficial tiene una composición que está enriquecida en agua. Esta menor concentración de alcohol tiende a causar que aumente la tensión superficial y por tanto la hace susceptible al efecto Marangoni [211]. El exceso de agua también puede acelerar las reacciones de hidrólisis y condensación que llevan a una gelificación temprana en la capa superficial y una peor calidad de la membrana.

- Variaciones graduales en el espesor radial. Incluso los recubrimientos que no tienen estrías, que son localmente planos, pueden tener diferencias de espesor desde el centro hacia el borde. Pueden ser cóncavos o convexos y usualmente dependen de variaciones de viscosidad específicas no-newtonianas dentro de la disolución durante el giro. La velocidad de cizallamiento local será proporcional al radio y variará con la profundidad dentro de la disolución que fluye. Si una solución de revestimiento experimenta un adelgazamiento por cizallamiento, luego el flujo será más rápido a mayores radios resultando en menores espesores de recubrimiento graduales a mayor radio.

- Marcas de sujeción. A veces las membranas tienen patrones obvios en su espesor que concuerdan con la sujeción del vacío por debajo de la oblea o a otra forma de fijación de esta. En nuestro caso se observaría como un círculo dónde el equipo contacta con la oblea para ejercer el vacío. El vacío provoca que el sustrato se flexione ligeramente en contacto con la goma del equipo. Las variaciones de contacto físico en la parte posterior del sustrato causan, por tanto, variaciones en el espesor de la membrana que se estaba formando en la capa superior.

- Cometas. Cualquier partícula que se cruce y caiga en la superficie de la membrana, bien durante la preparación del cóctel o durante el giro pueden causar defectos en el flujo llamados cometas. La partícula se pega a la superficie del sustrato y el flujo de fluido alrededor causa problemas en la uniformidad del espesor. Claramente, en la manufactura puede ser necesario trabajar en condiciones higiénicas para reducir los problemas de partículas. Es ventajoso hacer un filtrado de partículas de tamaños superiores a la micra previa a la fase de deposición.

Ventajas de esta técnica. El spin coating tiene muchas ventajas, siendo la más importante, que requiere controlar pocos parámetros (velocidad de giro, viscosidad y volumen del fluido) para controlar la formación de la membrana. Otra ventaja es la habilidad de la película de ir haciéndose progresivamente más uniforme conforme se seca, además del bajo coste y la rapidez de operación del proceso. Las desventajas están principalmente relacionadas con los defectos ya mencionados y con el bajo aprovechamiento del material de sustrato [208].

2.2.6 Tratamiento corona

El tratamiento corona es el método industrial de tratamiento de polímeros más común para mejorar la humectabilidad de los sustratos de impresión no absorbentes. Se realiza en la etapa previa a la impresión o para mejorar las propiedades del material antes de ser laminado o metalizado [212].

Un material se humedece si su energía o tensión superficial es mayor que la del líquido que pretendemos adherir. El plástico es un material sintético con una estructura de largas cadenas moleculares homogéneas que conforman un producto fuerte y uniforme. Estas cadenas de moléculas están normalmente unidas en sus extremos dejando tan solo un pequeño número de extremos de cadena abiertos. La escasez de puntos de unión es la responsable de los problemas de humectabilidad que impiden la impresión.

El tratamiento corona fue inventado por Verner Eisby en 1950 para vencer la dificultad que supone imprimir materiales plásticos. Eisby desarrolló una teoría según la cual una descarga de alta frecuencia, del orden de varios electronvoltios, aceleraría los electrones en la superficie del plástico. Los electrones que tienen una energía cinética superior a la energía de enlace rompen algunos enlaces moleculares y provocan la fragmentación de la cadena para dar un mayor número de extremos abiertos. Sin embargo, debido a la baja capacidad calorífica de los electrones, por lo general esta descarga eléctrica no causa daños en el material [213].

Durante las descargas corona además se produce la formación de un plasma de baja temperatura resultado de la ionización del aire en torno a los electrodos. Este está compuesto por compuesto casi en igual proporción por electrones, radicales libres y átomos de varios gases: oxígeno, nitrógeno y ozono entre otros, además de fotones de radiación electromagnética. El ozono, en combinación con los radicales libres, crean grupos oxidados como el hidroxilo, carboxilo, carbonilo y grupos éster en la superficie del material, oxidando de manera efectiva una capa fina de este (10^{-3} micras). Esta oxidación es la reacción primaria durante el tratamiento y aumenta la humectabilidad y la energía superficial del polímero notablemente. Sin embargo, otro posible resultado es un aumento de la rugosidad de superficie, introducir entrecruzamiento superficial,

modificar la morfología de la superficie aumentando o reduciendo su cristalinidad y eliminar la suciedad [214].

El tratamiento de la superficie con la descarga corona bajo condiciones ambientales es fácil de llevar a cabo, barata, simple, rápida y genera pocos residuos. Además, es un tratamiento superficial, que no reduce ni cambia la resistencia del sustrato, ni la apariencia del material. Estas ventajas han hecho que el tratamiento corona se emplee ampliamente en films poliméricas para obtener una mejor adhesión de pinturas y papeles entre otros materiales, pero su uso no se limita a este ámbito. También es empleado en dispositivos biomédicos en los que se modifica la superficie para mejorar la adhesión de células y mejorar la biocompatibilidad entre células vivas y el sustrato [215].

La efectividad del tratamiento corona depende del material específico sobre el que se esté usando. Diferentes materiales plásticos tienen diferentes propiedades y diferentes cantidades de aditivos, lo cual determina el efecto del tratamiento corona. No hay límites con respecto a los materiales que pueden ser tratados con la descarga corona, aunque la intensidad del tratamiento puede variar significativamente de unos a otros. La mejor manera de determinar el valor exacto de esta intensidad es probar sobre una muestra del material. En cualquier caso, es importante tener en cuenta que este tipo de tratamiento es reversible y factores como las condiciones de almacenamiento y la temperatura pueden afectar también a la velocidad a la que se pierde el efecto [216].

Los dispositivos que se emplean en el tratamiento corona generalmente reciben el nombre de activadores. Consisten en generadores, transformadores y un conjunto de electrodos: un electrodo de alto potencial y un electrodo de toma de tierra. El electrodo de toma de tierra se cubre con poliésteres, cerámica, goma de silicona vulcanizada, recubrimiento epoxi, resina de poliéster con una composición endurecida y fibra de vidrio. El tratamiento corona se basa en descargas de alta frecuencia que ocurren como resultado de diferencias de potencial en el espacio entre electrodos.



Figura 2.12 Sistema corona de la casa comercial Tantec.

2.2.7. Impresión 3D

La impresión 3D, también conocida como fabricación aditiva, normalmente construye objetos 3D añadiendo capa sobre capa de material con la forma deseada. La fabricación aditiva es ágil y puede crear formas complejas a partir de un diseño digital, lo cual es su principal diferencia frente a otras técnicas de fabricación convencionales como el moldeo o el fresado. Con esos procesos de fabricación tradicionales, siempre que se requiere un nuevo componente o cambiar parte del diseño, se hace necesario adquirir una nueva herramienta, molde o plantilla. Si embargo, en la impresión 3D no se requieren cambios físicos en el equipo, tan solo modificar el diseño digital. De este modo, las técnicas de impresión 3D están cambiando los procesos de fabricación arduos y que consumen mucho tiempo. Además, reducen la cantidad de residuos generados en comparación con las técnicas tradicionales. Esto junto con otras ventajas significativas, que incluyen la flexibilidad en cuanto a diseños geométricos complejos, la posibilidad de hacer piezas a medida y personalizadas, la fabricación aditiva se está abriendo paso rápidamente en la fabricación de componentes para plataformas microfluídicas.

La impresión 3D empieza con un diseño 3D usando software CAD y convirtiendo el modelo en un archivo STL (Surface Tessellation Language). El archivo STL se dividirá en capas de dos dimensiones para planificar la ruta de impresión de los objetos 3D. Sin

embargo, esto solo sirve para un único color o un solo tipo de material porque el archivo sólo contiene la geometría de la superficie, no el color ni la textura. Un formato de archivo alternativo sería los OBJ, que pueden almacenar información de color, material y textura; y los archivos PLY que pueden contener objetos escaneados en 3D. Además, se han desarrollado nuevos formatos de archivo como el 3MF (formato de fabricación 3D) o el AMF (Formato de fabricación aditiva). Ambos describen la información interna de los modelos 3D como el color, los materiales y la textura.

En términos de materiales, los polímeros son muy populares en impresión 3D debido a la flexibilidad de diseño, facilidad de uso y bajo coste. Generalmente, las propiedades físicas, químicas y mecánicas de los polímeros dependen de su composición química, estructura de polímero y proceso de curado. En la etapa de diseño y síntesis del material, se tiene la capacidad de diseñar las propiedades inherentes del material a nivel molecular y después procesarlas en formas, tamaños y reologías adecuadas para los procesos de impresión 3D. Durante la impresión, hay múltiples parámetros de fabricación que pueden influenciar la microestructura del material, como, por ejemplo, el grado de cristalinidad y el tamaño; y finalmente determinar las propiedades mecánicas o de otro tipo de los objetos impresos. Por tanto, es crítico entender las relaciones proceso-estructura-propiedades del proceso de impresión 3D.

Para una impresión 3D exitosa primero se requiere conocer los materiales y elegir el proceso adecuado. Después, el proceso de fabricación debe ser optimizado y finalmente, se examina la calidad de las impresiones. El post-procesado, que puede consistir por ejemplo en la limpieza, pulido de la superficie, curado y pintado, se requiere en la mayoría de los procesos de impresión. El limpiado incluye cortar el material de soporte y eliminar el polvo. Después de retirar las partes innecesarias, el pulido de la superficie (p. e. lijado) y los tratamientos químicos (p. e. Reacción de vapor) pueden ser necesarios para que el producto presente mejores propiedades mecánicas.

Los procesos de impresión 3D están bien establecidos para objetos tridimensionales fabricados con polímeros y/o compuestos de polímeros, como es el caso de la extrusión de material (ME) y la estereolitografía (SL). Cada proceso de impresión 3D tiene sus propias ventajas y retos y requiere unas condiciones específicas del polímero, como pueden ser la forma, el estado (sólido o líquido) y las propiedades físicas (viscosidad y

temperatura de fusión). Por tanto, cuando se seleccionan las técnicas de impresión 3D, el usuario debe considerar materiales, coste y requisitos derivados de la aplicación (incluyendo la resolución, la complejidad de la geometría y las propiedades mecánicas).

En este caso para la fabricación de sensores se tienen disponibles dos impresoras 3D que se basan en principios distintos.

Por un lado, la Witbox 2 consta de un mecanismo de ME. La extrusión de material consiste en dispensar selectivamente un polímero a través de una boquilla y depositar el material capa por capa para construir el objeto tridimensional. El mecanismo de extrusión tiene una manera diferente de imprimir dependiendo del tipo de material, si es sólido o líquido. En la ME la deposición de filamento fundido (FFF) es el más utilizado debido a configuración sencilla y rentabilidad. La FFF es una forma de impresión 3D en la que el filamento sólido se funde y pasa a un estado semilíquido en el extremo caliente, se extruye a través de una boquilla y se deposita capa a capa sobre la plataforma o las capas previamente impresas.

Los materiales termoplásticos, como los policarbonatos, el PLA o el nylon, se usan como materia prima debido a su baja temperatura de fusión y apropiada viscosidad cuando se funden. Los filamentos compuestos se emplean como materia prima aplicando reforzadores o rellenos activos, como los nanomateriales de carbono, metales y biomateriales y cerámicas, a los polímeros de manera que la FFF puede producir productos funcionales de electrónica para sensores electroquímicos y todo tipo de soportes para las plataformas microfluídicas por complejas que sean y exigentes que puedan ser los requisitos de propiedades mecánicas.

Para una impresión exitosa, es importante controlar la velocidad de alimentación que empuja el filamento fundido fuera de la boquilla y mantener la presión de compresión entre el rodillo y el extremo caliente por debajo de un límite crítico para evitar que el filamento se rompa. La rotura es el modo de fallo más común de la extrusión de filamento. Desde el año 2000 se conoce la relación experimental entre la rotura y el índice entre el módulo elástico del filamento y la viscosidad fundida, de manera que se sabe que para un índice superior a un rango crítico (E/η : 3×10^5 a $5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$) no se romperá el filamento. La tensión de cizalla generada en el estado fundido de un polímero

depende de la velocidad de impresión y afecta al grado de orientación de las cadenas de polímero. Como resultados las cadenas de polímero tienen a alinearse a lo largo de la dirección de impresión y la resistencia del polímero a lo largo de la dirección de la cadena es mayor que la de la dirección transversal. La temperatura ambiental de la impresión debe ser considerada también porque la temperatura influye la velocidad de enfriamiento del polímero fundido y con ello la cristalinidad del polímero resolidificado, afectando también a las características finales del objeto impreso.

El principal problema es que los productos que usan FFF tienen baja fuerza y dureza en la dirección de construcción (eje z) debido a la débil unión entre capas y a la formación de huecos. Para superar esta problemática se han planteado diversos métodos como:

- Sistema de calentamiento óptico. Para calentar la superficie de manera previa a la deposición del material, lo cual puede mejorar la difusión de las cadenas de polímero en las interfases entre capas.
- Modificar el filamento añadiendo rellenos conductores térmicos en los polímeros para ayudar a que se genere calor entre las capas intermedias. Para ello se desarrollaron filamentos con recubrimientos de nanotubos de carbono.

En el caso de que se le quiera dar un aspecto final al sensor más liso se precisarán métodos de post-procesado químicos o físicos como pueden ser la fusión de resina, el acabado con acetona, el lijado, etc.

Otro tipo de ME, más avanzado tecnológicamente, sería el cableado directo de tinta (DIW), que es un proceso de deposición de tinta en el que la tinta viscoelástica se extruye a través de una pequeña boquilla con caudales controlados y se deposita capa a capa para crear la estructura 3D. Debido a su alta resolución cada vez se usan más para la fabricación de dispositivos sensores [217,218].

Los polímeros termoplásticos son polímeros usados comúnmente que se ablandan cuando se calientan, permitiendo dar forma y solidificarse de nueva cuando se enfrían. Los polímeros termoplásticos pueden dividirse en amorfos o semicristalinos según su estructura molecular. Los termoplásticos amorfos tienen estructuras moleculares ordenadas que carecen de punto de fusión determinado, haciendo fácil para ellos la

termoformación. Por otro lado, los termoplásticos semicristalinos tienen una estructura molecular con un punto de fusión determinado. Después de que cierta cantidad de calor sea absorbido, de forma repentina pasan a estado líquido desde el estado sólido inicial. Los polímeros semicristalinos tienen buenas propiedades mecánicas debido a sus fuerzas intermoleculares. Todos los polímeros termoplásticos tienen la capacidad de pasar por la fusión de manera reversible, siendo esto lo que los hace aptos para aplicaciones de impresión 3D basada en la extrusión. Bajo calor externo por parte de una impresora 3D, las partículas de polímero sólidas (o filamentos) se funden rompiendo las cadenas de polímero. En esta etapa las cadenas de polímero pueden moverse de manera libre y después de imprimirse el polímero derretido se solidifica con el ordenamiento deseado y las cadenas de polímero se interconectan y se inmovilizan de nuevo. Algunos materiales típicamente usados como materia prima para la impresión 3D de extrusión son el PLA, el nylon poliamida o el polietilenglicol tereftalato debido a su bajas temperatura de fusión.

En nuestro caso los materiales disponibles para la fabricación de sensores son los filamentos de PLA. El PLA es el material crudo más ampliamente usado en procesos de impresión 3D debido a su biodegradabilidad y sus propiedades respetuosas con el medio ambiente, sin embargo, tiene como desventaja su fragilidad mecánica, que hace necesario cuidar de que el hilo de alimentación de PLA al extrusor no se rompa durante el proceso de impresión [219].

En la Witbox hay un pequeño extrusor en el que los filamentos de polímero se derriten hasta estado semi líquido y se expulsan para construir una plataforma capa a capa cuando el filamento expulsado se enfría, solidifique y se adhiera con el material que adyacente que ha sido previamente depositado. El extrusor se mueve en torno al eje xy y durante este movimiento el material se dispone sobre la superficie. Paralelamente el plato base se mueve en la dirección vertical con un incremento de altura negativo igual al grueso del filamento que está siendo extruido. Una vez finalizada la impresión la pieza se separa del plato con una espátula y se deja enfriar.

La impresora SL emplea fotopolímeros (resinas basadas en grupos epoxi o acrílicos) solidificados con la luz UV. Para los equipos de SL existen dos posibles configuraciones: las arriba abajo y de abajo a arriba. En las de arriba abajo, que es el caso de la impresora

Forms 3+, con la que contamos en el laboratorio de investigación dentro del grupo del ECSens, hay una plataforma que se sumerge en el tanque de fotorpolímero líquido y luego asciende y la luz UV incide sobre aquellos puntos que se desean solidificar formando redes entrecruzadas. Una vez que se ha impreso una capa y ha escurrido el fotorpolímero líquido, se vuelve a sumergir la plataforma y se repite el proceso hasta lograr la pieza completada capa a capa. La SL puede fabricar objetos 3D con una alta resolución en la región submicrométrica.



Figura 2.13 Impresora 3D de extrusión de filamento de la casa comercial Witbox.

Los fotorpolímeros típicamente consisten en monómeros/oligómeros y fotoiniciadores, pero para un adecuado proceso de foto iniciación y productos de alta calidad, pueden añadirse diluyentes y agentes de transferencia de cadena. Los agentes diluyentes controlan la viscosidad de la resina para lograr un adecuado mojado e impregnado y los agentes de transferencia modifican la red de entrecruzamiento durante la impresión. Para un buen proceso de curado del polímero hay varios factores de curado de la reacción, incluyendo la intensidad del láser, viscosidad y el comportamiento de mojado de la resina, que deben controlarse.

La alta resolución de SL ayuda a fabricar objetos precisos en el rango de cientos de micrómetros, pero cuanto mayor sea la resolución más tiempo más largo será el proceso de impresión, especialmente para piezas grandes, debido a la baja velocidad de impresión (~14 mm/h en la dirección vertical) además de que este tipo de impresora es mucho más cara comparada con la FFF. Para limpiar se suele usar alcohol isopropílico

que elimina el exceso de resina pegajoso del objeto impreso. En algunos casos, se precisa un proceso posterior de curado para mejorar las propiedades mecánicas usando bien luz UV o calentando [220].

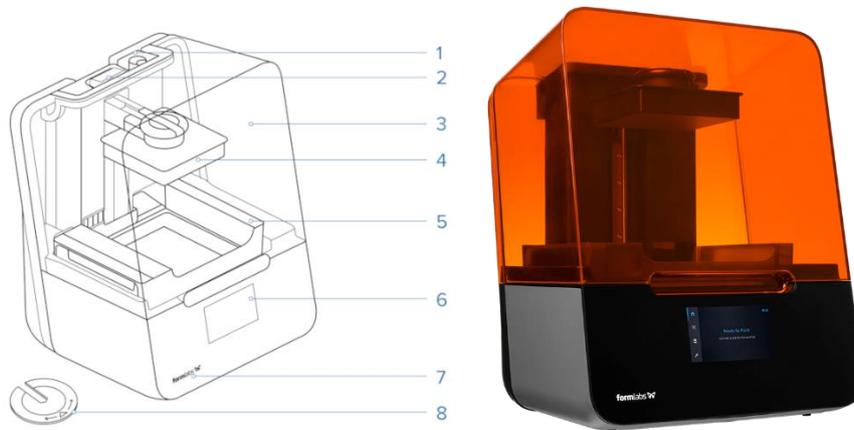


Figura 2.14 Impresora 3D de estereolitografía. 1. Cartucho de resina. 2. Luz de estado. 3. Cubierta. 4. Plataforma de construcción. 5. Tanque de resina. 6. Pantalla táctil. 7. Luz de estado. 8. Disco de nivel.

2.3 Preparación de membranas

La palabra membrana se utiliza en diferentes situaciones para diferentes funciones y, por lo tanto, es complejo hallar una definición. En esta Tesis se definen las membranas como barreras semipermeables. La semipermeabilidad implica que, en las aplicaciones consideradas, la membrana se usa para transportar ciertos tipos de especies. Cuando la dirección del transporte es hacia fuera del sistema se habla de separación mientras que, si es dentro del sistema, se trata de membranas de contacto. El motivo del transporte a través de la membrana es una diferencia de potencial entre los dos medios que separa. Esta diferencia puede ser debida a un gradiente de temperatura, de presiones parciales, de concentraciones o de potencial eléctrico y los mecanismos de transporte dependen fuertemente de la morfología de la membrana. Las dos morfologías típicas que pueden distinguirse son la porosa y la densa. Las membranas densas son permeables a moléculas individuales. El transporte en estos sistemas se describe con el modelo de disolución-difusión. En este modelo la permeabilidad, P , de un componente se relaciona con su difusividad, D (cm^2s^{-1}) y solubilidad en el material de la membrana, S (atm^{-1}), siguiendo la fórmula:

$$P_i = D_i \cdot S_i$$

(Ecuación 2.4)

Ya que tanto la solubilidad como la difusividad dependen de las interacciones con la membrana, el transporte es claramente dependiente del material en cuestión. La permeabilidad de materiales densos iguala al flujo, normalizado por el área superficial de la membrana, la diferencia parcial en presión y el espesor de la membrana. El valor de la permeabilidad es una propiedad intrínseca de los materiales de la membrana y da una indicación de la capacidad de transporte de esta.

La segunda característica de las membranas densas es la selectividad intrínseca, α . Para dos componentes j e i , la selectividad $\alpha_{i,j}$ se define como la relación entre las permeabilidades puras de j e i . Su valor da una indicación de la eficiencia de separación de la membrana. La combinación de la permeabilidad y la selectividad indica el funcionamiento general de un material membranoso. Es importante dejar claro que todos los materiales tienen propiedades de membrana. Sin embargo, para la mayoría de los materiales la permeabilidad y/o selectividad es muy baja como para que tenga utilidad práctica.

Para las membranas porosas, el mecanismo de transporte es completamente diferente. En este caso el transporte ocurre a través de los huecos vacíos (poros) en la membrana en vez de en el material en sí mismo. A pesar de que la interacción con la superficie interna de la membrana juega un rol crucial, el transporte está regido principalmente por la morfología de la membrana. La morfología incluye la porosidad superficial y de volumen, la distribución de tamaño de poro y la tortuosidad. La tortuosidad es un factor usado para corregir la desviación de forma de los poros comparados con cilindros perfectos. En las membranas porosas, de nuevo, la permeabilidad se usa para indicar la capacidad de la membrana. Sin embargo, ya que el transporte en este caso no es una propiedad intrínseca del material, la permeabilidad en membranas porosas no está normalizada según el espesor de la membrana. Los tamaños de poro se encuentran comprendidos en un rango desde los micrómetros hasta por debajo de 1 nm, aunque son mucho más probables los primeros.

Para las membranas porosas se ha definido un término alternativo a la selectividad: la retención, R . La retención se mide durante la filtración y está relacionada con la

concentración del componente en el permeado ($c_{i,perm}$) y la alimentación ($c_{i,alim}$), respectivamente, como viene dado por:

$$R_i = 1 - (c_{i,perm}/c_{i,alim}) \quad (\text{Ecuación 2.5})$$

Las retenciones varían entre 0 (no hay retención de la componente i) hasta 1, (la componente i está completamente retenida). Depende de la relación del tamaño molecular y el tamaño de poro. Una segunda característica de la membrana porosa es que indica si la separación ocurre en el peso molecular de corte (MWCO). MWCO se define como el peso molecular al que el 90% de lo retenido por la membrana. Combinando el MWCO y la permeabilidad, se puede dar una estimación del funcionamiento de la membrana. En resumen, el funcionamiento de las membranas densas es dependiente estrictamente del material del que están hechas, sin embargo, el funcionamiento de las membranas porosas depende del material y su morfología.

¿Cómo integrar la funcionalidad de la membrana en una plataforma microfluídica?

Se han realizado múltiples aproximaciones para combinar membranas y microfluídica. Se puede hacer una división gruesa en cuatro métodos de fabricación:

- Incorporación directa de membranas comerciales. Es método más directo e implica el pegado o sujeción de la membrana al dispositivo microfluídico. La membrana puede comprarse a un distribuidor comercial o prepararse de manera interna. El mayor problema de este método es el paso de sellado, especialmente cuando se combinan sustratos inorgánicos como el silicio o el vidrio con membranas poliméricas. Debido a las fuerzas capilares los líquidos pueden quedarse fácilmente obstruidos entre las placas de recubrimiento. Usando pegamento las mismas fuerzas pueden provocar el bloqueo completo de la membrana debido al taponado de poros. Las ventajas son la simplicidad del proceso y la amplia elección de materiales para la membrana y morfologías.

- Preparación de membranas como parte de fabricación del proceso. Se emplean materiales procedentes de la industria de los semiconductores. En este caso para integrar la funcionalidad de la membrana se prepara esta durante el proceso de fabricación del proceso. Se pueden aplicar una gran variedad de métodos de fabricación

como, por ejemplo, el grabado para la preparación de micropelículas o la deposición de una fina capa metálica o de otros materiales como las zeolitas, la sílice o la alúmina. Recientemente también se han logrado combinaciones de tecnologías de semiconductores con polímeros e incluso nuevos métodos que no requieren condiciones de sala blanca.

- Preparación *in-situ* de membranas. Una tercera aproximación a la integración de las membranas consiste con empezar con un chip microfluídico y fabricar la membrana *in situ*. Este principio ofrece una oportunidad interesante de controlar la posición y espesor de la membrana, solo controlando la posición de la exposición. Todas las membranas discutidas hasta este momento se basan en materiales sólidos. Sin embargo, un líquido también puede actuar como membrana (membranas líquidas) para la extracción y tecnología de membrana combinadas. Un fluido estable de tres capas de fluidos inmiscibles en los que la capa intermedia se usa para la separación. En contraste con las membranas discutidas más arriba, la membrana es en este caso es una capa dinámica. La separación de los componentes se basa en la diferencia de solubilidad en la fase I de membrana líquida.

- Uso de las propiedades de membranas del material. El último método para la integración de características de membrana en el chip es seleccionar un material para el chip que tenga las características de la membrana en sí mismo. Este método es simple pero elegante ya que no requiere pasos extra de fabricación [221].

¿Qué aplicaciones se pueden beneficiar del uso de membranas?

A pesar de que el uso de membranas en microfluídica se está expandiendo a muchas áreas, la mayoría de las aplicaciones pueden encontrarse en la química analítica. Ya que el sensor analítico a menudo es sensible a la composición de la muestra, en muchos casos las muestras no pueden analizarse directamente y necesitan un pretratamiento. Este puede incluir la eliminación selectiva de componentes de gran tamaño, impurezas y polvo por un lado y componentes de bajo peso molecular, como las sales, por otro. Además, en muchos casos los componentes de interés están por debajo del límite de detección del equipo de análisis. En tales casos es necesario eliminar el disolvente. Las membranas son muy adecuadas para estas operaciones.

Entre las funciones que pueden desempeñar las membranas se encuentran:

- Concentración de la muestra
- Filtración de la muestra
- Preparación de la muestra por microdiálisis y otras aplicaciones de contacto líquido-líquido
- Interconexiones con control externo. Hasta ahora el transporte en la membrana había estado dominado por el material de esta o su morfología, pero los poros de las membranas se pueden emplear como interconectores que permiten el control externo de las características de la separación
- Microrreactores de membrana
- Estudios relacionados con células [221]

2.3.1 Preparación de sol-gel

La ruta del sol-gel ofrece un método útil para preparar materiales similares al vidrio o la cerámica a través de la hidrólisis y condensación de los alcóxidos metálicos adecuados. El proceso de sol-gel puede ser descrito como la creación de una red de óxido por reacciones de policondensación progresiva de precursores moleculares en un medio líquido. Generalmente empieza con disoluciones alcohólicas (o de otro disolvente orgánico de bajo peso molecular) del monómero, precursores alcoximetálicos o semimetálicos, $M(OR)_n$, donde M representa el elemento que forma la red, como puede ser Si, Ti, Zr, Al, B, etc. Y R es típicamente un grupo alquilo, (C_xH_{2x+1}) , y agua. Generalmente las reacciones de hidrólisis y condensación ocurren simultáneamente una vez que se ha iniciado la reacción de hidrólisis. Durante la transformación sol-gel la viscosidad de la disolución aumenta gradualmente conforme el sol (suspensión coloidal de partículas muy pequeñas, 1-100 nm) se interconecta para formar una red rígida y porosa, el gel. Tanto la etapa de hidrólisis como la etapa de condensación generan subproductos de bajo peso molecular como alcohol y agua. Estas pequeñas moléculas deben dejarse secar para dar una red tetraédrica SiO_2 (en el caso de que la especie fuese el silicio). Los principios para la formación de la red de sol-gel de sílice son también

ciertos para alcóxidos inorgánicos sin silicato. De hecho, los alcóxidos de titanio, circonio, estaño o aluminio son mucho más reactivos frente al agua que los alcoxilanos debido a su menor electronegatividad y mayor acidez de Lewis. Durante el secado, el alcohol y el agua se evaporan de los poros causando que el gel se cuartee. Los xerogeles, geles completamente totalmente secos, son significativamente menos porosos que sus homólogos hidratados. Las reacciones químicas que tienen lugar durante la formación del sol, el gel y el xerogel influyen las propiedades y la composición final del material. Además, las propiedades físicas (tamaño de poro promedio, distribución de tamaño de poro, forma de poro, área de superficie, etc.) del gel seco depende de los parámetros del proceso sol-gel y de los métodos usados para preparar el material [222].

En esta Tesis, el sol-gel se preparó como se describe a continuación:

Se mezclan 1.1 mL de TEOS con 0.47 mL de PTMOS, 0.5 mL de etanol, 0.66 mL de agua y 0.38 mL de HCl 0.1 M. Se agita con vortex durante 10 segundos y se deja reposar 24 horas a temperatura ambiente antes de depositarlo sobre el sustrato.

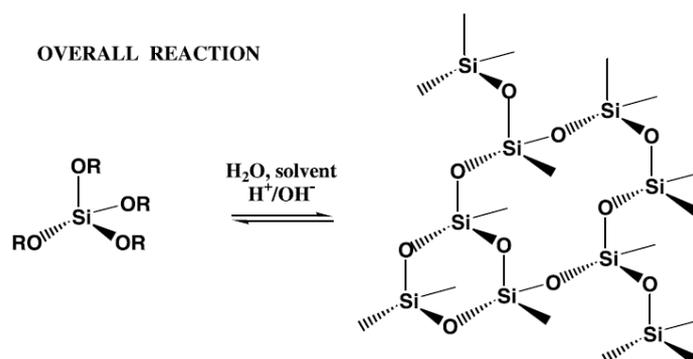


Figura 2.15 Reacción de formación de un sol-gel de silicio.

2.3.2 Preparación de membranas de pullulan

Otra posibilidad que se exploró fue el uso de pullulan como matriz para el sol-gel. El pullulan es un exopolisacárido producido por una levadura parecida a un hongo llamada *Aureobasidium pullulans*. Su unidad de repetición es la maltotriosa unida mediante un enlace α -1,6-glucosídico. Es hidrofílico y tiene una alta densidad de grupos químicos

reactivos facilitando su entrecruzamiento químico. Además, presenta buenas propiedades para la formación de películas finas [223,224].

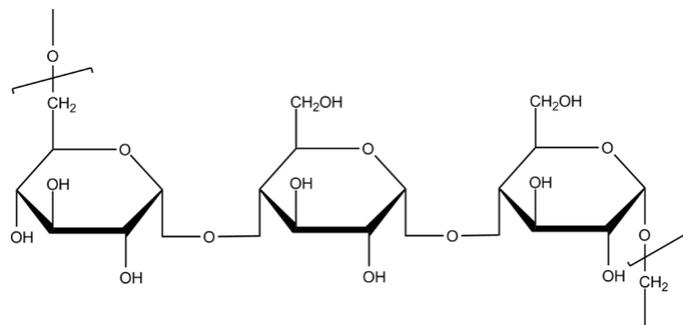


Figura 2.16 Monómero del polímero pullulan.

En los últimos años las películas de pullulan se han investigado intensamente encontrando que se contraen al aumentar la temperatura y esta contracción depende de la reducción en el contenido en agua de la película durante el calentamiento. En ocasiones a las películas de pullulan se les añade glutaraldehído y glicerol para mejorar la fuerza tensil y la extensibilidad, la hidrofiliidad y la permeabilidad al vapor de agua respectivamente.

Contrariamente a lo que se cree, el pullulan natural no tiene ningún tipo de actividad antibacteriana, pero se lo puede dotar de esta añadiéndole varios agentes antimicrobianos como pueden ser nanopartículas o aceites esenciales. Sin embargo, estos procesos aumentan la dificultad de la preparación de las películas de polisacárido [225].

Jahanshahi-Anbuhi et al. introdujeron las disoluciones acuosas de pullulan como una forma de estabilizar biorreactivos lábiles [226]. Estos se añaden a la disolución acuosa del polisacárido y se dejan gelificar para formar una película o tableta que contiene los reactivos. Durante la gelificación el pullulan forma un material similar al vidrio que es impermeable al oxígeno y puede disolverse fácilmente en agua. Además, es inocuo para la salud humana. Debido a estas propiedades únicas el pullulan se puede usar para estabilizar membranas en sensores para la industria alimentaria, en dispositivos Point-of-care y en el control de la calidad de fármacos [227].

2.3.3 Preparación de chitosan

El chitosan se produce por desacetilación parcial de la quinina, el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza. Tiene propiedades atractivas como la biocompatibilidad y la biodegradabilidad. Los grupos amino del chitosan tienen un valor de pK_a en torno a 6.5 lo cual implica que se encuentran protonados en disoluciones ácidas. La carga positiva es la propiedad que permite a este polímero unirse a las superficies cargadas negativamente, como es el caso de las fibras de celulosa o el PDMS tratado con plasma. El chitosan ha sido empleado previamente para modificar las fibras de papel y los tejidos de algodón para mejorar la humectabilidad y brindar la posibilidad de inmovilizar covalentemente anticuerpos a un sustrato para la fabricación de biosensores [228].

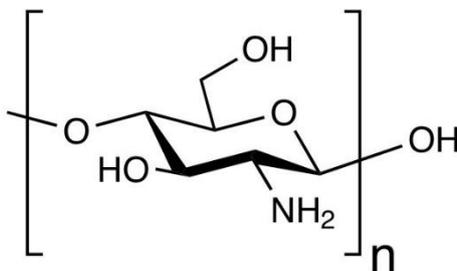


Figura 2.17 Monómero del polímero de chitosan.

Las disoluciones de chitosan se preparan disolviendo pequeñas cantidades de este (entre 5 y 25 mg/mL) en agua con un 1% (v/v) de ácido acético [43].

2.4 Preparación de NIPAM

2.4.1 Hidrogeles

Los hidrogeles son matrices poliméricas hinchadas con agua que presentan una configuración tridimensional capaz de absorber grandes cantidades de agua o fluidos biológicos. Su tendencia a hincharse los convierte en un material inteligente e ideal para aplicaciones biomédicas y farmacéuticas.

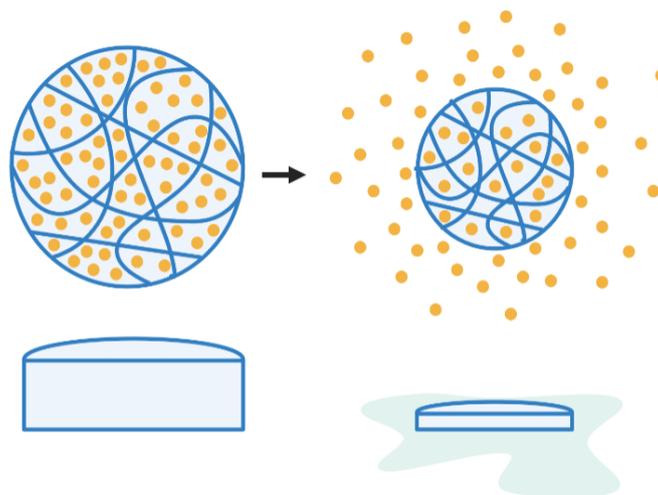


Figura 2.18 Colapso del NIPAM hidrogel con liberación de disolución.

Las características de estas redes de polímero dependen de la naturaleza y unión de los monómeros que las constituyen, así como del método de síntesis y el entrecruzamiento de las cadenas de polímero que forman la red.

Los monómeros empleados en la polimerización de hidrogeles suelen contener una gran cantidad de grupos ionizables o polares como $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{CONH}-$, $-\text{CONH}_2$ y $-\text{SO}_3\text{H}$ que le confieren carácter hidrófilo a la red de polímero y que son los responsables de la absorción de disolvente por parte del hidrogel. Cuando las moléculas de disolvente penetran las redes de polímero, se dice que este se encuentra en estado hinchado y el hidrogel presenta aspecto blando y consistencia gomosa similar a la de los tejidos vivos naturales.

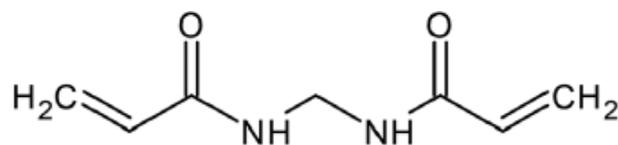


Figura 2.19 Estructura química de la N-metilenbisacrilamida.

Algunos monómeros corrientes en la preparación de hidrogeles son los que aparecen en la *Tabla 2.5*. Algunos de los copolímeros más comúnmente empleados en la síntesis de hidrogeles son la N-metilenbisacrilamida, el etilen glicol dimetacrilato, la tetrametiletildiamina y el glioxal.

Tabla 2.5 Monómeros comunes para la síntesis de hidrogeles.

Monómero	Estructura	R	Ejemplos	Ref.
Ácidos acrílicos		-H -CH ₃	Ácido acrílico Ácido metacrílico	[229,230] [231,232]
Acrilamidas		-H -CH ₃	Acrilamida Metacrilamida	[233,234] [235]
Acrilatos		-C ₂ H ₄ OH - CH ₂ (CH ₂) ₁₆ CH ₃	2-hidroxietil acrilato Octadecil acrilato	[236,237] [236]
Acrilamidas N-sustituidas			N-isopropilacrilamida	[230,238]
Metacrilatos		-C ₂ H ₄ OCH ₃ -C ₂ H ₄ OH -C ₄ H ₉	2-Metoxietil metacrilato 2-Hidroxietil metacrilato Butil metacrilato	[239] [237,240] [241]
Glicoles		-H -CH ₃	Etilenglicol Propilenglicol	[242]
Lactonas		-C ₅ H ₁₀	ε-caprolactona	[242]
Vinilos		-OH 	Vinil alcohol N-vinilcaprolactama	[239] [243]
Otros			Anilina Pirrol	[244,245] [246]

Formas de síntesis de los hidrogeles

La técnica de polimerización controla la funcionalidad y propiedades de los polímeros resultantes. Las aproximaciones usadas para la síntesis de polímeros, en general, son el crecimiento de cadena y la polimerización de crecimiento escalonado. En la

polimerización de crecimiento de cadena, la cadena de polímero crece añadiendo monómeros en su extremo activo. Usualmente un iniciador usa energía como el calor o la luz para activar un primer monómero con un solo grupo funcional produciendo un radical libre. El monómero activado continúa activando a las moléculas de monómero vecinas de manera que la cadena de polímero va creciendo, uniéndose uno a uno los monómeros en el extremo activo. Este método de polimerización implica el uso de diferentes técnicas como las polimerizaciones gruesas, en disolución, en suspensión y en emulsión. Hay también métodos de polimerización radical no convencionales como la polimerización de transferencia radical y la polimerización de transferencia de cadena por adición-fragmentación reversible. El crecimiento de cadena es rápido y da lugar a polímeros de alto peso molecular en un período corto.

Por otra parte, la polimerización escalonada, también conocida como polimerización por condensación, implica la combinación de oligómeros para formar las cadenas de polímero mediante técnicas como la policondensación de fundido y la policondensación de la disolución. En la polimerización escalonada, al contrario de la polimerización por crecimiento de cadena, los monómeros implicados en el proceso tienen al menos dos grupos funcionales diferentes por lo que pueden unirse entre sí en cualquier momento, sin necesidad de iniciador, en vez de unirse uno a uno en un extremo activo de la cadena.

En los hidrogeles las cadenas de polímero formadas como se ha descrito anteriormente se entrelazan para formar una red tridimensional. El entrecruzamiento de cadenas de polímero afecta a sus propiedades físicas: elasticidad, viscosidad, solubilidad, temperatura de transición vítrea, fuerza, dureza y punto de fusión por nombrar algunas. Los polímeros entrecruzados tienen una mayor temperatura de transición vítrea porque los enlaces entre cadenas limitan el movimiento de rotación de estas. El entrecruzamiento aumenta el peso molecular de las cadenas de polímero a la par que restringe el movimiento traslacional, por tanto, la solubilidad del polímero disminuye. A pesar de que estos enlaces entre cadenas son insolubles normalmente absorben una gran cantidad de disolvente en los geles resultantes. La cantidad de disolvente que puede absorber una red de polímero depende de la densidad de enlaces entre cadenas o el número de estos por volumen. Conforme aumenta la densidad de entrecruzamiento,

la libertad de las cadenas de polímero para acompañar las moléculas de disolvente disminuye.

El entrecruzamiento puede darse simultáneamente al crecimiento de las cadenas de polímero o después de la síntesis de las cadenas de hidrogel. Existen tanto métodos físicos como químicos para entrecruzar hidrogeles. Los hidrogeles con entrecruzamiento químico presentan enlaces covalentes entre las diferentes cadenas de polímero mientras que los hidrogeles entrecruzados físicamente evitan disolverse mediante las interacciones físicas que existen entre las diferentes cadenas de polímero [247].



Figura 2.20 Soporte de gelificación de la casa comercial Bio-Rad.

Para la preparación de hidrogel se suele recurrir a disolver los monómeros en un disolvente adecuado, en el caso del NIPAM, la bisacrilamida y el ácido acrílico, en agua; y a continuación adicionar un iniciador químico o fotónico, homogeneizar y exponer a la luz o dejar polimerizar en un molde. En el caso de esta tesis para controlar el espesor de las láminas de NIPAM hidrogel sintetizado químicamente se usó como iniciador el persulfato de amonio, se adicionó un catalizador líquido para acelerar el crecimiento de cadena, el TEMED, y la mezcla a prepolimerizar se vertió en un soporte de gelificación con espaciadores de 0.75, 1.0 o 1.5 mm según el espesor que se desee en la lámina final de hidrogel. Posteriormente estas se desmoldan y pueden ser cortadas con moldes o bisturís en fragmentos que se adecuen en forma y dimensiones a la aplicación de interés. Se han de conservar húmedos hasta el momento de su uso para lo cual se suele recurrir

a dejarlos sumergidos en un cristizador con agua tapado para prevenir la contaminación cruzada y evaporación del disolvente.

Métodos de caracterización

Los hidrogeles pueden retener grandes cantidades de agua en su matriz, aumentando sus dimensiones y volumen. El proceso de absorber una gran cantidad de agua se conoce como hinchado del hidrogel. El hinchado del hidrogel es muy importante para la determinación de otros parámetros como el grado de entrecruzamiento, las propiedades mecánicas y la velocidad a la que se degrada. Generalmente, el hinchado de un hidrogel se estudia usando técnicas simples como el estudio de la fracción de gel, medidas del grado de hinchado y pérdidas por secado. La fracción de gel se puede calcular de varias maneras. Por ejemplo, un método es sumergir el hidrogel en agua durante un cierto período y medir la relación entre los pesos secos del polímero después y antes de hincharse. En otro método el hidrogel se sumerge en agua caliente para eliminar las impurezas solubles en agua y en etanol para eliminar contaminantes orgánicos y a continuación, se calcula la relación de pesos seco antes y después del tratamiento. El propósito de estos métodos es eliminar impurezas atrapadas dentro del gel. La fracción de gel se puede calcular como sigue:

$$\text{Fracción de gel (\%)} = \frac{W_s}{W_i} \times 100\% \quad (\text{Ecuación 2.6})$$

Donde W_s es el peso seco del polímero después del tratamiento y W_i es el peso seco del polímero después de tratarlo. Normalmente, el grado de hinchamiento se mide manteniendo el hidrogel en agua destilada durante 48 horas y filtrando a través de un filtro de malla 30. El porcentaje de hinchamiento se calcula con la ecuación que se presenta a continuación:

$$\text{Hinchamiento (\%)} = \frac{W_s - W_i}{W_i} \times 100\% \quad (\text{Ecuación 2.7})$$

La pérdida de peso se mide después de deshidratar el hidrogel y viene dada por:

$$P\acute{e}rdida\ de\ peso\ (\%) = \frac{W_f}{W_i} \times 100\% \quad (Ecuaci\acute{o}n\ 2.8)$$

Donde W_f es el peso final despu\es de deshidratar. La p\erdi-da de peso puede atribuirse a la liberaci\on de agua u otras sustancias que estuvieran contenidas en la red del hidrogel.

Por otra parte, la microestructura del hidrogel puede determinarse usando la fracci\on en volumen del pol\imero en estado hinchado, el peso molecular promedio entre enlaces entre cadenas y el tama\~no de malla de la red. La evaluaci\on de estos par\ametros se basa principalmente en la teor\ia de equilibrio-hinchado y la teor\ia de goma-elasticidad.

La fracci\on de volumen del pol\imero en estado hinchado representa la cantidad de l\iquido embebido en el gel hinchado y se describe por:

$$v_{2,s} = \frac{1/\rho_2}{Q_m\rho_1 + 1/\rho_2} \quad (Ecuaci\acute{o}n\ 2.9)$$

Donde ρ_1 es la densidad del disolvente, y ρ_2 es la densidad del pol\imero. Q_m es la relaci\on de masa hinchada. El peso molecular promedio entre cadenas indica el grado de entrecruzamiento y puede ser determinado usando la teor\ia de Flory-Rehner. Para un hidrogel no i\onico se est\adado por la siguiente ecuaci\on:

$$\frac{1}{\bar{M}_c} = \frac{2}{\bar{M}_n} - \frac{(\bar{v}/v_1)[\ln(1-v_{2,s}) + v_{2,s} + \chi_1 v_{2,s}^2]}{v_{2,r} \left[(v_{2,s}/v_{2,r})^{\frac{1}{3}} - (v_{2,s}/2v_{2,r}) \right]} \quad (Ecuaci\acute{o}n\ 2.10)$$

Donde \bar{M}_c es el peso molecular de las cadenas de pol\imero preparadas bajo condiciones id\enticas, v_1 es el volumen molar de agua, $v_{2,r}$ es la fracci\on en volumen de pol\imero en estado relajado y χ_1 es el par\ametro de interacci\on pol\imero-disolvente.

El tama\~no de malla del hidrogel puede determinarse de acuerdo con la siguiente ecuaci\on:

$$\xi = v_{2,s}^{-\frac{1}{3}} l \left(C_n^{2\bar{M}_c/M_r} \right)^{1/2} \quad (Ecuaci\acute{o}n\ 2.11)$$

Aquí la l es la longitud del enlace entre cadenas principales de polímero, C_n es el índice de Flory característico, y M_r es el peso molecular de las unidades de repetición. La determinación del tamaño de malla es útil cuando se quiere emplear el hidrogel como repositorio de moléculas complejas ya que tendrá que ser mayor es tamaño de malla que el de la molécula que se pretende retener en el hidrogel. El tamaño de malla depende del grado de entrecruzamiento, la estructura química de los monómeros y el entorno externo, especialmente estímulos como el pH, la temperatura y la fuerza iónica. El tamaño de malla determina las propiedades físicas del hidrogel, como la fuerza mecánica, la degradabilidad y la difusividad de la molécula liberada.

Además, un hidrogel debe tener propiedades mecánicas relevantes para la aplicación que se le desee dar. Las técnicas generales usadas para evaluar las propiedades mecánicas de un hidrogel son los ensayos de tracción, los ensayos de compresión (confinada y no confinada), los ensayos de hendidura, los ensayos de abombamiento, los ensayos cíclicos y la extensimetría de una tira. En los ensayos tracción, dos pinzas del instrumento agarran el hidrogel y lo someten a fuerzas de tensión. Este experimento aporta datos sobre la tensión-deformación a partir de los cuales se pueden calcular el módulo de Young, el límite elástico y la resistencia a la tracción final. Los ensayos de compresión por su parte miden la distancia de compresión de un hidrogel que se coloca entre dos placas entre las que se aplica presión. Un ensayo de hendidura por su parte determina la fuerza necesaria para provocar una hendidura en el hidrogel mientras que el ensayo de abombamiento mide el desplazamiento resultante del inflado de un hidrogel como resultado de la presión aplicada. Llevar a cabo ensayos cíclicos permite determinar la durabilidad, longevidad y características de deformabilidad. La extensimetría es el ensayo en el que se investigan las características viscoelásticas del hidrogel. Los materiales viscoelásticos almacenan y disipan la energía dentro de la estructura molecular compleja. Esta técnica implica la elongación del gel hasta cierta longitud seguido del registro de la respuesta para la relajación del estrés a lo largo del tiempo.

Estudios de morfología, análisis de la estructura química, la composición, la topología molecular, la determinación del peso molecular, los análisis termales y el estudio de los procesos de gelificación son otros métodos que ayudan a explorar el gel en detalle.

Modificación de las propiedades y capacidad de respuesta a estímulos

La mayoría de los hidrogeles no son estables tanto en estado seco como en el hinchado. En la mayoría de los casos el proceso de secado genera fracturas en el hidrogel. La incorporación de sales higroscópicas de alta densidad dentro de la matriz de hidrogel o la encapsulación del hidrogel en un material elastomérico evita los problemas asociados al proceso de secado. Recientemente se han introducido métodos más efectivos para preparar hidrogeles resistentes tanto al hinchado como al secado.

La capacidad de respuesta a estímulos se puede introducir en el hidrogel para hacer que sea capaz de reaccionar al entorno. La introducción de respuesta a estímulos conduce a aplicaciones muy interesantes como son los repositorios de todo tipo de moléculas. El pH y la temperatura están entre los estímulos externos que se pueden usar en estos sistemas. La incorporación de monómeros catiónicos (por ejemplo, el DMAEMA) o aniónicos (como el AA y el MAA) en el polímero introduce la sensibilidad al pH. Estos monómeros se ionizan o desionizan dependiendo del pH del medio dando lugar a una absorción o eliminación de agua en el hidrogel. Los hidrogeles sensibles a temperatura, por su parte, se hinchan o deshinchán en respuesta a una temperatura crítica. Este comportamiento se debe a cambios en la solvatación de las cadenas de polímero, estado conformacional y solubilidad en agua. Cuando la temperatura aumenta, la solubilidad del polímero disminuye para los hidrogeles con respuesta a una temperatura crítica inferior de disolución (LCST). En contraste, la solubilidad de los hidrogeles poliméricos con respuesta a una temperatura crítica superior de disolución (UCST) aumenta con el incremento de temperatura. Algunos ejemplos de hidrogeles con UCST son los derivados de PAM y PAA y los polímeros zwitteriónicos. Ejemplos de hidrogeles con LCST son el PNIPAM, PDEAM, PVC y PMVE.

Estos hidrogeles que responde a estímulos pueden incluirse en sensores para la detección de determinadas biomoléculas y moléculas de disolvente [248].

2.4.2 Ionogeles

Sin embargo, la aplicabilidad práctica de los hidrogeles en dispositivos microfluídicos está limitada debido a su contracción cuando aumenta la temperatura, baja robustez del material y cinéticas de llenado más bien lentas. El uso de ionogeles, geles poliméricos que incorporan líquido iónico en su matriz polimérica, permite mejorar la robustez de

los sensores que los incorporan. La naturaleza frágil de los hidrogeles convencionales en condiciones ambientales, que provoca problemas durante su almacenamiento, también se puede evitar usando ionogeles. Además, la mayor presión de vapor de los líquidos iónicos y su habilidad para hacer plástica la estructura del gel polimérico mejora la fuerza mecánica del gel.

Los líquidos iónicos han atraído mucho la atención debido a sus potenciales aplicaciones en muchos campos como la química y la industria debido a su estabilidad térmica, menor presión de vapor, alta conductividad iónica y su naturaleza cambiante de hidrófobo a hidrófilo. Incorporar líquidos iónicos en geles poliméricos es también atractivo porque genera materiales con las ventajas inherentes de los líquidos iónicos dentro de una estructura sólida o semi sólida de tipo gel.

Los ionogeles mantienen las propiedades importantes de los líquidos iónicos en una estructura sólida o de tipo gel, permitiendo darles forma, manipularlos e integrarlos, aumentando la aplicabilidad de los líquidos iónicos en áreas como la energía, el medio ambiente y el análisis. Los líquidos iónicos tienen excelentes propiedades que pueden mejorar los dispositivos microfluídicos ya que son materiales de bajo coste y fáciles de obtener. Estos aspectos los hacen candidatos buenos y multifuncionales para mejorar la capacidad de los dispositivos microfluídicos de controlar el flujo, la sensibilidad, el almacenamiento de reactivos, la separación microfluídica, controladores de temperatura, etc. A la par que se reducen los costes de fabricación respecto a los dispositivos convencionales.

Entre los posibles líquidos iónicos a incorporar en los dispositivos microfluídicos se encuentran los que aparecen en la *Tabla 2.6*.

La preparación de ionogeles se suele hacer por fotopolimerización, disolviendo en el líquido iónico elegido el monómero y los comonómeros necesarios junto a un fotoiniciador. Una vez la mezcla ha sido homogeneizada, se tienen dos opciones:

- Colocarla en un molde con el espesor y la forma deseadas para aplicarle la radiación que inicia la polimerización y una vez completado el proceso desmoldar el ionogel y depositarlo sobre el sustrato deseado.

- Añadir la mezcla inicial al sustrato y a continuación irradiarlo para lograr la polimerización.

Tabla 2.6 Ejemplos de líquidos iónicos usados en la síntesis de ionogel.

Nombre del líquido iónico	Abreviatura
Metilsulfato de 1-etil-3-metilimidazolio	[EMIM][MeSO ₄]
Etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazolio	[EMIM][EtSO ₄]
Dicianamida de trihexiltetradecilfosfonio	[P _{6,6,6,14}][DCA]
Cloruro de 1-metil-3-octilimidazolio	[OMIM]Cl
Tetrafluoroborato de 1-hexil-3-metilimidazolio	[HMIM][BF ₄]
Tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio	[BMIM][BF ₄]

Los monómeros y comonómeros empleados en la síntesis de ionogel pueden ser capaces de responder a estímulos, como es el caso del NIPAM o la acrilamida, de manera que esta cualidad esté presente también en el ionogel resultante. La elección del líquido iónico se suele realizar en función de la aplicación que se quiera dar al sensor, distinguiendo aquellos que son hidrófilos de los que son hidrófobos, que producirán efectos opuestos.

La longitud de onda de la luz, la distancia de esta a la mezcla y el tiempo de irradiación dependerán en última instancia de los componentes de la mezcla por lo que deben ser optimizados en cada caso [249].

2.5 Captura y análisis de imagen

2.5.1 Toma de imágenes

La toma de imágenes es una etapa fundamental del proceso de medida en un sensor óptico. Durante esta resulta muy importante tener en cuenta parámetros como la iluminación o los ajustes del dispositivo de medida empleado [250,251].

Hasta la fecha la mayoría de los dispositivos ópticos basados en colorimetría e intensidad han empleado la cámara de un smartphone para tomar imágenes o cuantificar fotones de las muestras directamente. Sin embargo, hay ciertos problemas asociados a usar la

cámara como detector. El primero es que diferentes marcas de telefonía móvil tienen cámaras con características diferentes en términos de número de megapíxeles, sensibilidad del sensor CMOS, calidad de la lente de la cámara, dimensión de apertura, etc. Por tanto, las imágenes tomadas pueden diferir en calidad, lo cual puede dar lugar a resultados erróneos en el sensor colorimétrico. El segundo es el que las imágenes del sensor CMOS pueden tener ruido como cualquier otra medida analítica y este puede reducir la calidad de la imagen, siendo también en este caso el efecto dependiente de la marca del teléfono móvil empleado. Como resultado, la imagen tomada con un smartphone y sus correspondientes canales de color puede ser diferente a la tomada con otro.

Además, otro aspecto a tener en cuenta es que las cámaras de los smartphones están optimizadas para capturar imágenes en condiciones de luz ambientales y estas son difíciles de controlar en muchos casos. La cámara como detector puede funcionar de manera fiable solo a alta concentración de los analitos, a baja concentración el ruido térmico y las señales indeseadas de luz dispersada dentro del compartimento optomecánico puede introducir ruidos indeseables y reducir la ratio señal/ruido en la captura de imágenes. Estos aspectos se han paliado de varias maneras [252]:

- Realizar las medidas en una caja de luz en condiciones de iluminación controladas. En caso de emplear una cámara de fotos, como suele ser habitual en las primeras etapas del desarrollo del sensor, esta puede fijarse mediante un pie de manera que la distancia de la cámara a la zona de detección también permanezca constante.
- Introducir sensores de luz ambiental que realicen correcciones automáticas dependiendo de los cambios en la iluminación.
- Diseñar complementos para el móvil que permitan realizar las medidas en condiciones de iluminación constantes.

Durante el desarrollo de sensores cualquiera de estas tres estrategias es aceptable y da buenos resultados.

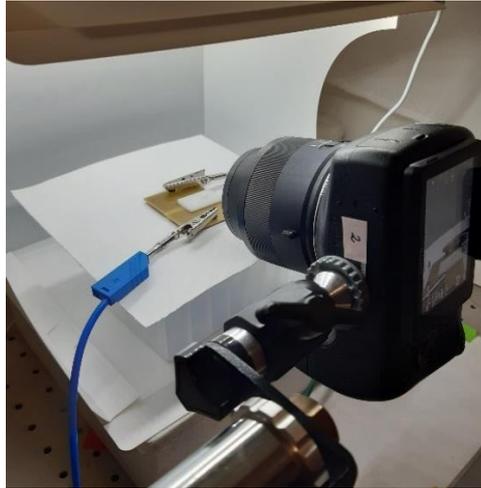


Figura 2.21. *Montaje de captura de imágenes.*

Otro aspecto importante a la hora de realizar medidas con un sensor óptico es fijar los parámetros de la cámara de fotos o del smartphone. En el caso de la cámara de fotos suele ser más fácil ya que están preparadas para realizar ajustes finos de su configuración, no ocurre igual con los smartphones, que suelen hacer correcciones de color automáticas para ajustarse a la iluminación ambiente y requieren en muchos casos diseñar o descargar aplicaciones móviles capaces de fijar parámetros como:

- Balance de blancos
- Brillo
- Zoom
- Resolución de vídeos e imágenes
- Formatos de vídeo e imágenes
- Tasa de bits por imagen
- Temporizador
- Cuadrícula
- Flash
- Exposición

Para esta Tesis se usó la aplicación Open Camera, de código abierto y apta para móviles Android, que permite sustituir la aplicación de la cámara que viene por defecto en el smartphone.

2.5.2 Grabación de vídeos

No en todos los casos resulta posible la detección con una sola imagen, un ejemplo son las medidas de cinéticas. Para este tipo de ensayos suele ser común recurrir a la grabación de vídeos y su posterior análisis extrayendo los fotogramas que sean de interés.

En la mayoría de los casos la grabación de vídeos puede llevarse a cabo con el mismo dispositivo con el que se realiza la toma de imágenes con excepciones como la toma de imágenes a través de un escáner, si bien con la grabación de vídeos resulta más relevante la capacidad de almacenamiento del dispositivo ya que la diferencia de peso de los archivos de vídeo respecto a las imágenes suele ser considerable.

Otro aspecto relevante es la pérdida en resolución de las imágenes en los vídeos respecto a las fotografías, que deberá ser tenida en cuenta en aquellos estudios en los que sea precisa una alta calidad de la imagen pudiendo emplearse la grabación para etapas previas del estudio, pero siendo necesario posteriormente calibrar con fotografías.

2.5.3 Análisis de imágenes: ImageJ

Para el análisis de imágenes se recurrió al software libre ImageJ. En 1987 Wayne Rasband, lanzó “NIH Image”, el predecesor de ImageJ. NIH Image entró en un campo que hasta entonces había estado dominado por softwares de procesado de imágenes muy avanzados que estaban al servicio de informáticos. A pesar de ello, unas pocas características de este programa lo hicieron distinto de sus competidores y estas siguen manteniéndose en la actualidad: la aplicación y el código fuente estaban disponibles gratuitamente, tenía una interfaz de usuario muy sencilla y podía ejecutarse en ordenadores de escritorio. Adicionalmente, como proyecto que da la bienvenida a contribuciones código preprogramado, ImageJ atrae por igual a usuarios y programadores estando muy extendido en el ámbito de los sensores ópticos para el análisis de imágenes [253–255].

La arquitectura de software abierto e inclusivo se hizo ya como diseño, de acuerdo con el pensamiento de Wayne Rasband de que, ya que el NIH se había fundado con dinero público, debía servir al público. Como consecuencia, ImageJ se mantiene como software libre. La funcionalidad del programa puede cambiarse basándose en las necesidades del usuario, su funcionamiento interno puede ser conocido y su arquitectura provee una fuente excelente para aprender cómo implementar algoritmos de procesado de imágenes. Si, por el contrario, ImageJ fuera gratuito pero su código fuente tuviera una licencia restrictiva, el programa esencialmente se convertiría en una caja negra que evitaría que pudiera comprenderse y validarse lo que hace. El concepto es simplemente incompatible con la naturaleza de la investigación.

La accesibilidad de ImageJ hace que sea un recurso ideal para la enseñanza. El ilimitado número de descargas gratuitas evita por otro lado el precio prohibitivo “per seat” de las licencias necesarias para establecer y mantener ordenadores de clase, incluso, los participantes de cursos pueden incluso usar sus propios portátiles, minimizando el esfuerzo para aplicar lo que han aprendido en su trabajo diario. Además, los macros y comandos dedicados a demostrar los conceptos de análisis de imágenes se añaden fácilmente a ImageJ. Los aspectos educativos de ImageJ no se limitan a enseñar los fundamentos del procesado de imágenes con ImageJ, aunque es una de las herramientas más populares para enseñar el desarrollo de los algoritmos de procesado de imágenes porque su arquitectura de código abierto está muy extendida usando comandos escritos en Java.

La comunidad de ImageJ es también un ejemplo para investigar como puede ser más efectivo, estableciendo un foro interdisciplinar donde se difunde el conocimiento y cuestiones que pueden aparentar dificultad para expertos en un campo científico, pero pueden ser fácilmente contestadas por un experto de otra área. La diversidad de especialidades se presenta en la lista de emails de ImageJ, que incluye desde biólogos experimentales hasta astrónomos e informáticos, que permite intercambios educados sobre información científica.

Además, con tan solo el texto de una publicación científica, sería muy engorroso para un grupo independiente reproducir los hallazgos realizados en esta sin tener un acceso fácil

a los mismos materiales y métodos, incluso si estos requisitos se lograsen, seguiría sin haber garantías de que los experimentos pudieran ser reproducidos fielmente [256].

Generalmente, se quiere medir una parte específica de la imagen tomada, no la imagen completa. Las regiones de interés (ROI) se definen como aquellas partes específicas de la imagen que deberían procesarse para obtener una relación entre la variación en uno o una relación de los parámetros de un espacio de color con cambios en la concentración o el avance de nuestro analito [257]. Para analizar una imagen con el software ImageJ se ejecuta el programa, se abre la imagen que se desea analizar con “File” → “Open...” → Y seleccionando de la carpeta deseada. A continuación, se marca la forma deseada del ROI pudiendo elegir entre:

- Rectangular o secciones rectangulares redondeadas
- Ovals, elípticas o de pincel
- Polígonos
- Selecciones a mano alzada

Todos ellos, invariablemente en 2D. Hacer clic derecho en cada uno de estos botones, presentes en la parte izquierda de la barra de herramientas permite variar entre las diferentes opciones ofrecidas para un mismo botón mientras que hacer doble clic derecho en el caso de las selecciones de pincel, nos permite fijar el número de píxeles que se desean seleccionar.

Cuando se dibuja un ROI, presionar la tecla Alt permite dibujar otra forma sobre el dibujo anterior sin que se borre.

Por lo general, solo se puede tener activo un ROI en cada momento, si se precisa analizar varios a la vez, estos pueden almacenarse en el gestor de ROI: Permite almacenar varios ROIs en una lista, permitiendo su acceso, edición y medición fáciles. Se puede abrir a partir de la barra de herramientas eligiendo “Analyze” → “Tools” → “ROI Manager...” o de manera más rápida, dibujando el ROI y presionando la tecla T para guardarlo. En caso de querer que se muestren todos los ROIs de la lista simultáneamente solo es necesario marcar la casilla de “Show All”, abajo en el gestor de ROI. Como las regiones de interés

del gestor de ROIs pueden representarse de manera independiente de la imagen en la que se han definido, se puede crear un ROI en una imagen, añadirlo al gestor, abrir una nueva imagen y clicando sobre el ROI en el gestor lograr que aparezca sobre la segunda imagen justo en la misma posición, con la misma forma y número de pixels. El ROI aplicado siempre se posicionará sobre la imagen más recientemente abierta, en caso de tener varias imágenes abiertas a la vez.

Empleando el gestor de regiones de interés se pueden diseñar regiones de formas más complejas añadiendo o eliminando ROIs. Para hacer esto, primero se añaden los ROIs con los que se quiere trabajar al gestor, después se seleccionan y se eligen entre las opciones:

- AND – Crea un ROI que contiene solo las regiones en las que solapan los ROIs seleccionados
- OR – Crea un solo ROI compuesto por la combinación de todos los seleccionados
- XOR – Crea un solo ROI que contiene todos los ROIs seleccionados excepto las zonas en las que solapan

Solo los pixeles que hayan sido incluidos dentro del ROI dibujado serán analizados. Es por ello que es esencial elegirlo de manera adecuada, procurando reducir el posible error procedente de sombras, zonas poco uniformes de la imagen, reflejos provocados por la iluminación, etc.

Los ROIs individuales pueden guardarse seleccionándolo en el gestor de ROIs y pulsando el comando “More” → “Save...” También es posible hacerlo seleccionando “File” → “Save As” → “Selection...”

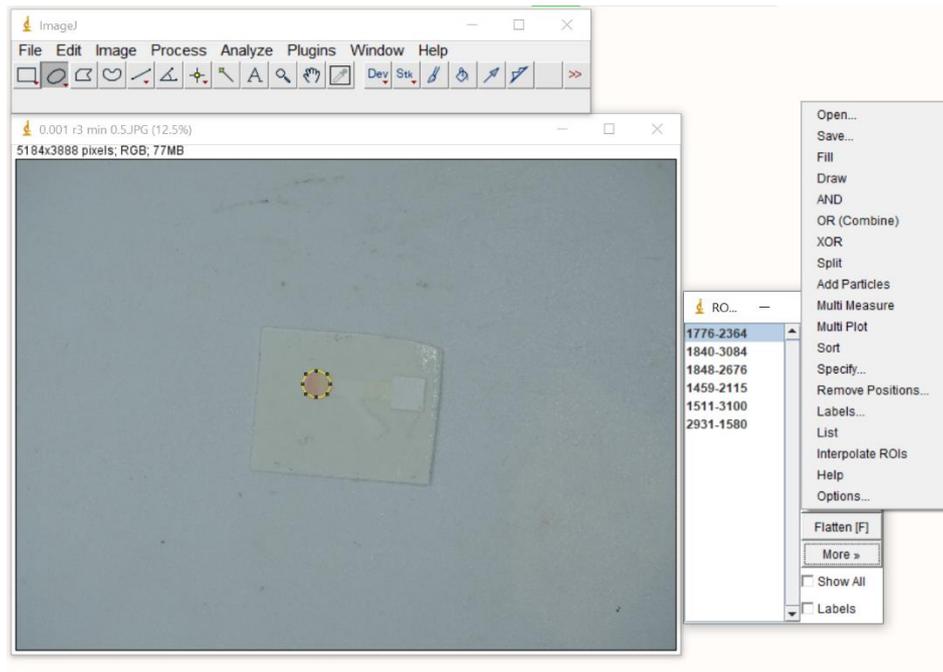


Figura 2.22 Gestor de ROIs en el programa ImageJ.

Estas selecciones funcionan adecuadamente dentro del propio programa o con Fiji pero es improbable que se puedan abrir con cualquier otro software.

Los ROIs también pueden manipularse dentro de la imagen, modificando su tamaño (de pixel en pixel manteniendo pulsada la tecla Alt y la flecha del teclado correspondiente o en general seleccionando y arrastrando uno de los puntos de selección de la figura), ajustando la forma con la herramienta de selección del pincel y moviéndolos de posición (tanto arrastrándolos una distancia grande con el ratón como pixel a pixel con las flechas del teclado).

Una vez seleccionada el área de interés, el principal comando para medir esta en ImageJ es presionar M o en la barra de herramientas “Analyze” → “Measure”. Hacer esto abre una nueva ventana, el cuadro de resultados, que puede presentar diferentes parámetros según lo que se haya seleccionado a través de la pestaña que se abre al ir a “Analyze” → “Set Measurements...” Los más comúnmente usados en esta Tesis han sido: Área, desviación estándar, valor promedio, moda y máximos y mínimos. Es posible también seleccionar el número de decimales con los que se devuelven estas medidas, habiendo tomado en todos los casos 3. Cuando se pulsa M con el ROI dibujado sobre la imagen estos valores promedio, moda, mínimo y máximo se refieren a la coordenada gris. En

caso de desear obtener las coordenadas del espacio de color RGB será preciso ir a “Plugins” → “Análisis de Color” → “RGB Measure”. En la tabla de datos aparecerán R, G y B siempre en este orden, de manera que pueden ser copiados y trasladados a una hoja de Excel en la que serán procesados. Si se prefiere trabajar en otro espacio de color, ImageJ lo permite mediante “Plugins” → “Análisis de Color” → “Color Space Converter”. Se abre una nueva pestaña en la que se permite seleccionar el espacio de color de partida (“from ColorSpace”), que, por lo general, al ser imágenes tomadas con una cámara de fotos, será el RGB; y el espacio de color al que se quiere cambiar (“to ColorSpace”). Entre las posibilidades se encuentran los espacios XYZ, LAB y HSB. Para obtener una imagen por cada coordenada del espacio de color se debe además marcar la casilla “separate images” antes de aceptar (OK) que se apliquen los cambios sobre la imagen. De esta manera se abren 3 imágenes nuevas, cada una de las cuales representa tan solo una de las coordenadas del espacio, de manera que cuando se aplica sobre ella la región de interés y se analiza, los valores corresponden exclusivamente a las variaciones en valor de esa coordenada.

Como todos los resultados, procedan de la imagen que procedan e independientemente del ROI empleado para ello, aparecen reflejados en el mismo cuadro de resultados y puede ser difícil recordar qué medida corresponde a cada imagen, para analistas menos experimentados resulta de interés marcar en “Set Measurements...” la opción “Display label”, que muestra el título de la imagen incluido en la tabla.

Otras opciones a la hora de obtener información de la región de interés son:

- “Analyze” → “Histogram”. Muestra el histograma, es decir, la representación gráfica de la distribución de frecuencia de los valores de los píxeles además de reflejar el número total de píxeles tenidos en cuenta, el valor promedio, la desviación estándar, el valor mínimo, el máximo, la moda y el número de píxeles que tienen el valor de la moda.

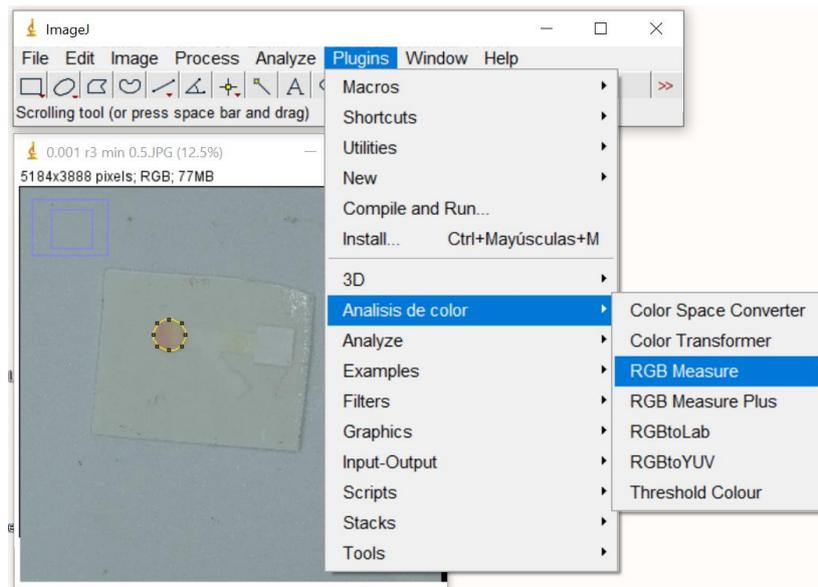


Figura 2.23 Comando para la extracción de las coordenadas RGB del ROI en ImageJ.

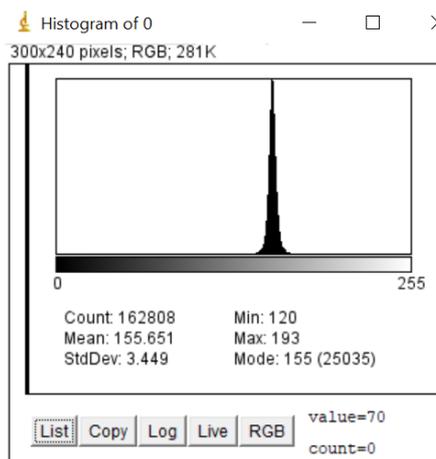


Figura 2.24 Histograma de RGB en el programa ImageJ.

- “Plugins” → “Análisis de Color” → “Threshold colour”. Al ejecutar este comando aparece una ventana en la que se representan un histograma de cada una de las coordenadas del espacio de color en el que se encuentra la imagen y es posible seleccionar un rango de valores para cada una de ellas. Al seleccionar los rangos deseados y pulsar “Select” sólo permanecerán en la imagen los píxeles que se encuentran dentro de los rangos seleccionados, eliminándose de la imagen los demás. De este modo se puede comprobar qué partes de la imagen se salen del rango de valores deseado o normal, haciendo posible identificar zonas poco homogéneas de las membranas.

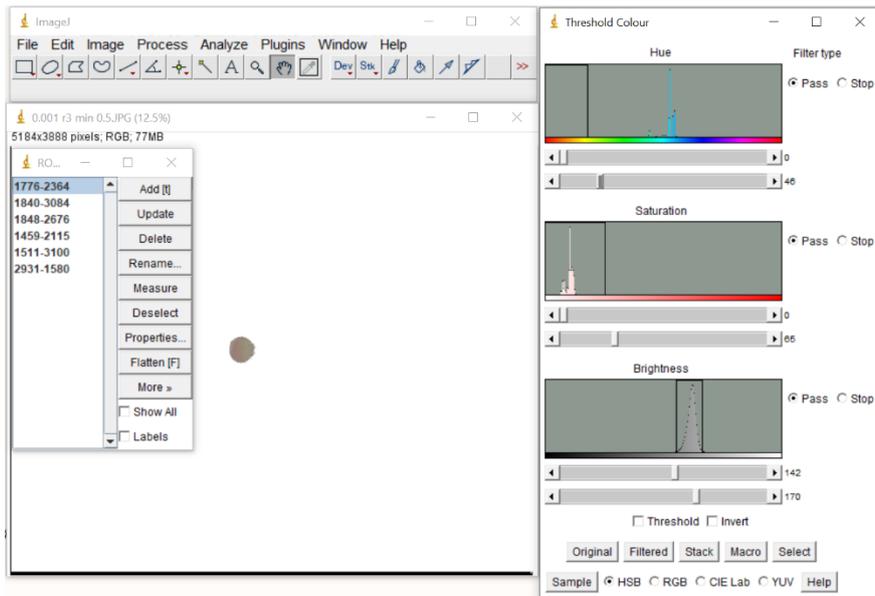


Figura 2.25 Comando para la selección de los umbrales de color en HSV en el programa ImageJ.

Una vez extraídos los datos se procesan en una hoja de Excel o mediante el programa Origin Pro.

2.5.4 Análisis de vídeos

Avidemux es un software libre con una interfaz fácil de usar que consta de los siguientes paneles:

- Barra de menús. Se encuentra en la parte superior del programa y consta de los apartados “Archivo”, “Reciente”, “Editar”, “Vista”, “Vídeo”, “Audio”, “Herramientas”, etc.
- Barra de herramientas. Justo debajo está la barra de herramientas, que permite un acceso rápido a algunos de los comandos más comunes como son “Abrir un vídeo” “Guardar un vídeo”, “Información” y “Reproducir con filtros”.
- Panel de decodificación. Muestra aspectos básicos del decodificador y los formatos de salida del vídeo y el audio.
- Área de visualización. El vídeo se reproduce en el centro de la pantalla, donde se pueden comprobar los cambios que hayan sido realizados.

- Panel de reproducción. A continuación del área de visualización se encuentran los controles que permiten reproducir y detener el vídeo, desplazarse por los diferentes fotogramas y modificar el volumen.

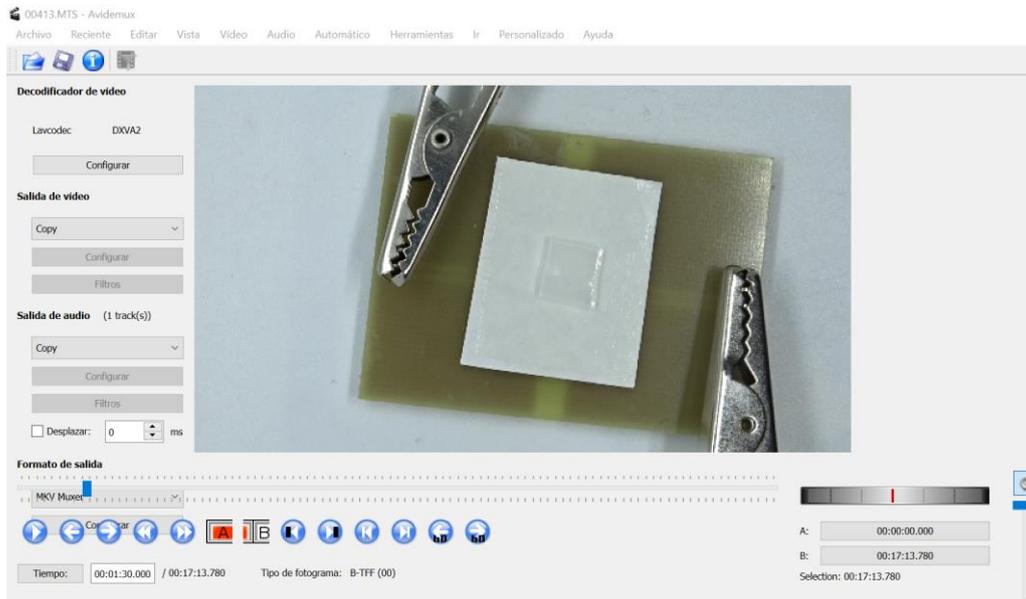


Figura 2.26 Interfaz del programa Avidemux para análisis de vídeos.

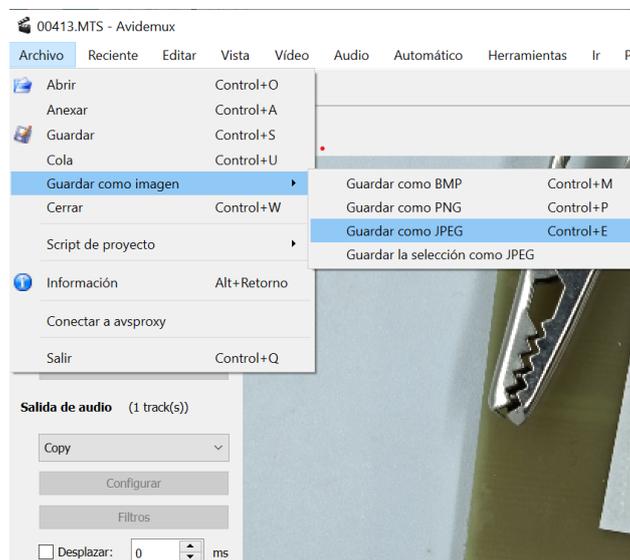


Figura 2.27 Comando de extracción de fotogramas en el programa Avidemux.

Entre los comandos más útiles de Avidemux para el análisis de imágenes se encuentra el comando “Archivo” → “Guardar como imagen” → “Guardar como JPEG”, que permite guardar la imagen en un formato compatible con el software ImageJ previamente

descrito para el análisis de imágenes. Extrayendo fotografías a tiempos fijos resulta posible estudiar la cinética de los procesos que se dan en el dispositivo microfluídico, caracterizar el avance de flujo para una determinada plataforma analítica, etc.

3. Caracterización de materiales empleados en los sensores

3.1 Espectroscopía de absorción UV

La espectroscopía de absorción se refiere a esa que depende del análisis de la radiación absorbida por la muestra. Uno de los ejemplos más comunes es la espectroscopía de absorción de luz ultravioleta/visible.

La espectroscopía UV-vis es una herramienta que puede ser empleada de forma sencilla, con indicadores de pH visibles, pero también de forma compleja para ayudar a monitorizar reacciones orgánicas. Sin embargo, en esta Tesis se ha puesto el foco en la espectroscopía UV-vis para la determinación estructural y los fenómenos correspondientes.

La base de esta técnica es que una molécula puede ser excitada desde el estado fundamental a un estado excitado. Para la radiación electromagnética dentro del rango UV-vis, esto corresponde con la excitación del electrón desde un orbital molecular ocupado a uno no ocupado (u ocupado por un electrón desapareado). La molécula solo absorbe la radiación si la energía de los fotones de luz es la misma que la diferencia de energía entre dos orbitales implicados en la transición de acuerdo con:

$$\Delta E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (\text{Ecuación 2.12})$$

Por lo tanto, para una diferencia mayor de energía entre dos orbitales, se requiere la absorción de luz de longitud de onda más corta. Por este motivo, la absorción de luz en la región UV o visible típicamente corresponde a transiciones de menor energía que implican a los electrones de valencia, originándose en orbitales no enlazantes (pares solitarios) u orbitales π .

Además, es necesario tener en cuenta las reglas de selección que dictan qué transiciones están permitidas y cuales prohibidas. Hay tres reglas de selección que aplicar: (1) un electrón no debe variar su número de espín cuántico durante la transición (2) solo puede excitarse un electrón a la vez y (3) la simetría debe conservarse durante la transición. En la práctica las reglas de selección pueden en algunos casos relajarse. Un ejemplo importante de esto serían las transiciones de los grupos carbonilo que se observan en cetonas y aldehídos como una banda de absorción generalmente débil.

Aunque se usa menos para el análisis estructural que la espectroscopía de resonancia magnética nuclear, la UV-Vis sigue siendo de importancia para un gran número de áreas especializadas, especialmente las que implican compuestos cromóforos distintivos como los colorantes, indicadores y filtros de color. La principal restricción del análisis UV-Vis es que el analito debe ser un cromóforo y las absorciones son características para una familia de compuestos y grupos funcionales.

Cuando se prepara una muestra para análisis UV-Vis se deben considerar varios factores. Quizás los tres más importantes son la celda, la concentración y el disolvente usado. Hay muchos otros factores que pueden afectar al espectro resultante como la temperatura, el pH, parámetros instrumentales (como el ancho de banda), etc.

3.1.1 Celdas

Los espectros UV-Vis se suelen llevar a cabo usando celdas rectangulares (cubetas) que permiten posicionar la muestra en el rayo de luz con un camino óptico definido, típicamente de 1 cm. Las cubetas han sido diseñadas para que la luz atraviese sus paredes con el ángulo correcto. Las cubetas están típicamente hechas de cuarzo fundido de alta calidad (que es ópticamente transparente para longitudes de onda mayores de 170 nm) a pesar de que también son adecuados el vidrio (transparente a partir de los 300 nm) o plástico (transparente en la región visible). Si el instrumento tiene un doble haz, uno de ellos pasa por la cubeta con la muestra y el otro por una cubeta idéntica con el mismo ancho de paso y el mismo disolvente y ambos espectros se graban simultáneamente usándose el segundo como espectro de referencia, que suele ser automáticamente restado al espectro de la muestra por el software del espectrómetro.

Cuando se emplea un instrumento de un solo haz de luz, como en este caso, el espectro de referencia se graba de forma previa a la obtención del espectro de la muestra.

3.1.2 Concentración

La concentración de la muestra es muy importante debido a la capacidad de detección del instrumento. Para obtener una señal detectable, se requiere una muestra lo suficientemente concentrada. Sin embargo, una serie de problemas químicos e instrumentales pueden derivarse de emplear concentraciones más altas así que se suele tener en cuenta la regla no escrita de que los valores de absorbancia no deben exceder el 2.

Tabla 2.7 Longitudes de onda límite para la absorción de disolventes comunes en espectroscopía.

Disolvente	Longitud de onda (nm)
Agua	180
Acetonitrilo	190
n-Hexano	190
Ciclohexano	190
Metanol	205
Etanol	205
Tetrahidrofurano (THF)	215
Dimetil éter	220
Diclorometano	232
Cloroformo	245
Tetracloruro de carbono	280

3.1.3 Disolvente

El disolvente usado para la preparación de muestra debe producir la completa disolución de la muestra y no absorber en la región de longitudes de onda de interés, ya que esto llevaría a que las bandas de absorción de la muestra queden eclipsadas. Las longitudes de onda límite para la absorción de los disolventes más comunes en espectroscopía se recogen en la *Tabla 2.7*.

Aunque debería tenerse en cuenta que la longitud de onda exacta dependerá también de la pureza del disolvente empleado.

3.1.4 Solvatocromismo

El solvatocromismo ocurre cuando las moléculas de disolvente interaccionan con moléculas de soluto y estabilizan uno o ambos de los orbitales implicados en la transición electrónica, afectando por tanto a la longitud de onda de la absorción máxima, $\lambda_{\text{máx}}$. De acuerdo con el principio de Franck-Condon, el movimiento de los núcleos tiene una escala de tiempo mucho más lenta que la de los electrones. Por tanto, durante la excitación electrónica, las moléculas de disolvente no tienen tiempo de reorientarse dando lugar a un estado excitado del soluto que experimenta la esfera de coordinación de disolvente. El efecto de esto puede verse en las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$, donde el estado excitado está mucho más polarizado que el estado fundamental. Aquí, el disolvente polar ayuda a la estabilización del estado excitado y reduce el salto de energía. El resultado de esto es un efecto batocrómico de $\lambda_{\text{máx}}$ hacia una longitud de onda más larga con los disolventes polares como el etanol. En contraste, para las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ del grupo C=O, el estado fundamental está más polarizado que el estado excitado, resultando en un mayor salto de energía debido a la desestabilización del estado excitado en presencia de disolventes polares y por tanto, hay un cambio hipsocrómico, hacia longitudes de onda más cortas. Cuando esta variación se da en la región del visible, el cambio debido al disolvente se aprecia a simple vista.

3.1.5 Fuentes de error

La fuente de error más común cuando se obtiene un espectro UV-Vis no es el instrumento, sino la preparación de la muestra. Idealmente, la muestra es una disolución de un solo compuesto, pero esto no siempre es cierto. Si la muestra, por ejemplo, contiene impurezas, estas pueden contribuir a la absorción UV-vis. Para reducir las potenciales fuentes de error debidas a la concentración se debe asegurar que los volúmenes y pesos se pueden medir adecuadamente y asegurarse de que las muestras preparadas son auténticas disoluciones, ya que de otra manera habrá más dispersión de luz que absorción. También se debe tener cuidado a la hora de elegir los parámetros adecuados para la recolección de datos. Ciertos compuestos requieren la recolección de varios espectros para una caracterización fiable. Por ejemplo, bandas más estrechas pueden requerir la determinación de la estructura fina o absorciones de banda más débiles pueden requerir mayores concentraciones de muestra. El número de espectros adquiridos debe ser tal que asegure una buena relación señal: ruido. En vez de recopilar un espectro completo de forma repetida durante un periodo de tiempo, suele ser más conveniente monitorizar el cambio en absorbancia a una o varias longitudes de onda salvo que se trate de seguir las variaciones de indicadores de pH.

3.1.6 Interpretación del espectro

La identificación de un cromóforo en una molécula se logra fácilmente cuando la estructura de la molécula es conocida, esto es, cuando se ha determinado por combinación de otras técnicas, en este caso con el espectro de resonancia magnética nuclear (RMN). Sin embargo, cuando la estructura de la molécula no ha sido resuelta antes de interpretar el espectro UV-vis, la tarea resulta mucho más difícil.

La complejidad y extensión en la que el espectro se encuentra en la región visible se debe considerar. Cuanto más se encuentra dentro de la región visible o la banda de absorción se extiende, más probable es que aumente la conjugación. Por ejemplo, dos bandas de absorción por debajo de los 300 nm sugieren dos o tres unidades conjugadas pero la absorción a longitudes de onda más largas indica un mayor grado de conjugación. El número de absorbancia máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) y su correspondiente intensidad (absortividad molar) da información útil. La posición de $\lambda_{\text{máx}}$ se relaciona con la energía del estado de

transición y la intensidad es constante para cualquier molécula a cualquier longitud de onda dada y puede ser característica del cromóforo. Para ayudar a la interpretación del espectro UV-vis es útil tener un espectro de un compuesto modelo que se pueda usar para establecer aspectos estructurales comunes [258].

3.1.7 Reglas empíricas

Las reglas se establecieron por primera vez por Woodward, quien se dio cuenta de que la posición de la banda más amplia en el espectro UV-Vis estaba relacionada con los sustituyentes presentes para una familia de compuestos relacionados. A partir de las relaciones de longitud de onda que se presentan en la *Tabla 2.8* se pueden identificar a qué grupos funcionales y transiciones corresponden algunos picos en los espectros de UV-visible.

Cuando la luz monocromática de una cierta intensidad, I_0 , pasa a través de una muestra, parte de la luz puede ser absorbida y otra será transmitida con una intensidad I . La transmitancia de luz a través de la muestra, T , se define como la ratio de intensidades de la luz incidente y la transmitida.

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (\text{Ecuación 2.13})$$

Normalmente la transmitancia se muestra como un porcentaje de transmitancia, %T, donde:

$$\% T = 100 T \quad (\text{Ecuación 2.14})$$

Aunque es más común pensar en que la muestra absorbe luz, más que transmitirla. Por tanto, la absorbancia puede definirse como sigue:

$$A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) = \log \left(\frac{1}{T} \right) = -\log (T) \quad (\text{Ecuación 2.15})$$

Puede demostrarse que la absorbancia de la luz por una muestra aumenta con la cantidad de medio absorbente que tiene que atravesar la luz a su paso, es decir,

conforme el ancho de paso, l , aumenta. Esto comúnmente se conoce como ley de Lambert.

Tabla 2.8 Longitudes de onda en las que se produce cada transición electrónica de los grupos cromóforos.

Cromóforo	Transición electrónica	Longitud de onda	Ejemplos
C-C y C-H	$\sigma \rightarrow \sigma^*$	150	Alcanos
-O-	$n \rightarrow \sigma^*$	185	Éteres, alcoholes
-N<	$n \rightarrow \sigma^*$	195	Amidas
-S-	$n \rightarrow \sigma^*$	195	Tioles
C=O	$n \rightarrow \pi^*$	280	Cetonas
	$n \rightarrow \sigma^*$	185	
	-	160	
R-NO ₂	-	274	Compuestos nitro
		200	
C≡N	-	165	Compuestos ciano
C=C	$\pi \rightarrow \pi^*$	175	Alquenos
C≡C	-	223	Alquinos
		195	
		175	
C=C-C=C	$\pi \rightarrow \pi^*$	270-415	Polienos No aromáticos Aromáticos Dienos conjugados
	$\pi \rightarrow \pi^*$	350-445	
	$\pi \rightarrow \pi^*$	210-280	
C=C-C=O	$\pi \rightarrow \pi^*$	315	Enonas
C=C-C≡C	$\pi \rightarrow \pi^*$	230	
		220	
C≡C-C≡C	$\pi \rightarrow \pi^*$	207-400	
		250-394	
Benceno	$\pi \rightarrow \pi^*$	255	Aromáticos

La dependencia con el ancho de paso se debe esencialmente al aumento de moléculas que absorben radiación en el camino de la luz. Por tanto, la absorbancia es también

linealmente dependiente de la concentración de muestra, c . Esta relación se conoce como ley de Beer.

La combinación de estas dos reglas da como resultado la ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon cl \quad (\text{Ecuación 2.16})$$

Donde ϵ es la absorptividad molar, constante para una molécula dada a una cierta longitud de onda.

3.2 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear es una técnica espectroscópica que se ha desarrollado como una de las herramientas analíticas más útiles y versátiles. Permite la visualización de átomos simples y moléculas en varios medios en disolución además de en estado sólido por lo que es fundamental en la elucidación estructural de indicadores, compuestos orgánicos y biomoléculas y el seguimiento de la cinética de ciertas reacciones. Además, permite la cuantificación simultánea y sin destrucción de la muestra. Las interacciones magnéticas entre los núcleos RMN-activos a lo largo de enlaces covalentes resulta en acoplamientos espín-espín (nJ -). Las interacciones a través del espacio pueden detectarse usando el efecto Overhauser (NOE). Ambas interacciones permiten la elucidación de la estructura tridimensional [259].

Quizás lo primero que llame la atención acerca de la espectroscopía RMN es que al contrario que las de infrarrojo, la de UV o la de rayos X, similares todas a ella, el nombre de esta espectroscopía no hace alusión a la región del espectro en la que se da la absorción o emisión. De hecho, para poder entender esta técnica es necesario plantear antes las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos.

Los núcleos activos en RMN se caracterizan por ser capaces de sufrir magnetización nuclear, es decir, que son afectados por la presencia de un campo magnético externo [260].

Los protones y neutrones, al igual que los electrones, poseen un momento angular intrínseco de $\frac{1}{2}$ conocido como espín. Los momentos angulares orbital y de espín de cada uno de los nucleones se combinan vectorialmente en un momento angular de espín nuclear, I . I puede pensarse como un vector cuya dirección y magnitud están cuantizadas. En la representación de este vector I tienen una longitud:

$$\sqrt{I(I + 1)}\hbar \quad (\text{Ecuación 2.17})$$

y $2I+1$ proyecciones permitidas sobre el eje elegido, llamado z . Es decir, la proyección de I sobre el eje z está cuantizada

$$I_z = m\hbar \quad (\text{Ecuación 2.18})$$

donde m es el número cuántico magnético y presenta $2I+1$ valores comprendidos entre $+I$ y $-I$ tal que: $m = I, I - 1, I - 2, \dots, -I$.

Así pues, I toma alguno de los siguientes valores: $I = 0, \frac{1}{2}, 1, \frac{3}{2}, 2, \dots$, con valores superiores a $\frac{7}{2}$ siendo bastante poco comunes. Es interesante resaltar que para isótopos de un mismo elemento tienen números cuánticos diferentes y que algunos núcleos muy comunes como el ^{12}C o el ^{16}O tienen $I=0$ y esto hace que no tengan momento angular ni magnético.

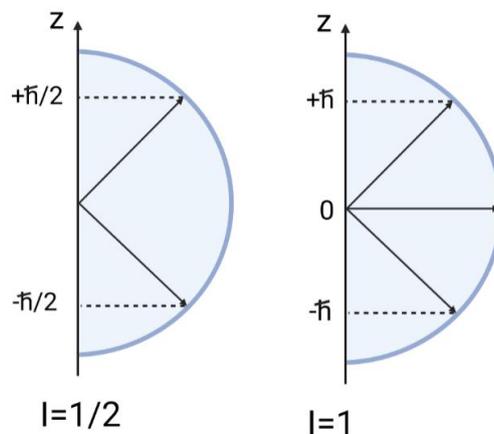


Figura 2.28 Representación de la cuantización del momento angular de espín nuclear.

El valor del espín nuclear no puede predecirse exactamente, pero existen reglas empíricas que permiten relacionar su valor con el número de protones y neutrones presentes en el núcleo:

Tabla 2.9 Relación entre el número de protones y neutrones y el momento angular de espín nuclear.

Número de protones	Número de neutrones	I
Par	Par	0
Impar	Impar	Entero ≠0
Par	Impar	Semientero
Impar	Par	

El momento angular de espín nuclear origina, como el electrónico, un momento dipolar magnético nuclear μ_I dado por:

$$\mu_I = g_N \frac{e}{2m_p} I = g_N \frac{\mu_N}{\hbar} I \quad (\text{Ecuación 2.19})$$

Donde g_N es el factor g nuclear y solo puede determinarse experimentalmente para cada núcleo ya que engloba las diferencias de masa y carga del núcleo frente al protón.

La expresión se puede simplificar a: γI donde γ es el cociente giromagnético.

Si sobre el núcleo actúa un campo magnético de intensidad B, el dipolo magnético sufre un par de fuerzas τ dado por:

$$\tau = \mu_I \times B \quad (\text{Ecuación 2.20})$$

Que tiende a alinear el dipolo con el campo magnético. Para esta interacción la energía estará dada por:

$$E_{int} = -\mu_I \cdot B = -\gamma I_z B \quad (\text{Ecuación 2.21})$$

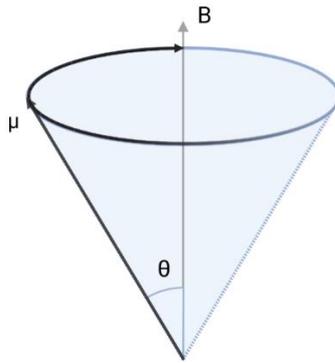


Figura 2.29 Interacción entre un campo magnético, B , y el momento dipolar, μ .

Si el sistema no es capaz de disipar esta energía, el dipolo magnético no puede alinearse con el campo magnético y describe un movimiento de precesión (precesión de Larmor) en torno a la dirección del campo aplicado.

Aplicando el Hamiltoniano de interacción correspondiente nos queda:

$$\hat{H}\psi = -\gamma B \hat{I}_z \psi = E\psi \quad (\text{Ecuación 2.22})$$

$$E_{m_I} = -g_N \mu_N B m_I \quad m_I = -I, -I + 1, \dots, I - 1, I \quad (\text{Ecuación 2.23})$$

La energía se desdobra en tantos niveles como valores puede tomar el número cuántico de espín nuclear m_I .

Suponiendo el caso más sencillo, un protón, $I = 1/2$. El protón puede estar en cualquiera de sus dos estados de espín nuclear, uno con $m_I = -1/2$ y el otro con $m_I = +1/2$. En ausencia de campo magnético estos dos estados estarían degenerados, tendrían la misma energía. Sin embargo, al aplicar el campo externo los niveles de energía se separan, el de estado $m_I = -1/2$ aumenta su energía $E(m_I = +g_N \mu_N B/2)$ y el de estado $m_I = +1/2$ disminuye su energía en $E(m_I = -g_N \mu_N B/2)$ de manera que si se hace incidir radiación con la energía adecuada:

$$\Delta E = h\nu = \gamma \hbar B \quad (\text{Ecuación 2.24})$$

Se pueden inducir transiciones entre los niveles de energía de espín desdoblados del protón. Esas transiciones son las que aparecen en los espectros de RMN.

La frecuencia, por tanto, aumentará linealmente con el campo magnético aplicado. Los campos magnéticos usados habitualmente en RMN varían en intensidad entre 1.4 y 17.5 teslas, dando como resultado frecuencias protónicas que van desde 60 hasta 750 MHz.

Además, es necesario tener en cuenta las reglas de selección. Para que una transición ocurra en RMN debe cumplir: $\Delta m_l = \pm 1$, es decir, que las transiciones permitidas son aquellas que ocurren entre niveles de energía adyacentes, dependiendo las frecuencias solamente del campo magnético aplicado y del cociente giromagnético.

Según esto todos los núcleos de un mismo isótopo de un elemento deberían absorber a la misma frecuencia. Sin embargo, las frecuencias de resonancia dependen también del entorno electrónico del núcleo de hidrógeno dentro de la molécula. Ese efecto es el conocido como desplazamiento químico y es la que hace que la RMN sea tan útil para distinguir grupos funcionales presentes en la molécula.

El desplazamiento químico es resultado de que el campo magnético externo, B_0 , que se aplica sobre los núcleos produce una pequeña corriente en los electrones que rodean a cada núcleo. Esa corriente genera a su vez un campo magnético adicional sobre los núcleos que en la mayoría de los casos se opone al externo siendo la relación entre ambos:

$$B' = -\sigma B_0 \quad (\text{Ecuación 2.25})$$

Donde σ es la constante de apantallamiento, que depende del entorno químico de cada núcleo. La constante de apantallamiento es el resultado de dos contribuciones, una diamagnética y otra paramagnética. La contribución diamagnética es la que tiene lugar en el estado fundamental de la molécula debida a las corrientes electrónicas por lo que depende de la densidad electrónica que rodea al núcleo y siempre se opone al campo magnético externo. El apantallamiento paramagnético por su parte es debido a las distorsiones en la nube electrónica asociadas a estados excitados y contribuye a reducir el campo magnético B' . Las contribuciones paramagnética y diamagnética actúan en

sentidos opuestos. Para ^1H predomina el término diamagnético ya que solo existen orbitales s, sin embargo, para el ^{13}C , que es de mayor tamaño, influye más el término paramagnético.

La constante de apantallamiento es adimensional e influye en la condición de resonancia. Cuanto más apantallado se encuentra un núcleo, menor B'. Debido a que las frecuencias de las señales dependen del campo externo aplicado, no se puede definir una escala absoluta de frecuencias y se debe tomar un compuesto de referencia. El más utilizado es el tetrametilsilano (TMS) para espectroscopías RMN de ^1H y ^{13}C . El desplazamiento químico del tetrametilsilano se toma por tanto como 0 el del resto de núcleos como la diferencia entre el campo que experimenta cada núcleo y el experimentado por el tetrametilsilano.

Tabla 2.10 Desplazamientos de las señales de protón en RMN.

Grupo funcional	Desplazamiento químico de la señal de ^1H													
Amidas														
Ácido carboxílico														
Fenoles														
Alcoholes														
Aminas														
Halogenados														
Aldehídos														
Aromáticos														
Éter														
Alquinos														
Arilo														
Cetona														
Alquenos														
Alcanos														
ppm (respecto al TMS)	1 2	1 1	1 0	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0	

Las señales medidas en RMN suelen constar de una estructura fina que puede ser de singlete, doblete, triplete, cuádruplete o multipletes dependiendo del número de señales que englobe. Esta estructura fina es el resultado de la interacción con núcleos vecinos que poseen momento magnético (acoplamiento espín-espín), sean homonucleares (entre núcleos del mismo tipo) o heteronucleares (núcleos de elementos diferentes). Para dos núcleos acoplados que tengan el mismo espín nuclear de $\frac{1}{2}$ hay cuatro niveles energéticos posibles. En ausencia de interacción espín-espín para dos núcleos acoplados se dan dos absorciones isoenergéticas, pero a través del acoplamiento J se termina con esa degeneración. Cuando ambos núcleos poseen la misma disposición de espín J tiene signo positivo y la energía aumenta por el acoplamiento. Cuando la disposición de espín sea la contraria la energía disminuirá en la misma extensión. En ambos casos los dos singletes de los núcleos correspondientes a la resonancia entre sí se desdobl原因 de dobletes. La magnitud del desdoblamiento se encuentra descrita por la constante de acoplamiento J, la cual se puede obtener directamente de la separación entre las dos líneas correspondientes a un mismo núcleo.

Las constantes de acoplamiento son independientes de la magnitud del campo magnético aplicado por lo que podemos distinguir las señales de dos singletes de núcleos no acoplados con diferente desplazamiento químico respecto a un doblete registrando dos espectros a diferentes frecuencias de medida. En el caso de que sean singletes la separación aumentará, pero no así en el caso de que sean un doblete.

Los acoplamientos entre núcleos se dan a través de los enlaces de la molécula (acoplamiento escalar. Si tiene lugar a través de un único enlace, se trata de un acoplamiento directo y recibe el nombre de acoplamiento vecinal o geminal cuando el acoplamiento se transmite 2 o 3 enlaces. Como es lógico, J disminuye al aumentar el número de enlaces entre los dos átomos y la complejidad de los acoplamientos aumenta cuando lo hace el número de núcleos que se acoplan.

La caracterización espectroscópica de H-RMN y C-RMN se llevó a cabo a temperatura ambiente con un espectrómetro Varían Direct Drive 400 MHz. Los desplazamientos químicos se expresan utilizando la resonancia del disolvente como patrón (CDCl_3 a 7.26 ppm y 77.16 ppm) [261–263].

Tabla 2.11 Desplazamiento de las señales de C-13 en RMN.

Grupo funcional	Desplazamiento químico de la señal de ^{13}C											
Cetona	■	■	■									
Aldehído		■										
Carboxílico		■	■	■								
Éster				■	■							
Amida				■	■							
Unido a I											■	■
Unido a Br									■	■	■	■
Unido a Cl									■	■	■	■
Unido a N										■	■	
Unido a O									■	■	■	
Bencénico				■	■	■	■	■				
Alqueno						■	■	■	■			
Alquino								■	■	■		
Alcano cuaternario											■	
Alcano terciario										■	■	■
Alcano secundario											■	■
Alcano terciario												■
(ppm respecto al TMS)	220 -200	200 -180	180 -160	160 -140	140 -120	120 -100	100- 80	80 -60	60 -40	40 -20	20 -0	

3.3 Medida de densidad de disoluciones

La medida de la densidad de las disoluciones empleadas se realiza mediante un picnómetro de Gay-Lussac en un método no destructivo y sencillo de realizar.

Para ello se siguen los siguientes pasos:

- a) Se anota el peso del picnómetro seco y vacío
- b) Se llena un vaso con agua y se toma la temperatura de esta



Figura 2.30 Picnómetro de 5 mL de la casa comercial Probus.

- c) Se vierte agua en el picnómetro hasta un tercio de la parte superior del esmerilado sin que se formen burbujas
- d) Se introduce el tapón del picnómetro con firmeza de manera que el tubo capilar de este se llene y el excedente de líquido se desborde
- e) Se seca la superficie externa del picnómetro sin absorber agua del capilar en el proceso, de manera que esta se mantenga enrasada
- f) Se pesa el picnómetro con el agua
- g) Se resta el peso del picnómetro vacío al peso del picnómetro lleno de agua
- h) El proceso se repite añadiendo otras disoluciones y se encuentra que la densidad está dada por:

$$\rho_l = \frac{m_l}{m_a} \cdot \rho_a \quad (\text{Ecuación 2.26})$$

Donde ρ_l es la densidad que se quiere hallar, m_l la masa del picnómetro con el líquido menos la masa del picnómetro lleno (es decir, la masa de disolución de interés), ρ_a es la densidad del agua a la temperatura medida y m_a es la masa de agua calculada como se explica en el punto g.

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Figura 2.1</u> Cortadora láser Rayjet cortando vinilo blanco.	126
<u>Figura 2.2</u> Software de configuración de parámetros de grabado y corte en Rayjet Commander.	127
<u>Figura 2.3</u> Plotter de corte X-Y de la casa comercial Secabo GmbH.	128
<u>Figura 2.4</u> Laminadora térmica de la casa comercial PrideMatik.	130
<u>Figura 2.5</u> Esquema del método plano-plano de serigrafía.	131
<u>Figura 2.6</u> Serigrafiado de un sustrato plano de papel con tinta de plastisol.	132
<u>Figura 2.7</u> Proceso de emulsión de la pantalla de serigrafía.	137
<u>Figura 2.8</u> Proceso de secado de la emulsión de serigrafía en horno.	139
<u>Figura 2.9</u> Proceso de eliminación de emulsión de la pantalla de serigrafía.	142
<u>Figura 2.10</u> Equipo de sping coating de la casa comercial Laurell Technologies Corporation.	143
<u>Figura 2.11</u> Etapas del proceso de formación de una membrana por spin coating.	144
<u>Figura 2.12</u> Sistema corona de la casa comercial Tantec.	149
<u>Figura 2.13</u> Impresora 3D de extrusión de filamento de la casa comercial Witbox.	154
<u>Figura 2.14</u> Impresora 3D de estereolitografía. 1. Cartucho de resina. 2. Luz de estado. 3. Cubierta. 4. Plataforma de construcción. 5. Tanque de resina. 6. Pantalla táctil. 7. Luz de estado. 8. Disco de nivel.	155
<u>Figura 2.15</u> Esquema de reacción de formación de un sol-gel de silicio.	160
<u>Figura 2.16</u> Unidad de repetición en el polímero pullulan.	161
<u>Figura 2.17</u> Unidad de repetición del polímero de quitosan.	162
<u>Figura 2.18</u> Colapso del NIPAM hidrogel con liberación de disolución.	163
<u>Figura 2.19</u> Estructura química de la N-metilenbisacrilamida.	163
<u>Figura 2.20</u> Soporte de gelificación de la casa comercial Bio-Rad.	166
<u>Figura 2.21</u> Gestor de ROIs en el programa ImageJ.	179
<u>Figura 2.22</u> Comando para la extracción de las coordenadas RGB del ROI en ImageJ.	181
<u>Figura 2.23</u> Histograma de RGB en el programa ImageJ.	181
<u>Figura 2.24</u> Comando para la selección de los umbrales de color en HSV en el programa ImageJ.	182
<u>Figura 2.25</u> Interfaz del programa Avidemux para análisis de vídeos.	183
<u>Figura 2.26</u> Comando de extracción de fotogramas en el programa Avidemux.	183
<u>Figura 2.27</u> Representación de la cuantización del momento angular de espín nuclear.	192
<u>Figura 2.28</u> Interacción entre un campo magnético, B , y el momento dipolar, μ	194
<u>Figura 2.29</u> Picnómetro de 5 mL de la casa comercial Probus.	199

ÍNDICE DE TABLAS

<u>Tabla 2.1</u> Relación de reactivos utilizados en esta Tesis Doctoral.	111
<u>Tabla 2.2</u> Relación de disolventes empleados en esta Tesis Doctoral.	112
<u>Tabla 2.3</u> Relación de gases empleados en esta Tesis Doctoral.	113
<u>Tabla 2.4</u> Relación entre el número de hilos de la malla de serigrafía.....	140
<u>Tabla 2.5</u> Monómeros comunes para la síntesis de hidrogeles.	164
<u>Tabla 2.6</u> Ejemplos de líquidos iónicos usados en la síntesis de ionogeles.....	172
<u>Tabla 2.7</u> Longitudes de onda límite para la absorción de disolventes comunes en espectroscopía.....	186
<u>Tabla 2.8</u> Longitudes en las que se produce cada transición electrónica de los grupos cromóforos.	190
<u>Tabla 2.9</u> Relación entre el número de protones y neutrones y el momento angular de espín nuclear.....	193
<u>Tabla 2.10</u> Desplazamientos de las señales de protón en RMN.....	196
<u>Tabla 2.11</u> Desplazamiento de las señales de C-13 en RMN.....	197

CAPÍTULO 3

WIRELESS WEARABLE WRISTBAND FOR CONTINUOUS pH MONITORING

CAPÍTULO 3: WIRELESS WEARABLE WRISTBAND FOR CONTINUOUS SWEAT pH MONITORING

Planteamiento

Los sensores Point-of-Care están ganando cada vez más interés como alternativa a los tests de laboratorio convencionales para la determinación de iones, proteínas, antígenos, hormonas, etc. En particular, las plataformas microfluídicas basadas en tela, hilo y papel son muy adecuadas para el análisis *in situ* de contaminantes medioambientales, el envasado inteligente de alimentos y el control de especies relacionadas con la salud y el rendimiento deportivo.

Durante un entrenamiento o una competición deportiva, el pH del sudor puede variar de acuerdo con el estado de hidratación del cuerpo. No beber suficiente agua durante una competición puede llevar a un atleta a sentirse mareado, experimentar dolores de cabeza, confusión e incluso calambres musculares. Pero la situación opuesta también es problemática. Un exceso de agua puede provocar que los niveles de sodio sean demasiado bajos, lo cual da lugar a síntomas similares a los de la deshidratación por lo que el control en continuo del pH del sudor se ha convertido en un aspecto de interés para uno de nuestros sensores.

Es por ello que se ha desarrollado una pulsera para la medida en continuo del pH del sudor que se conecta sin necesidad de cables a una aplicación del Smartphone. Esta pulsera está constituida por dos partes fundamentalmente: Un μ CAD en el que tiene lugar la química de reconocimiento y un módulo para la lectura óptica y la transmisión de datos.

La zona de muestreo del μ CAD se encuentra en contacto con la superficie de la piel, recogiendo el sudor conforme este se genera y guiándolo por capilaridad hacia la zona de detección, donde se encuentra retenido covalentemente el indicador AD-VS-1. Esta unión entre la celulosa y los grupos vinilsulfónicos del indicador y la completa reversibilidad del indicador suponen un avance claro en tanto que garantizan que no habrá pérdidas de intensidad significativas por efectos de lavado del indicador con el paso continuo de fluido y que será capaz de percibir igualmente variaciones de pH ascendentes y descendentes. Además, el μ CAD incluye un parche absorbente que retira

la muestra ya analizada permitiendo el funcionamiento en continuo del sensor durante al menos 17 horas.

Los cambios de color se cuantifican en el módulo de lectura, el cual ilumina la zona de detección con un LED blanco para garantizar la reproducibilidad en la iluminación, un factor determinante a la hora de realizar análisis colorimétricos. Un sensor de color cuantifica en coordenadas RGB el color que toma la zona de detección y mediante Bluetooth esta información es transmitida a una aplicación de Smartphone. Una vez que la aplicación recibe los valores de RGB, los traduce a la coordenada H del espacio de color HSV y finalmente, gracias a una función de calibrado, se relaciona esta con los valores de pH correspondientes. Se encontró que la relación entre H y pH se ajusta a una ecuación de Boltzmann ($R^2 = 0.997$) con un rango de uso comprendido entre pH 6 y 8, los cuales incluyen el rango de pH habitual del sudor, con una precisión a diferentes valores de pH entre el 3.6 y el 6.0%. El LED, el Bluetooth y el sensor de color fueron optimizados para consumir lo mínimo posible durante su funcionamiento y, acompañados de una batería recargable, permiten que la pulsera tenga una autonomía de 2.63 días. El peso del dispositivo es similar al de algunas marcas comerciales conocidas como son Fitbit o Garmin y se comprobó que resultase cómodo de utilizar durante la actividad física.

Objetivo

El objetivo del primer capítulo de esta Memoria es desarrollar un dispositivo vestible de tela capaz de medir las variaciones de pH que experimenta el sudor durante la actividad física mediante un indicador colorimétrico retenido covalentemente y módulo de procesado de la lectura que incluye un sensor de color digital, una batería que permite el funcionamiento autónomo del dispositivo, un LED para lograr la iluminación controlada y un módulo de Bluetooth para enviar los datos recopilados a un Smartphone.

Para lograr este objetivo se trabajó en colaboración con el Grupo de Investigación FQM-208, que pertenece al Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Granada, quienes llevaron a cabo la síntesis y caracterización del indicador (E)-2,6-dimetoxi-4-((4-((2-vinilsulfonil)etil)tio)fenil)diazenil) fenol (AD-VS-1). A continuación, se procedió a diseñar y optimizar el μ CAD para adecuarlo al funcionamiento en continuo con pequeños volúmenes de muestra. Además, se estudió la estabilidad del sensor, su reversibilidad y su funcionamiento frente a medidas tomadas con un pH-metro calibrado. Paralelamente, los miembros de ECsens pertenecientes al Departamento de Ingeniería Electrónica desarrollaron un módulo de lectura capaz de aportar condiciones de iluminación reproducibles, medir el color y enviar los datos de tonalidad a una aplicación de Smartphone que los traduce a valores de pH.

Las etapas de las que consta este trabajo pueden resumirse en:

1. Síntesis del indicador AD-VS-1
2. Diseño y fabricación del μ CAD
3. Desarrollo del módulo de lectura y aplicación de Smartphone
4. Optimización del μ CAD para la determinación de pH en continuo
5. Caracterización analítica del método propuesto
6. Determinación de pH durante la actividad física

WIRELESS WEARABLE WRISTBAND FOR CONTINUOUS pH MONITORING

Abstract

Several studies have shown that the determination of pH in sweat, which is one of the most accessible body fluids, can be an indicator of health and wellness, and even be used for potential disease diagnosis. On that basis, we present herein a wearable wristband for continuous and wireless monitoring of sweat pH with potential applications in the field of personal health assessment. The developed wristband consists of two main parts: a microfluidic cloth analytical device to collect continuously the sweat from skin with a color-based pH sensing area; and a readout and processing module with a digital color sensor to obtain the pH of sweat from the color changes in the μ CAD. In addition, the readout module includes a low-power Bluetooth interface to transmit the measurements in real-time to a custom-designed smartphone application. To allow continuous operation, an absorbent pad was included in the design to retire and store the sweat from the sensing area through a passive pump path. It was found that the Hue parameter (H) in the HSV color space can be related to the sweat pH and fitted to a Boltzmann equation ($R^2 = 0.997$). The range of use of the wristband device goes from 6 to 8, which includes the pH range of sweat, with a precision at different pH values from 3.6 to 6.0 %. Considering the typical human sweat rate, the absorbent pad allows continuous operation up to more than 1000 min.

Keywords

pH sensor, Sweat analysis, Microfluidic cloth analytical device (μ CAD), Wearable system, Wireless monitoring, Smartphone.

1. Introduction

Wearable technology has significantly evolved in the last years with the advent of products such as smartwatches and wristbands. In particular, the use of wearables for personal health assessment has fuelled the growth of these devices by enabling non-invasive methods for continuous monitoring of physical activity and vital signs [264,265]. Not surprisingly, the wearable fitness technology market was valued at \$5.77 billion in 2016 and it is expected to be worth \$12.44 billion by 2022, growing at an estimated compound annual growth rate (CAGR) of 13.7 % from 2016 to 2022 [266]. Among the different physiological parameters of interest, we must highlight the monitoring of heart rate [267], blood pressure [268,269], respiration rate [270], body temperature [271] and sweat [272–275]. In contrast with traditional health monitoring instruments, wearable devices have some key advantages such as portability, ubiquity or ease of use, and they are able to provide continuous, real-time, wireless monitoring of health conditions in a non-invasive way [276–279].

Several studies have shown that analytes of interest in blood such as glucose, lactate, urea or sodium, to name but a few, are also found in other biofluids sources such as saliva, tears or sweat [280]. The main advantage of using these alternative biofluids lies in their easier access, thus avoiding the need for acquiring blood samples and allowing peripheral biochemical monitoring [281,282]. Sweat is particularly attractive since it is one of the most accessible body fluids, and it can even be produced by on-demand stimulation using techniques such as iontophoresis [283]. pH determination in sweat is an indicator of health and wellness, and it can be used even for potential disease diagnosis. Under normal conditions, the pH of healthy human sweat is within the range from 4.5–7.0. Nevertheless, the pH of our sweat can vary dramatically under circumstances of homeostasis dysregulation, disease, acidosis and even stress [284]. For instance, cystic fibrosis patients are reported to have a higher pH (up to pH 9) than normal individuals [285], and sweat pH can be also used as an indicator of metabolic alkalosis [286]. In the field of sport and exercise, it is well known that the formation and evaporation of sweat is the principal means of heat removal. If the sweat losses lead to a body water deficit or hypohydration, the reduced volume of body fluids will contain a greater concentration of sodium (Na^+) and potassium (K^+), which can cause hypertonic

hypovolemia [287]. Severe dehydration can lead to headache, vomiting, muscle cramping, dizziness, nausea and even fainting. In this context, sweat pH can be used to monitor exercise intensity and dehydration since it is associated with sodium concentration. On the other hand, excessive water intake can cause hyponatremia, which refers to a low sodium concentration [288]. Clinical features of symptomatic hyponatremia include seizures, pulmonary edema, muscle fasciculation, disorientation, mental confusion, respiratory arrest, weakness, nausea and even coma [289]. Therefore, the reliable monitoring of sweat pH is crucial for health assessment and wellness monitoring applications [290].

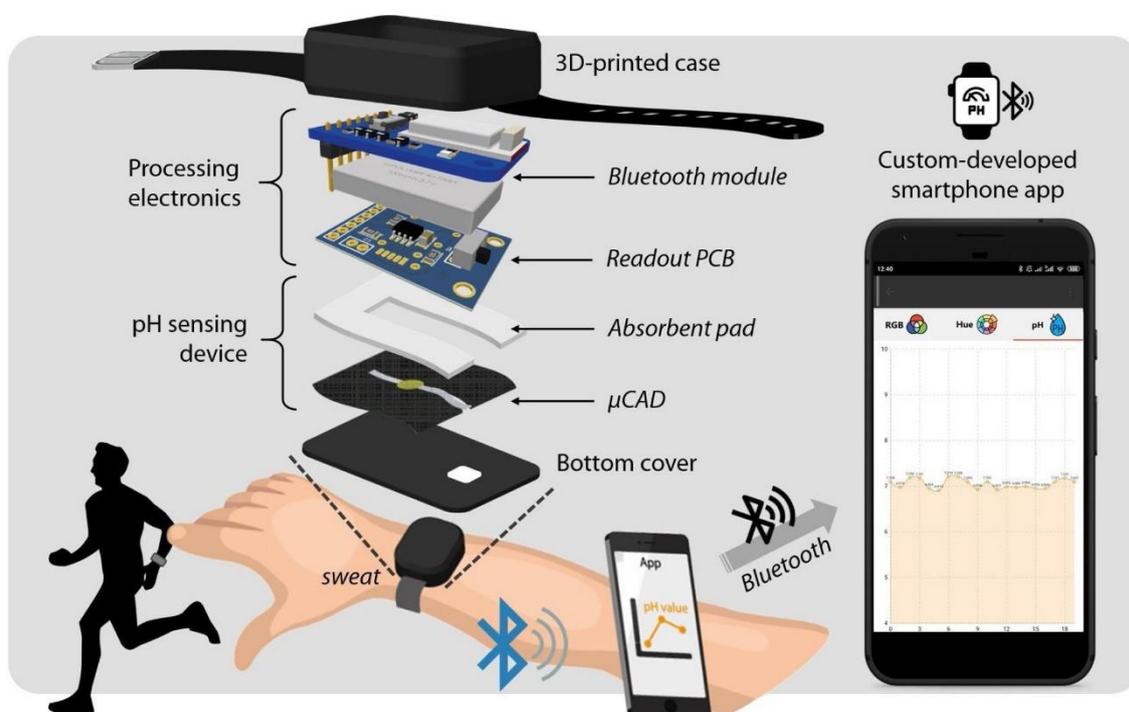


Figure 3.1 Graphical abstract of the wristband components.

Different approaches for wearable sweat pH monitoring can be found in the literature over the last few years. According to their sensing strategy, several platforms draw upon optical colorimetric detection [273,291–295], while others make use of electrochemical pH sensors [294,296,297] reviewed by Chung et al. [282]. In the first case, the use of microfluidic devices allows the precise positioning of the reagents in a specific test zone to which the sweat is guided, thus taking place the desired reaction with the subsequent colour change [298].

The study of the evolution on time of sweat both rate and composition in different areas of the body has been approached in two main ways referred to passive sampling: i) microchannel-based microfluidics that rely on deterministic capillary, the so-called capillary microfluidic [299]. In this case, epidermal microfluidic systems that combine channels, valves, mixers, and reservoirs, are able to capture, route, and store microliters of sweat in a time-controlled manner [299]; or ii) porous capillary microfluidics that rely on stochastic capillary flow within a network of pores (paper, cloth, thread) in which the sweat is collected, and delivered to the sensing area being removed by an adsorbent acting as a passive pump [288].

To make the system truly wearable and portable, a wireless interface is required to transmit the measured data to the end user. Many systems include a RFID solution, usually a NFC link [295,296,300]. This approach allows the development of passive systems by means of energy harvesting from the electromagnetic field of an external reader, typically an NFC-enabled smartphone. Moreover, the NFC antenna required for this design can be manufactured in flexible and conformable substrates, even stretchable [294,296]. However, this approach is not suitable for continuous, real-time sweat monitoring, since it requires that the external reader is permanently placed close to the system. To overcome such limitations, other systems employ longer range wireless technologies such as Wi-Fi [301,302] or Bluetooth [273,297,303].

In this work, we present a wearable wristband for sweat pH monitoring. As *Fig. 3.1* shows, the system comprises two main parts: i) a custom-designed μ CAD to collect and store the sweat that includes a color-based pH sensor built by immobilization of a vinyl sulfone acidochromic dye (AD-VS) on a cotton cloth; and ii) a miniaturized readout module to obtain the pH measurements from the sensor and extra circuitry to interface with the end user. The proposed wristband allows continuous monitoring of sweat pH and real-time wireless transmission of the measurements to a smartphone via Bluetooth. The presented system distinguishes from previous works in the same field by combining the following three main aspects: i) The development of a novel compound covalently immobilized in cloth optimized for optical pH sensing with high response speed; ii) The inclusion of an absorbent pad to retire and store the sweat from the sensing area through a passive pump path, which allows continuous operation up to

more than 1000 min; and iii) The design of miniaturized and low-power electronics embedded with the sensing module in a compact and light-weight wristband design, which is completed by a custom-developed smartphone application for real-time monitoring.

2. Materials and methods

2.1 Reagents, materials and instrumentation

All reagent and solvents were purchased and used as obtained from commercial sources (Sigma-Aldrich, Spain) unless otherwise indicated. Reagents for the μ CAD preparation were 10 mg·mL⁻¹ solution Na₂CO₃, methanol and Tris buffer pH 9.2 prepared from tris(hydroxymethyl)aminomethane. Calibration and characterization of μ CAD were performed using phosphate buffer solutions 0.01M which pH are ranged from 4.00 to 10.00 using KH₂PO₄ and K₂HPO₄. Homogenization of the solutions were carried out with an ultrasounds H-D (JP Selecta, Spain) and methodological validation of the sensor was performed with a micro pH 2000 pH-meter (Crimson, Spain). Thin-layer chromatography (TLC) were performed on Merck Silica gel 60 F254 aluminium sheets by staining the plates with ceric sulfate (1% w/v) and ammonium sulfate (2.5% w/v) in 10% (v/v) aqueous sulfuric acid or ethanolic sulfuric acid (10% v/v). For the μ CAD fabrication, white 100% cotton cloth was used as support and black plastisol ink was selected to define by screen printing the hydrophilic pattern. As passive pump, absorbent pads containing Flexicel[®] (P&G Spain, Madrid) were used. To apply sample and standards solutions, a syringe pump Model 11 (Harvard Apparatus; Massachusetts, USA) together with a 5 mL plastic syringe was used to calibrate and test the μ CAD flowing the samples and standards.

Spectroscopic characterization by ¹H- and ¹³C-NMR was made using a Varian Direct Drive 400 MHz spectrometer. Spectra were recorded at room temperature. Chemical shifts are reported in ppm using solvent resonance as the internal standard (CDCl₃ at 7.26 ppm and 77.16 ppm). Electrospray ionization (ESI) mass spectra were recorded with a Waters LCT Premier XE spectrometer.

The following instrumentation was used during the system development: an Agilent diode array spectrophotometer (model 8453; Nortwalk, CT, USA) commanded by UV-

Vis ChemStation software, used to optically characterize the vinyl sulfone acidochromic dye AD-VS-1; a Samsung Galaxy S4 Zoom together with Open Camera App to fix the camera setting; and lately, video and images obtained were analyzed using Avidemux (Mean) and ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA), respectively. To keep the illumination constant, images are taken on the optical table (VIBRAPLANE. Boston, MA, USA) model 6102-2436-21 with 3 bulbs (ROBLAN LED. Toledo, Spain) of 8W of electrical power, 3000K and 638 lm of luminous intensity placed around the camera tripod.

The development and electrical characterization of the readout and processing unit was carried out using the following laboratory instrumentation: a mixed signal oscilloscope (MSO4101, Tektronix, Oregon, USA), an 8 1/2-bit Digital Multimeter 3158A (Agilent Technologies, California, USA), a 15 MHz waveform generator 33120A (Agilent Technologies), and a DC power supply E3630A (Agilent Technologies). The printed circuit board (PCB) was fabricated on 1.5 mm thick FR4 substrate using a mechanical milling machine model ProtoMat S100 (LPKF Laser & Electronics AG, Garbsen, Germany). The FR4 substrate had a relative permittivity of $\epsilon_r=4.6$ and a loss tangent of $\tan\delta=0.015$, while metallization layer was 35 μm thick copper with a conductivity of $\sigma=4.6\times 10^7$ S/m. As software tools, MPLAB X IDE v5.40 (Microchip Technology Inc., Arizona, USA) was used to program the firmware in the microcontroller, and Altium Designer 19.1.7 (Altium Limited, NSW, Australia) was employed to design the circuit layout.

2.2 Synthesis of vinyl sulfone acidochromic dye (AD-VS-1)

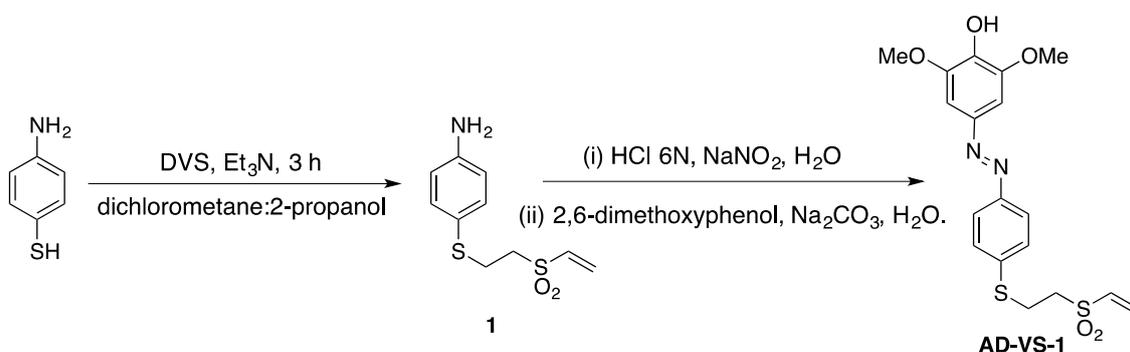


Figure 3.2 Synthesis of AD-VS-1.

For the synthesis of the vinyl sulfone acidochromic dye a two steps reaction was required, as shown in *Fig. 3.2* the starting point was a solution 4-aminothiophenol (1.6 g, 12.8 mmol) in dichloromethane:2-propanol (20 mL) that was added divinyl sulfone (2.58 mL, 25.6 mmol) and triethylamine (1295 mg, 12.8 mmol). The obtained solution was stirred at room temperature for 3 h. After this time, the solvent was removed under vacuum. The crude purified by column chromatography (diethylether-hexane 4:1) to afford compound 1 as a syrup (2.174 g, 70%).

To continue with the second stage of the synthesis. To a solution of 4-(2-(vinylsulfonyl)-ethylthioaniline (**1**) (1.2 g, 4.9 mmol) in HCl 6N (1.6 mL, 9.8 mmol) cooled at -15°C was added an aqueous solution of NaNO₂ (2 mL, 340 mg, 4.9 mmol). The obtained mixture was added to a solution of 2,6-dimethoxyphenol (680 mg, 4.41 mmol) and Na₂CO₃ (1.35g, 12.73 mmol) in water (5 mL), and was stirred at room temperature for 1h. After this time, the solvent was removed under vacuum and the crude purified by column chromatography (dichloromethane-AcOEt 2:1) to afford AD-VS-1 as an orange syrup (276 mg, 14%).

Both the reaction intermediate, 4-(2-(vinylsulfonyl)-ethylthioaniline, and the final product of the synthesis, the (E)-2,6-dimethoxy-4-((4-((2-vinylsulfonyl)ethyl)thio)phenyl)diazenyl phenol were characterized by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy to confirm their molecular structure.

2.3 μ CAD fabrication

Firstly, a piece of 13.8 × 17.4 cm² of cotton cloth, previously characterized by us in terms of Washburn constant, was screen-printed using a 43 lines cm⁻¹ frame together with a black plastisol ink, to pattern 12 hydrophilic sections as shown in *Fig. 3.3*. Lately, the large piece of cotton cloth was cut to obtain each pattern independently, that will be used to prepare the μ CAD.

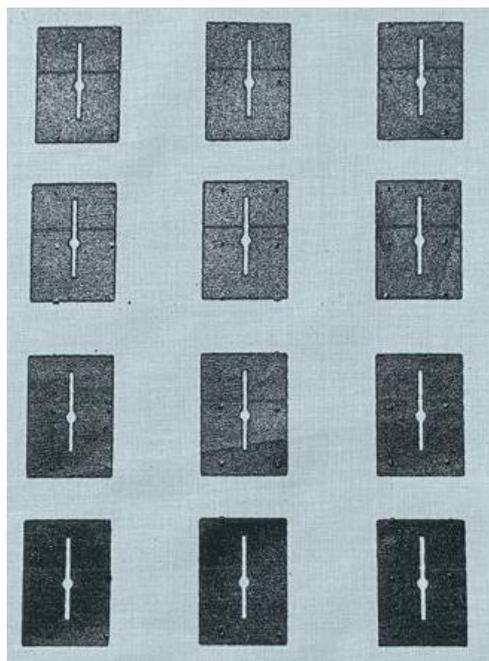


Figure 3.3 Screen-printed pattern on the cotton cloth.

Once the cotton patterned cut was obtained, the vinyl sulfone acidochromic dye AD-VS-1 was immobilized according to the following procedure. Firstly, it was introduced in a Na_2CO_3 10 mg mL^{-1} solution for 1 h to scour the screen-printed fabric and improve its capillary properties, as well as to get a basic media on the cloth that makes possible the click immobilization of the AD-VS-1 via oxa-Michael addition by adding of $0.2 \mu\text{L}$ of AD-VS-1 15 mg mL^{-1} in DMSO. Afterwards, the cloth was located in a light-safe and let dry for 24 h, and then washed to remove the excess of AD-VS-1 by sonication in Tris buffer pH 9.2, purified water and methanol, 10 min each. Finally, the μCAD was placed in the bottom of the designed holder and, on top of it, the U-shaped absorbent pad as shown in *Fig. 3.4(b-c)*. The μCAD , as well as the U-shaped absorbent pad, are disposable components that can be replaced when necessary. To collect the sweat, a piece of the sampling path passes through a hole at the bottom cover of the 3D-printed case, being in touch with the skin and collecting the sample while sweating.

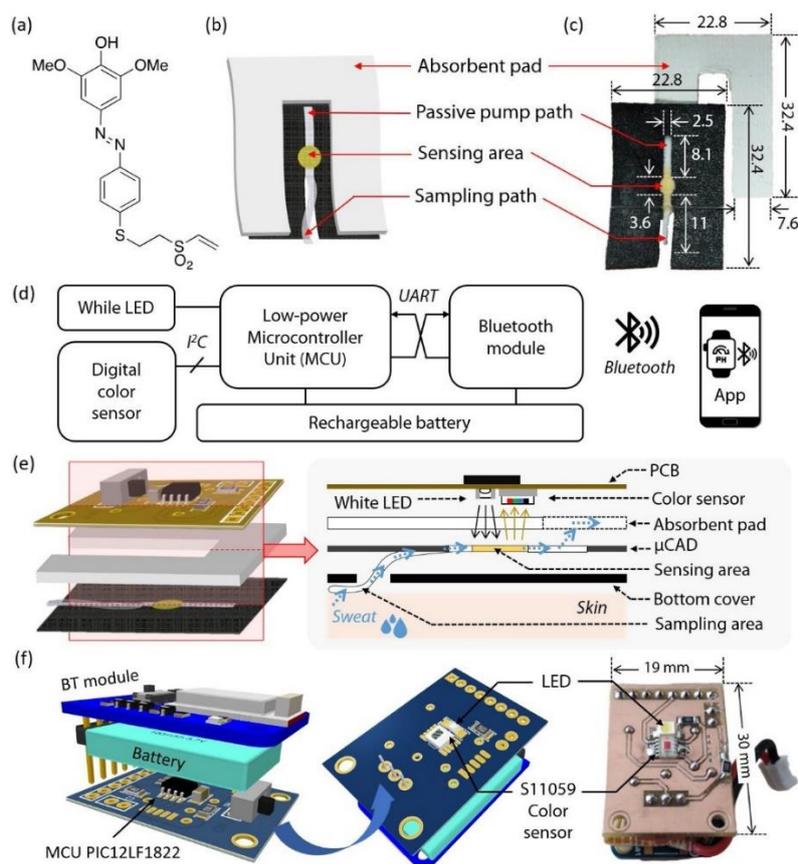


Figure 3.4 (a) Chemical structure of AD-VS-1; (b) μ CAD design; (c) μ CAD photograph; (d) Block diagram of the processing electronics in the readout module; (e) Schematic diagram of the sensing procedure in which the LED and color sensor are placed in front of the sensing area of the μ CAD; (f) 3D views and real image of the fabricated module with its main components labelled.

In humans, the rate of sweating is around $1250 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ when exercising [304]. For that reason, both the sampling and the sensing areas in the μ CAD design had to be small enough to avoid the need of high volumes of sample. On the other hand, however, the sensing area needed to have a minimum diameter of 3.6 mm so that the detector included in the device could perform reliable measurements. Cotton cloth was selected as the support for the μ CAD because it presents better properties than paper in terms of flexibility and bending resistance. However, as it occurs with paper, the cotton cloth needed to be patterned to achieve that the sample and reagent flow through a specific path. For this reason, the designed pattern (Fig. 3.4) comprises of several parts: (i) a sampling zone where the sweat is recollected or added, (ii) a sensing area where the AD-VS-1 is immobilized, and (iii) a passive pump path in which the sample flows to reach (iv) an absorbent U-shaped material that makes it possible the use for a prolonged operation.

2.4 Imaging and color analysis

For the μ CAD development, a Samsung Galaxy S4 Zoom was used to digitalize the color change of the AD-VS-1 immobilized in cotton cloth. For that purpose, an Open Camera App (available in Google Play Store) we used, which allows a fully control of the camera settings to a resolution of 4608×3456 pixels, aperture value of f/3.3, exposure time of 1/800 s, ISO-800 and 2800K white balance, and format saving in jpg. In the case of video recording, the camera was set to 1280×720 pixels, 30 fps, 2800K white balance, and format saving in mp4. In all the cases, the digitalization was conducted inside a cube light box in a fixed place, illuminated by two bulbs whose color temperature was 3000K.

Once the recordings and pictures were obtained, Avidemux software was used to crop different frames from the videotape, and they were analyzed together with the camera pictures using ImageJ software. This software allows the manual selection of a region of interest that lately will be analyzed obtaining the red, green, and blue coordinates from the RGB color space, as well as the Hue parameter from the HSV color space. To obtain this one, the pictures were converted from the RGB color space to HSV color space by using a color space converter included in the same software.

2.5 Readout and processing electronics

The readout module comprises as main electronic components a low-power microcontroller unit (MCU) model PIC12LF1822 (Microchip Technology Inc., Chandler, Arizona, USA); a Bluetooth module Bluefruit Low Energy (BLE) UART Friend (Adafruit, New York, USA); a high-resolution digital color detector model S11059-02DT (Hamamatsu Photonics, Japan); a white excitation LED; and a rechargeable battery of 3.7 V and 150 mA h capacity model JJR/C H36-004 (Goolsky, Singapore, Asia). *Fig. 3.4(d)* shows the block diagram of the processing electronics.

The sensing module, which comprises of the excitation LED and the color detector, is placed aligned in front of the pH-sensitive membrane, as shown in *Fig. 3.4(e)*. The selected color detector S11059-02DT is sensitive to red ($\lambda_{\text{peak}} = 615 \text{ nm}$), green ($\lambda_{\text{peak}} = 530 \text{ nm}$), blue ($\lambda_{\text{peak}} = 460 \text{ nm}$), and near infrared ($\lambda_{\text{peak}} = 855 \text{ nm}$) incident

radiation, codifying it in four 16-bit digital words. These words are sent to the MCU by means of an I2C interface for further processing. The excitation LED is synchronised with the reading protocol of the color detector. The selected LED is white since the parameter to be determined is the color of the sensitive membrane. After the processing, the MCU sends the data to the Bluetooth module via Universal Asynchronous Receiver-Transmitter (UART) protocol. The processed data is then wirelessly transmitted to a mobile phone via Bluetooth. *Fig. 3.4(f)* shows the 3D views and real image of the fabricated readout module.

A two-piece case was designed and fabricated (*Fig. 3.5*) with a Witbox 2 desktop 3D printer (BQ, Madrid, Spain) using coal black polyurethane Filaflex filament (*Fig. 3.5a*) and polylactic acid filament (*Fig. 3.5c*), both of them with a diameter of 1.75 mm. This low-cost 3D printer was operated using Cura open-source software to command and control the process parameters. Apart from the attachment of the system to the user's wrist, the 3D-printed case ensures the correct alignment and positioning of the pH sensor and the sensing module, while providing a uniform dark environment for the colour measurements.

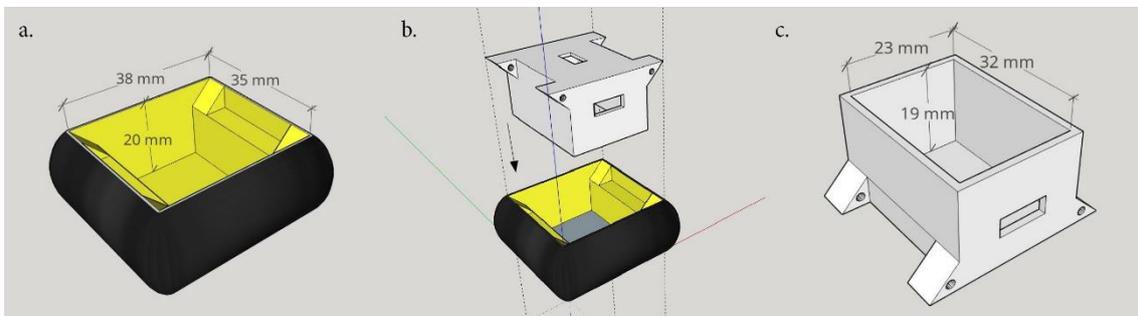


Figure 3.5 3D-printed wristband case design.

In addition, to transmit the data in real-time from the wristband to the user, a custom-designed Android™ application was developed. The application takes control of the Bluetooth interface of the smartphone to communicate with the Bluefruit LE module. Once the wristband is paired with the smartphone, the BLE sends in real time the measured color data obtained through the color sensor (in RGB coordinates) from the MCU to the app. The RGB coordinates are then converted to the H value in the HSV color

space. Finally, the pH values are computed from the normalized H values as per the obtained calibration, and the graph is displayed on the screen. The application includes a datalogger function and the results can be shared through email and/or different cloud or messaging services, thus allowing the possibility to connect to remote health care providers or medical experts. More details regarding the development and some screen captures of the application can be found in *Fig. 3.25*.

3. Results

3.1 Cotton cloth characterization

Cotton cloth selected as support to fabricate the μ CAD was characterized by terms of Washburn constant. For this purpose, the beginning of a 1cm x 10 cm piece of cotton cloth was introduced in a $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Brilliant Blue solution while being recorded using the smartphone. Frames at different times were cropped from the video and calculated the area covered by the Brilliant blue solution. As expected in this kind of studies (*Fig. 3.6(a)*), the response presents an exponential behavior, showing a fast wicking at the beginning and slowing down as the area covered with colorant increases (*Fig. 3.6(a)*).

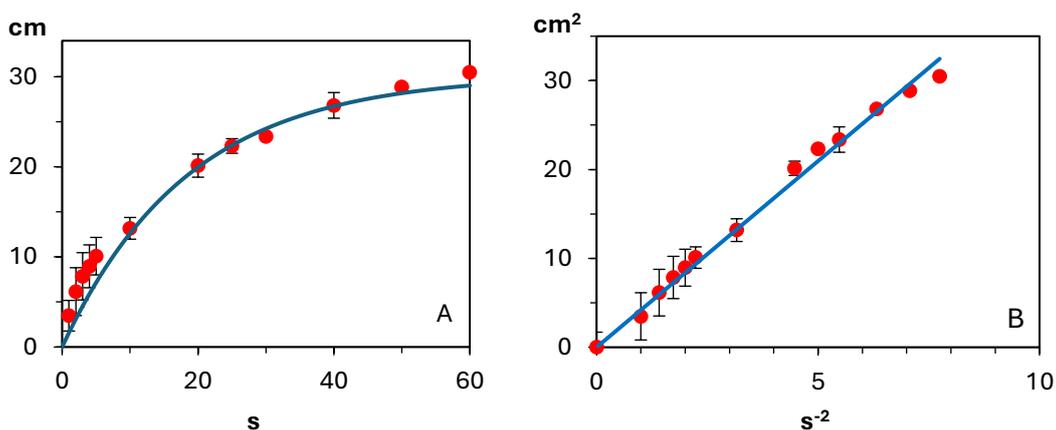


Figure 3.6 Wicking behavior of cotton cloth. A) Area vs time; B) Area vs $\sqrt{\text{time}}$.

The fit to the Washburn equation was obtained by fitting the experimental data with a square root function (Eq. 1) where A is the area covered by colorant, t is the time in

seconds and a is the Washburn constant. Experimental data fits to the Washburn equation (*Fig. 3.6(b)*) with a $R^2 = 0.998$ and a constant $a = 4.19$.

$$A = a\sqrt{t} \quad (\text{Equation 3.1})$$

3.2 Selection and characterization of the acidochromic dye indicator AD-VS-1

Parallel advances in chemical sensing and wireless communication technologies have sparked the development of wireless chemical sensors. In this work, our engineering design is based on the use of μ CAD as an optical sensor for the detection and determination of pH as the analyte. In this respect, acidochromism evolved for the sensing area of the μ CAD by means of an immobilized acidochromic indicator dye as a recognition element was thought to be an adequate methodology [305]. Among the different suitable dyes, our selection was based in the appealing features of vinyl sulfone azo dyes (AD-VS). These compounds combine the outstanding optical properties of azo chromophores with the relatively high reactivity of the vinyl sulfone group (VS) [306,307]. The reactivity of the VS functional group fulfils most of the essential requirements needed for covalent immobilization of the azo dye to cotton cloth as the support of choice for the μ CAD fabrication: (i) a complementary reactivity with the intrinsic nucleophilic OH present in cellulose that react by a Michael-type addition, (ii) a high stability of the resulting ether link, (iii) it takes place in an aqueous milieu, and (iv) a simplified one-step procedure that minimize the operational. On the base of these outstanding features AD-VS have found application in textile chemistry [308] and they also have demonstrated their value in the fabrication of devices for optical pH sensing[183,305,309,310].

Considering the current state-of-the-art, we decided to prepare a novel member of this family of compounds, named AD-VS-1 (*Fig. 3.4(a)*), as suitable for our purposes. We envisaged an easy strategy based in a straightforward two-step procedure that starts from 4-aminothiophenol (see Section 2.2). After treatment of this aromatic compound with divinyl sulfone, that led exclusively to the corresponding thia-Michael reaction

addition intermediate due to the higher nucleophilicity of the sulfur atom respecting to the amino group, concomitant diazotation reaction with 2,6-dimethoxyphenol afforded the desired AD-VS-1. Spectroscopic characterization of this indicator dye confirms this molecular structure, whose optical profile (absorbance spectra and molar extinction coefficient in DMSO solution) was also determined.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.23 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.61 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.57 (m, 1H), 6.39 (d, $J = 16.6$ Hz, 1H), 6.15 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 3.93 (bs, 2H), 3.27 – 3.12 (m, 2H), 3.09 – 2.90 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 147.25, 135.69, 135.01, 133.85, 131.05, 119.34, 115.56, 115.18, 53.97, 28.56.

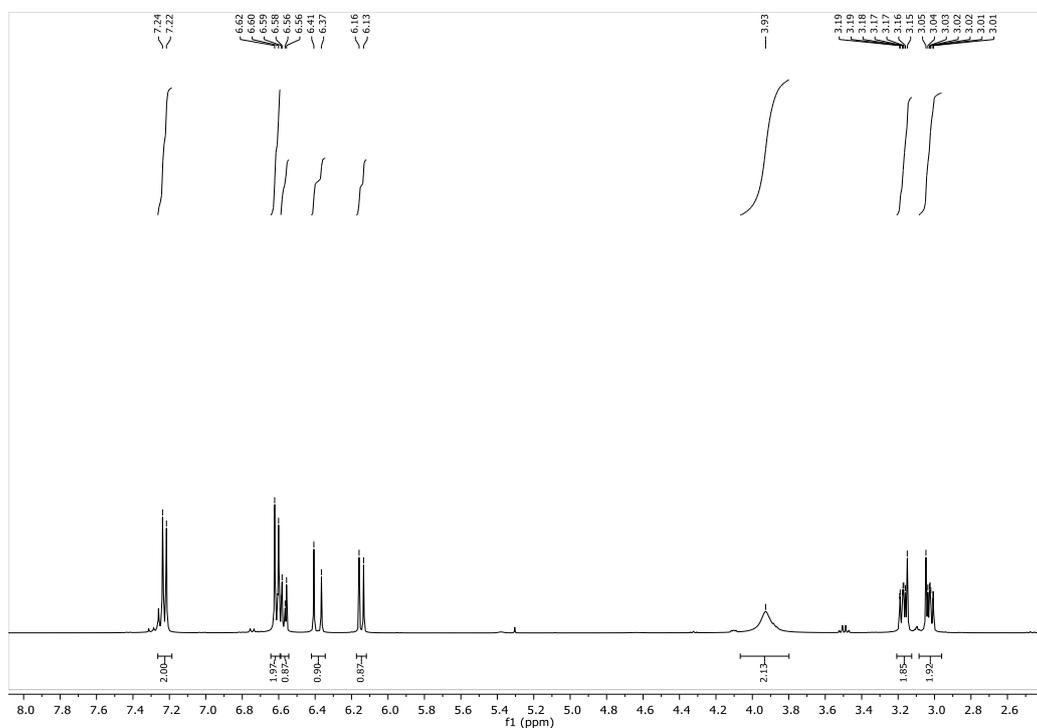


Figure 3.7 ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) of compound 1.

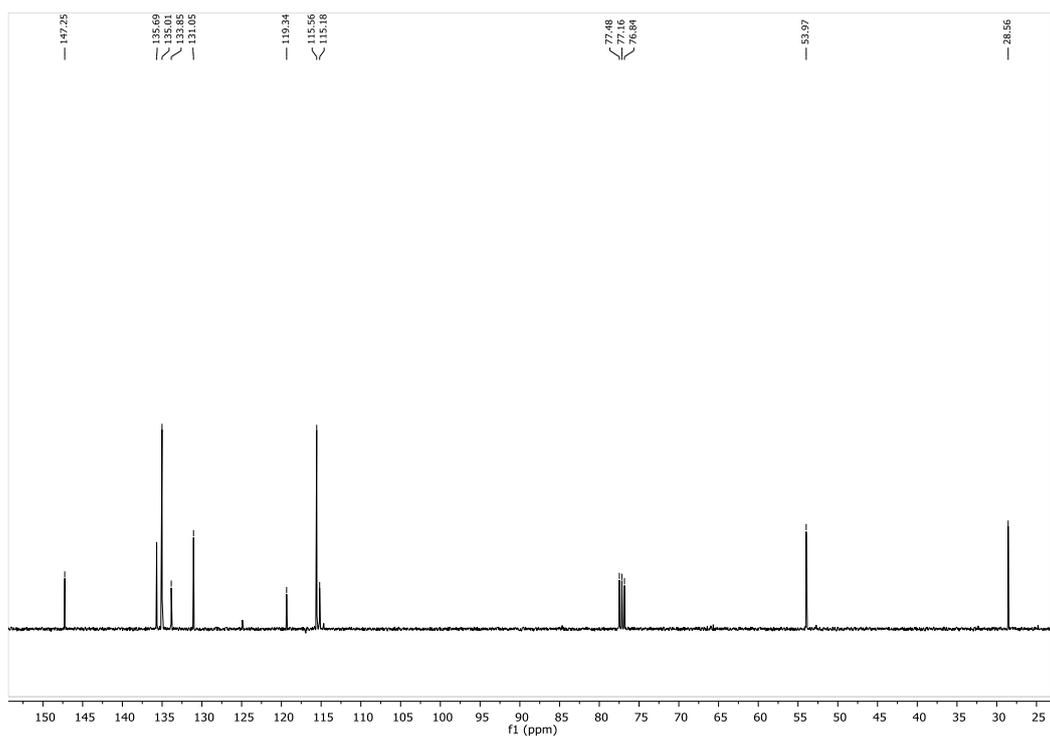


Figure 3.8 $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) of compound 1.

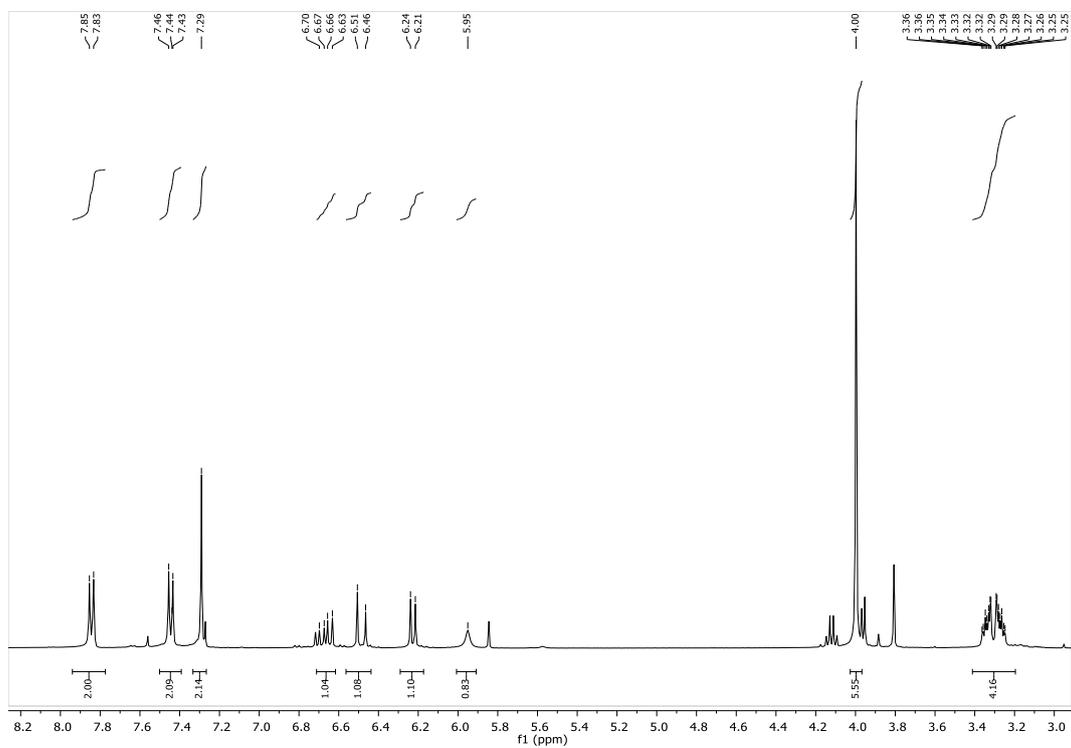


Figure 3.9 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) of compound 2.

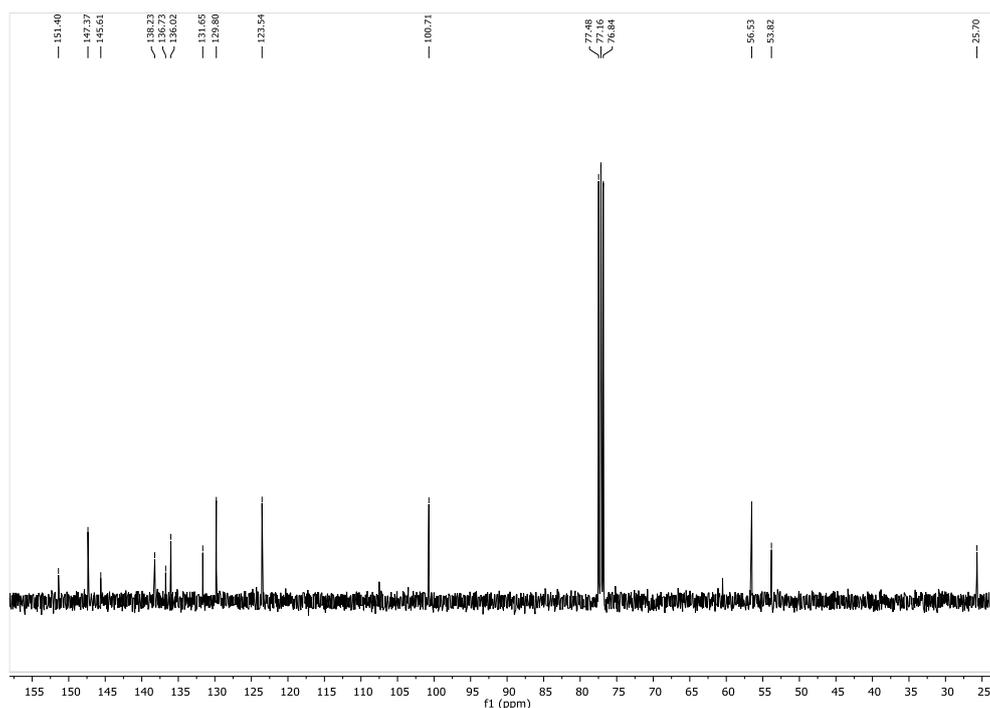


Figure 3.10 ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) of compound 2.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.84 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.44 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.29 (s, 2H), 6.66 (dd, $J = 16.5, 9.8$ Hz, 1H), 6.49 (d, $J = 16.6$ Hz, 1H), 6.23 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 5.95 (s, 1H), 4.00 (s, 6H), 3.37 – 3.31 (m, 2H), 3.30 – 3.24 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 151.40, 147.37, 145.61, 138.23, 136.73, 136.02, 131.65, 129.80, 123.54, 100.71, 56.53, 53.82, 25.70. HR-MS (ESI $^+$): $m/z = 409,090$ calcd. for $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}_2$): 409,0892.

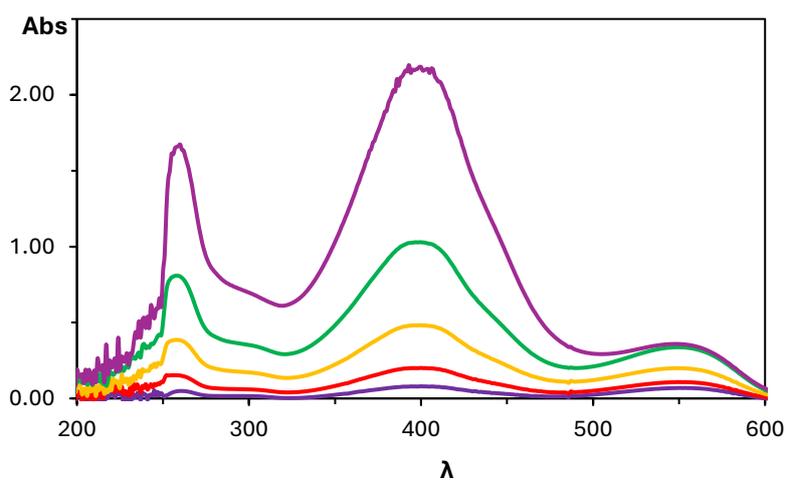


Figure 3.11 Absorbance spectra of AD-VS-1 solved in DMSO. Blue: $0.313 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; Green: $0.156 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; Yellow: $0.078 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; Red: $0.078 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; Purple: $0.020 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

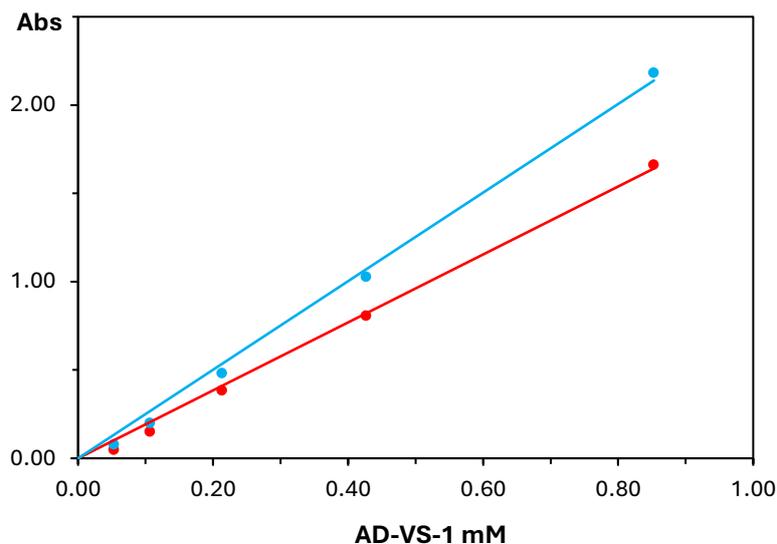


Figure 3.12 Molar extinction coefficient of AD-VS-1 calculated in DMSO at 400 nm (Blue dots, $\epsilon = 1.32 \cdot 10^4$) and 259 nm (Red dots, $\epsilon = 1.01 \cdot 10^4$).

3.3 Selection of the analytical parameter

Before the optimization of the μ CAD preparation, the analytical parameter used to characterize the color change of the immobilized AD-VS-1 was selected. For this purpose, several pieces of cotton with immobilized AD-VS-1 were prepared following a small variation of the procedure described in *Section 2* of this chapter, by using 5 μ L of AD-VS-1 solution 2.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ in DMSO. Once prepared, the samples were tested on pH solutions by adding 10 μ L of 8 different pH standards ($n = 3$) solutions ranged from 4 to 9, recording and analysing the color in the RGB and HSV color spaces (see *Fig. 3.14*). The color was digitalized using the smartphone as described in *Section 2.4* (see *Fig. 3.13*).



Figure 3.13 Color change of the AD-VS indicator immobilized on cloth depending on the pH.

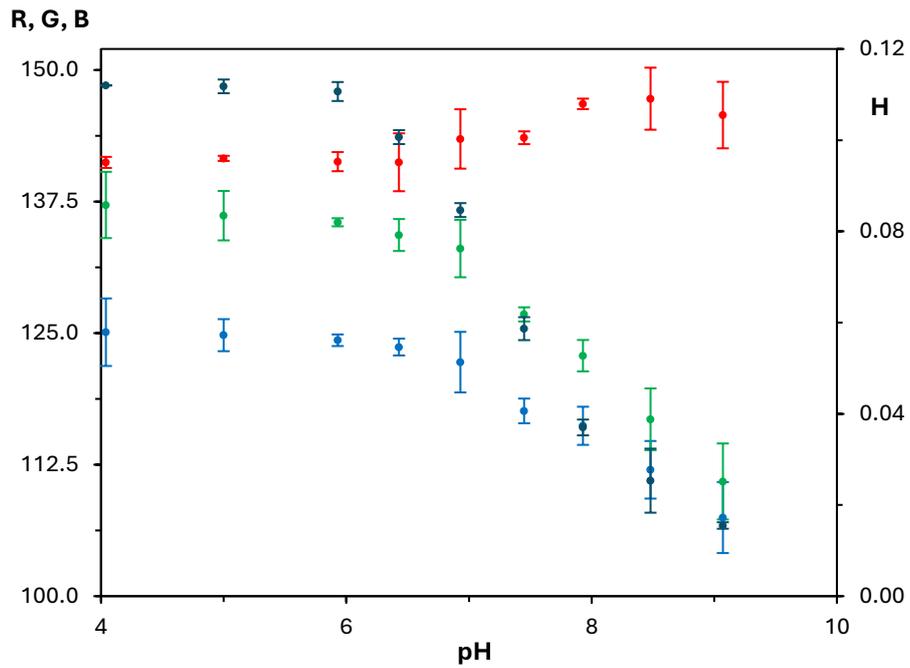


Figure 3.14 Variation of R (red dots), G (green dots), B (blue dots) (left Y-axis) and H (brown dots) (right Y-axis) depending on the pH.

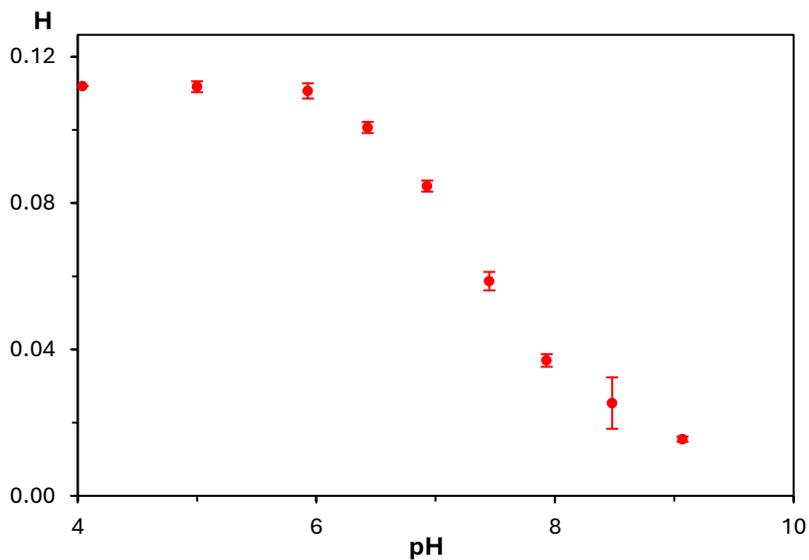


Figure 3.15 Dependence of H parameter with pH.

From the obtained pictures, the ROI was selected and analyzed to get the R, G, B color coordinates from the RGB color space and the H parameter from the HSV color space. As observed from Fig. 3.14, the H parameter achieves the best performance in terms of precision, since error bars are smaller than for the RGB color coordinates. In addition, the H parameter changes at lower pH than the other three coordinates. Because of this,

the H parameter was selected to be used as the analytical parameter to detect the color change due to the pH variation.

3.4 μ CAD design

As can be observed in *Fig. 3.4(b–c)*, the hydrophilic section of the μ CAD is composed by a sensing area and two paths: the sampling path (2.5 mm x 11.0 mm) and the passive pump path (2.5 mm x 8.1 mm). A 2.5 mm wide path was selected since it was the narrowest path that could be screen-printed on the cloth in the reproducible way. The length of both paths, sensing area size, and position in the 22.8 mm x 32.4 mm piece of cloth used to fabricate the μ CAD, were selected based on the PCB and 3D-printed case design.

3.5 Optimization assays for the preparation of the sensing area

Once H was selected as analytical parameter and the μ CAD was designed and fabricated, different parameters related to the immobilization of the AD-VS-1 were studied. Firstly, the volume that must be added to the sensing area was evaluated in order to cover the circle in a reproducible way. For this purpose, different volumes ranging from 0.1 to 0.5 μ L of a Brilliant Blue solution ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) were added, being 0.3 μ L the volume that best and most homogeneously covered the sensing area (see *Fig. 3.16*). Later, and based on the obtained results, the same test was performed using a $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ AD-VS-1 in DMSO solution to confirm these results. In this case, the volume that best covered the sensing area was 0.2 μ L. The volume needed in this case was lower due to the used solvent, since Brilliant Blue solution was solved in water, while AD-VS was in DMSO, and it affected to the wicking on cloth.

Later, the concentration of AD-VS-1 solution in DMSO was optimized. For this purpose, different AD-VS-1 solutions in DMSO (5, 10, 15 and $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) were tested to achieve the most reproducible sensing area and the highest possible signal variation. Immobilization was performed following the procedure described in Section 2.1. Once prepared, the μ CAD was dipped for 30 s in 10 different standard solutions whose pH's ranged from 4 to 10 ($n=5$) and the change of color digitalized are showed in *Fig. 3.17*

and Table 3.1 resulting that 15 mg mL^{-1} was the concentration that best results provided in terms of coefficient of variation (CV) as well as pH range of variation of the signal, being the one whose H value changed at lower pH.

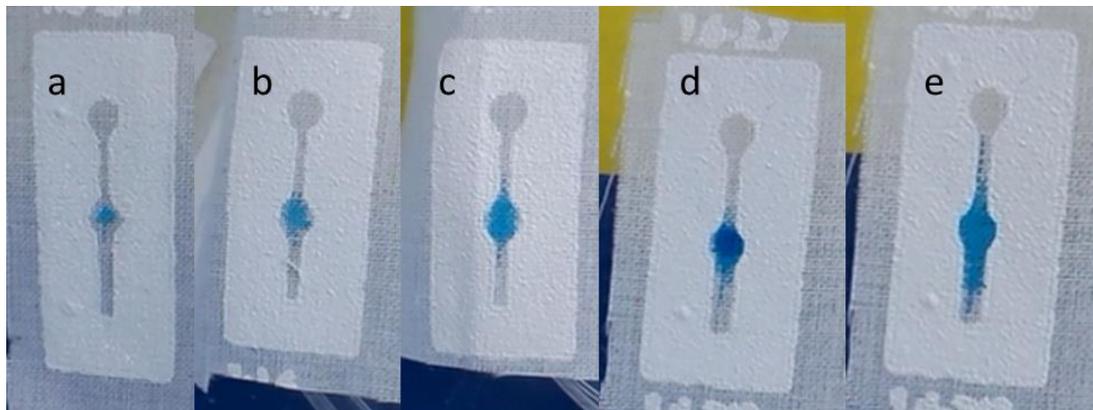


Figure 3.16 Aspect of the sensing area after addition of different volumes of Brilliant Blue solution: a) $0.1 \mu\text{L}$; b) $0.2 \mu\text{L}$; c) $0.3 \mu\text{L}$; d) $0.4 \mu\text{L}$; and e) $0.5 \mu\text{L}$.

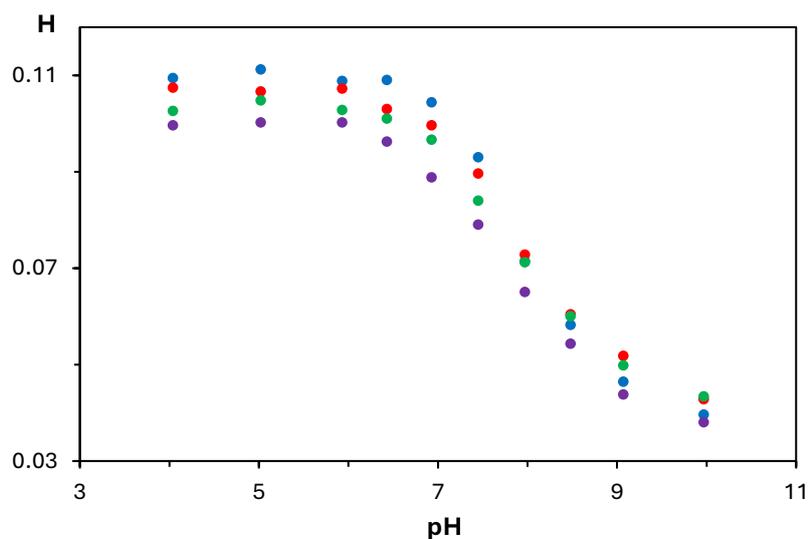


Figure 3.17 Optimization of AD-VS-1 solution used for μCAD preparation. $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (blue dots), $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (red dots), $15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (purple dots) and $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (green dots) ($n=5$).

3.6 μCAD patterning procedure

Finally, two different procedures to prepare the μCAD were assayed. The first one was prepared as described in Section 2.1, the cloth was first patterned and later the reagent was immobilized, while the other type was prepared by swapping the immobilization

and patterning steps. As it can be observed in Fig. 3.18, the response obtained for both μ CADs was pretty similar in terms of H value but, on the other side, the errors associated to the μ CADs prepared adding first the AD-VS-1 are much higher than if the screen-printing of the cloth is done first and then AD-VS-1 is immobilized.

Table 3.1 Average CV from the 10 standard solutions tested with each AD-VS-1 solution (n=5).

Concentration	CV (n=5)
5 mg·mL ⁻¹	4.9
10 mg·mL ⁻¹	3.8
15 mg·mL ⁻¹	2.9
20 mg·mL ⁻¹	2.5

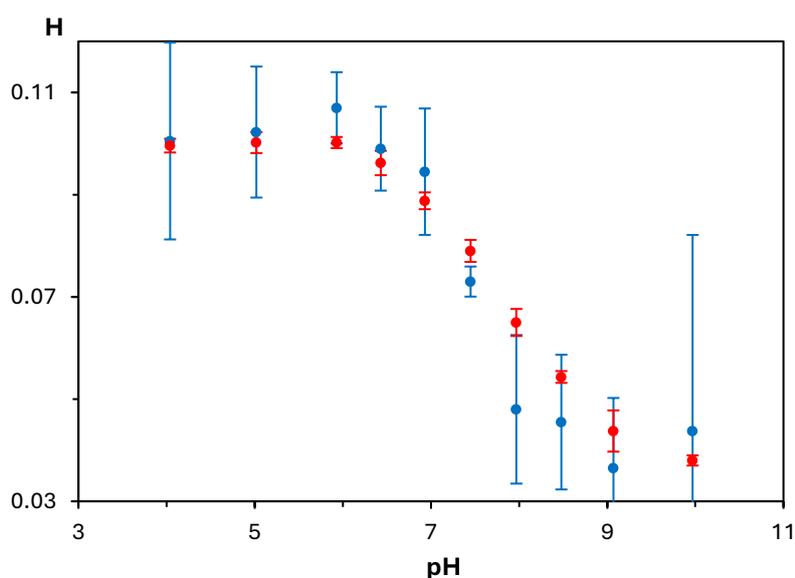


Figure 3.18 μ CAD response depending on the making procedure. Patterning and then AD-VS-1 immobilization (red dots); AD-VS-1 immobilization and then patterning (blue dots) (n=5).

3.7 Dipping calibration

After the μ CAD design and optimization, a calibration was conducted by dipping the μ CADs in 10 different standard solutions with pH from 4 to 10 during 30 s in each solution. Six different μ CAD were used for the calibration. In three of them, the

calibration was conducted by rising the pH value of the standard solution, while in the other three cases the pH was diminished during the calibration.

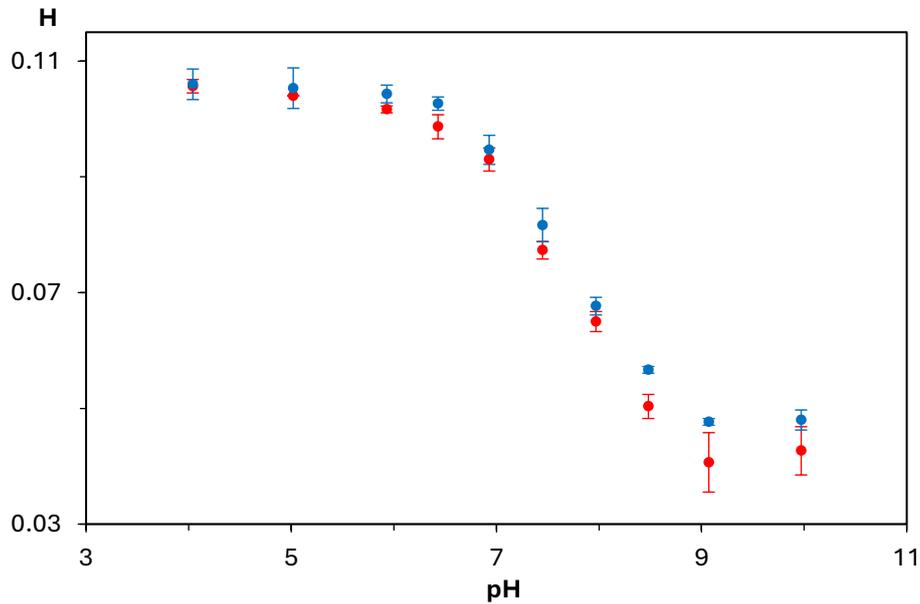


Figure 3.19 μ CAD calibration from acidic to basic pH (blue dots) and from basic to acidic pH (red dots) ($n=3$).

This strategy was chosen to prove that the obtained H value was independent from the pH variation direction. As it can be observed in *Fig. 3.19*, the obtained results were independent from the rising or diminishing of the pH value, so the six replicates were used to obtain a Boltzmann equation fitting the data set ($R^2 = 0.997$) (see *Fig. 3.20*).

Boltzmann equation:

$$y = A_2 + \frac{(A_1 - A_2)}{1 + e^{\frac{(x - A_3)}{A_4}}} \quad (\text{Equation 3.2})$$

The results of this first study indicate that the designed μ CAD can be used to determine the pH of sweat with good precision and within the range of the sample. However, at this stage it cannot be claimed yet that the μ CAD could be used for real-time determination of pH sweat. The reason behind this is that the μ CAD hydrophilic area is so small that it will be full of sample in a very short period of time. Because of that, some material needed to be included for the purpose of continuously retiring sample from the

hydrophilic area of the μ CAD to allow that new sample could continue flowing through it. This would ensure that the μ CAD could be used during longer periods of time before saturating.

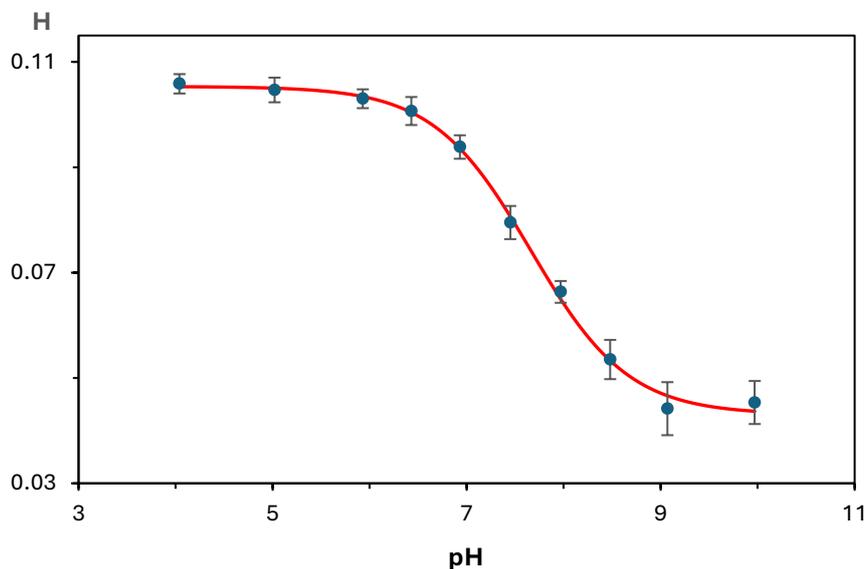


Figure 3.20 μ CAD calibration and fitting to a Boltzmann equation ($n=6$).

3.8 Absorbent pad characterization

The strategy followed to extend the life service of each μ CAD and adequate it to the continuous flow functioning was the inclusion of a passive pump in the μ CAD. This passive pump was achieved with an absorbent pad containing Flexicel (P&G Spain, Madrid) skirting the hydrophilic area (see *Fig. 3.4(b-c)*). Flexicel is a superabsorbent material whose characterization was carried out as follows: Round pieces of absorbent with different diameters (5.0, 7.5, 10.0, 12.5 and 15.0 mm) were cut using a laser engraving printer and later weighted. Afterwards, all of them were dipped into a 500 mL baker full of water for 5 minutes, and then taken from the inside and weighted again. The increment in mass of the adsorbent material is due to the water that it can absorb. According to the slope of the calibration function in *Fig. 3.21(a)*, this material can absorb around 20 times its own weight.

This material has been successfully used as passive pump in other microfluidic devices that can be found in the literature [311].

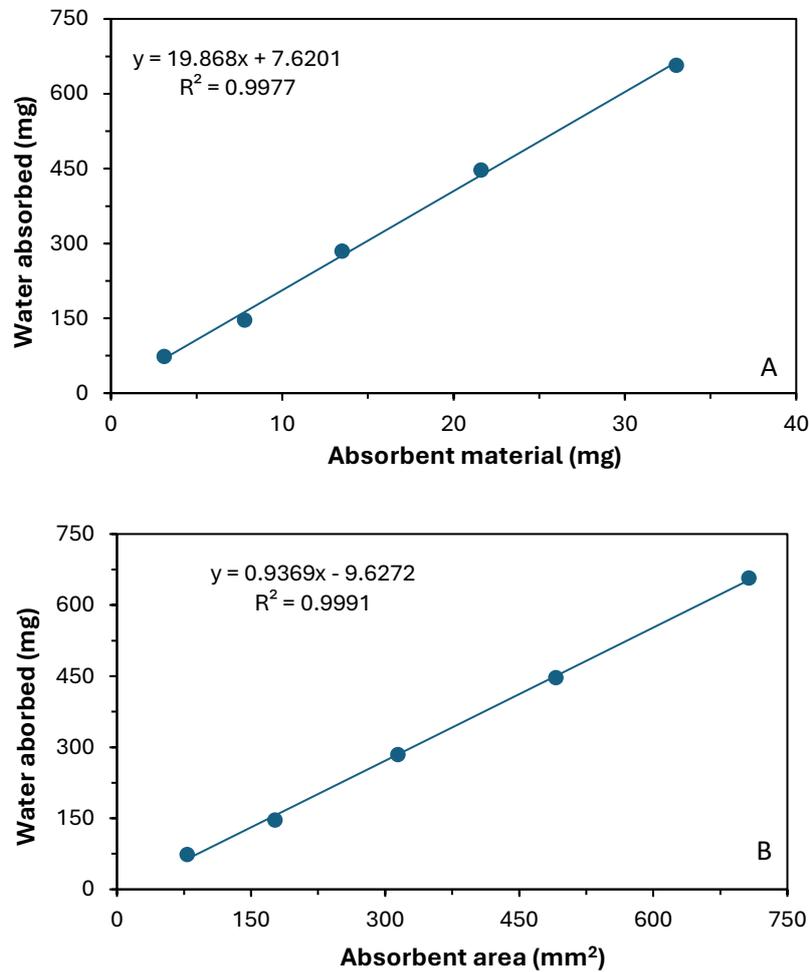


Figure 3.21 Water absorbed by Flexicel material depending on: a) weight, and b) area of material used ($n=3$).

3.9 First μ CAD designs

Different designs were considered to integrate the screen-printed cloth and the passive pump into a single piece. In the first design, the cloth was located under the passive pump. Flexicel surrounded the entire unscreened area of it in order to increase the area of absorbent material available and prolong the shelf life of each μ CAD. The cloth and the Flexicel were held together with a plastic film on the side where the measurements were to be taken and a rigid Mylar support on the other side of the sensor. The film was removed from the vertical of the sampling area, so that the capillary of the peristaltic

pump could be introduced, and the detection area, to prevent the plastic film to interfere with the measurements, leaving the patch as shown in the figure below.

The results of the continuous operation of these patches proved to be very irreproducible as shown in *Fig. 3.22*, since the passive pump modified the light around the detection zone and hindered the placement of the capillary of the peristaltic pump.



Figure 3.22 First whole μ CAD design for continuous flow measurements.

Experimental evaluation was conducted to explore alternative measurement techniques on the Mylar side (*Fig. 3.23*) positioning the μ CAD upside down. However, this approach resulted in inaccurate measurements due to light reflections. Moreover, the design proved to be ineffective due to the challenges associated with affixing the Flexicel to the Mylar support.



Figure 3.23 Upside down first whole μ CAD design for continuous pH measurements.

Considering all the above, it was determined that initial test should be determined by the requirements of the final detector. To achieve this, 2 μ L of phosphate buffer solution

were directly pipetted onto the detection zone and the data acquisition was carried out by the optical detector developed by the electronic engineering team, aligning vertically the LED light and the optical detector, and placing the assembly in the wristband case shown in *Fig. 3.5*.

Throughout these measurements, several areas for enhancement were identified. The white screen-printing ink exhibited excessive light reflections from the LED source, leading to erroneous outcomes. Furthermore, it became evident that μ CAD dimensions adjustments were necessary as the size of the detection area was so small that even minor displacement of the cloth could introduce errors.

The new patch dimensions were as follows: 32.4 mm in length and 22.8 mm in width of the screen-printed area with a 2.5 mm width of the channels. The length of the sampling channel was set to 11 mm and the length of the channel was set to 8.1 mm as it is shown in *Fig. 3.24*. In this way the sensing zone, the 3.6 mm diameter circle, was made to fall just below the detector. The area of the absorbent pad used in our design was 689 mm². Based on the calibration of the material and considering a sweat rate of 0.01 $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$ (in around 15 mm² area) [304], the μ CAD along with the absorbent pad could be used continuously up to 1058 min. Size and shape of the absorbent material was also selected based on the 3D-printed case dimensions, to be easy-to-place inside while maintaining its position inside during the use of the device.

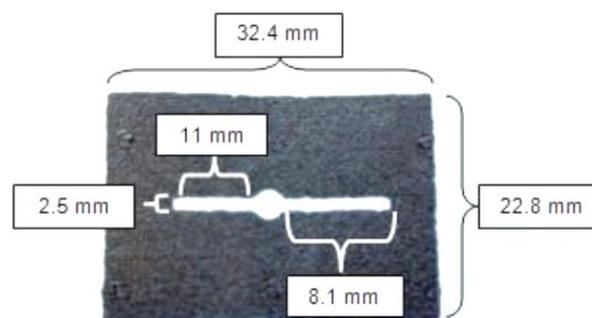


Figure 3.24. Black screen-printed cloth with dimensions adapted to the final detector.

To avoid light reflections the LED was attenuated, and the white ink was changed to black ink of the same type and manufacturer.

3.10 Method characterization

A new calibration was conducted, on this occasion with the μ CAD including the passive pump. In this case, a syringe pump was used to apply the sample on the sampling zone (see Fig. 3.4(b)) at a flow rate similar to the human sweat rate ($0.01 \mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$). Each pH standard solution was applied to the μ CAD for two minutes and videotaped.

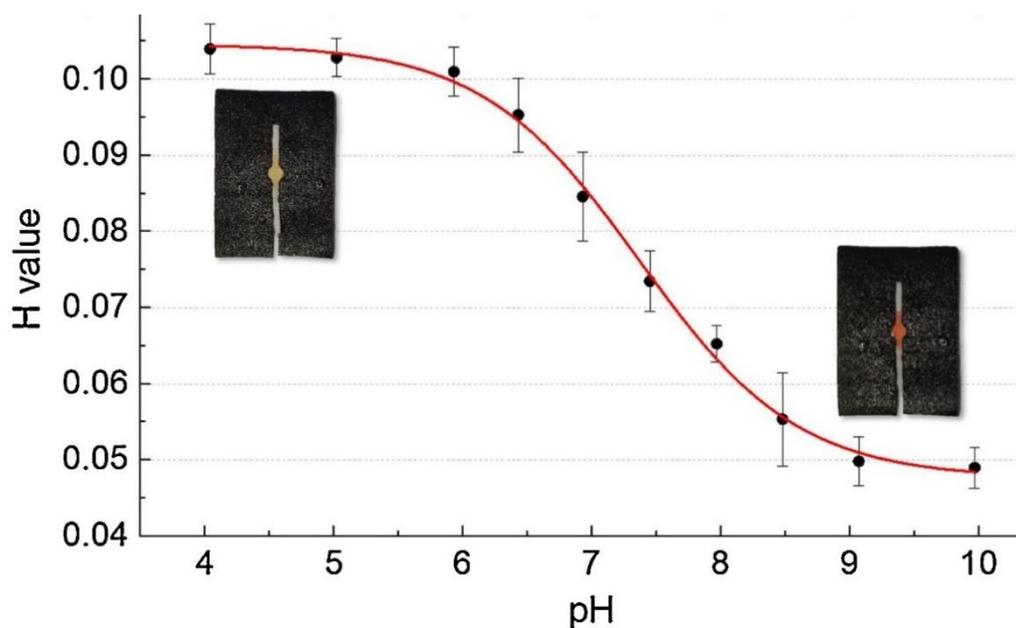


Figure 3.25 Calibration curve of the μ CAD including the passive pump, where the standard pH solutions were applied on the sampling zone using a syringe pump at a rate of $0.01 \mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$, which is similar to the human sweat rate.

Table 3.2 Analytical parameters of μ CAD.

Analytical parameters			
A₁	0.104	Precision (n=10)	
A₂	0.047	pH	CV (%)
A₃	0.614	4.04	2.5
A₄	0.996	7.45	3.5
LOD	6.1	7.97	2.3
Range	6.1-8.4	9.97	3.6

Only 90 s were enough to get a steady signal, which was used to obtain the calibration function (see Fig. 3.25). The data fits as previously described to a Boltzmann equation ($R^2 = 0.996$) (Eq. 2), and the range of use of the μ CAD is from 6.1–8.4 ($pK_a = 7.4$), range in which the pH of sweat is included. The precision tested at different pH goes from 2.3 to 3.6 % (see Table 3.2).

3.11 Reversibility study

Due to the nature of the sweat sample, whose pH can rise or diminish indistinctly during an exercise session, an additional study was conducted to prove that the μ CAD is fully reversible to pH variations. Fig. 3.26 shows that the μ CADs are fully reversible after subjecting them to a cycle of acidic-basic-acidic pH and basic-acidic-basic pH, respectively.

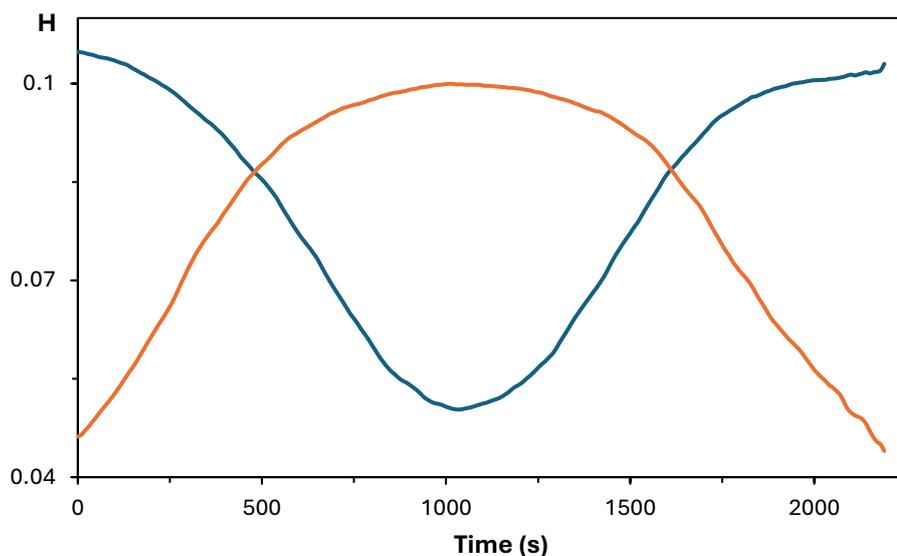


Figure 3.26 Reversibility of the μ CAD. Acidic-basic-acidic cycle (blue line); basic-acidic-basic cycle (orange line).

3.12 Stability

Finally, a stability study was performed by observing the H value of three different μ CADs along 20 weeks. Three different μ CADs just prepared were kept in a black

desiccator. Its color was monitored over time using the digital camera as described in Section 2.4. The obtained results were plotted in a Shewart graph to determine the stability of the μ CAD in dark conditions. This study showed that, once prepared, the μ CAD can be stored for 7 weeks (Fig. 3.27) cause after.

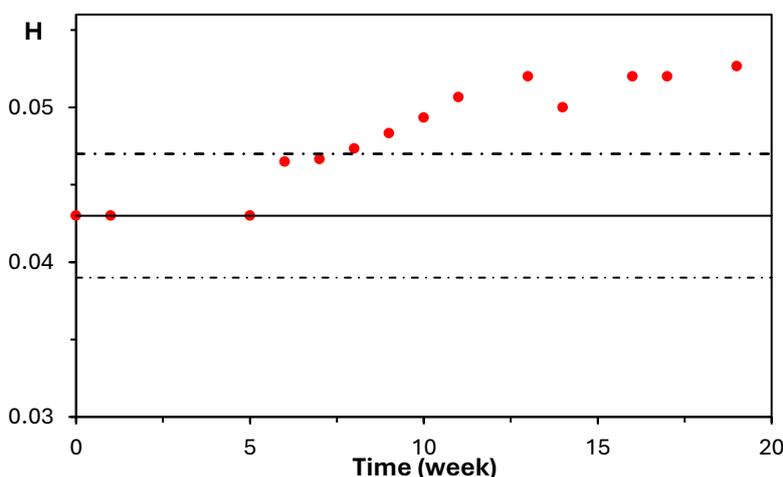


Figure 3.27 Lifetime of the μ CAD. Dotted line: upper and lower control lines at $\pm 2\sigma$.

3.13 Comparison with commercial pH-meter

Once the μ CAD was fully characterized, seven different samples were analyzed using the μ CAD and the obtained results were compared to the ones provided by a pH-meter Crison, mod. micro pH2000 (Barcelona, Spain).

Table 3.3 Validation of samples using the μ CAD and a pH-meter as reference method ($n=3$).

Sample	pH-meter	μ CAD	Error (%)
Pool water	7.5	7.6	1.3
Tap water 1	7.7	7.9	2.6
Tap water 2	7.3	7.4	1.4
Standard buffer solution 1	8.4	8.0	4.8
Standard buffer solution 2	6.3	6.5	3.2
Contact lens fluid 1	7.3	7.3	0.0
Contact lens fluid 2	7.6	7.5	1.3

Table 3.3 shows the obtained results, being the error in the determination around 2% in almost all the cases.

3.14 Android™ application development

To transmit the data from the wristband to a smartphone, a user-friendly Android™ application was developed. Android Studio 3.5.3 was used as the integrated development environment (IDE) to code the application, which was designed and tested against API level 27 (Android 8.1). However, it supports different Android versions as the lowest API level compatible with the application is API 14 (Android 4.0).

The application takes control of the Bluetooth interface of the smartphone to communicate with the Bluefruit LE module. Once the wristband is paired with the smartphone, the BLE sends in real time the measured color data obtained with the color sensor (RGB coordinates) from the MCU to the smartphone app. The obtained RGB data are displayed on the screen as shown in *Fig. 3.28(a)*. The RGB coordinates are then converted to Hue value (H) in the HSV color space. The graph of the H values can be obtained in the middle tab of the app interface, as depicted in *Fig. 3.28(b)*.

Finally, the pH values are computed from the normalized H values as per the obtained calibration, and the graph is displayed in the last tab of the app as shown in *Fig. 3.28(c)*. For data visualization, MPAndroidChart open-source charting library version 3.1.0 was used (Jahoda, 2016). The user can scroll, pan, and zoom in and out in the displayed graphs. *Fig. 3.28(d)* shows the menu bar with the different options offered by the app: Save chart, Clear chart, Save data, Share and About. Through the Save chart and Save data options, the application provides a datalogger function to save the measurements in a text file and the graph as an image file that are stored in the smartphone's memory. The results (both graphical views and stored values) can be shared through email and/or different cloud or messaging services using the Share option as illustrated in *Fig. 3.28(e)*, thus allowing the possibility to connect to remote health care providers or medical experts.

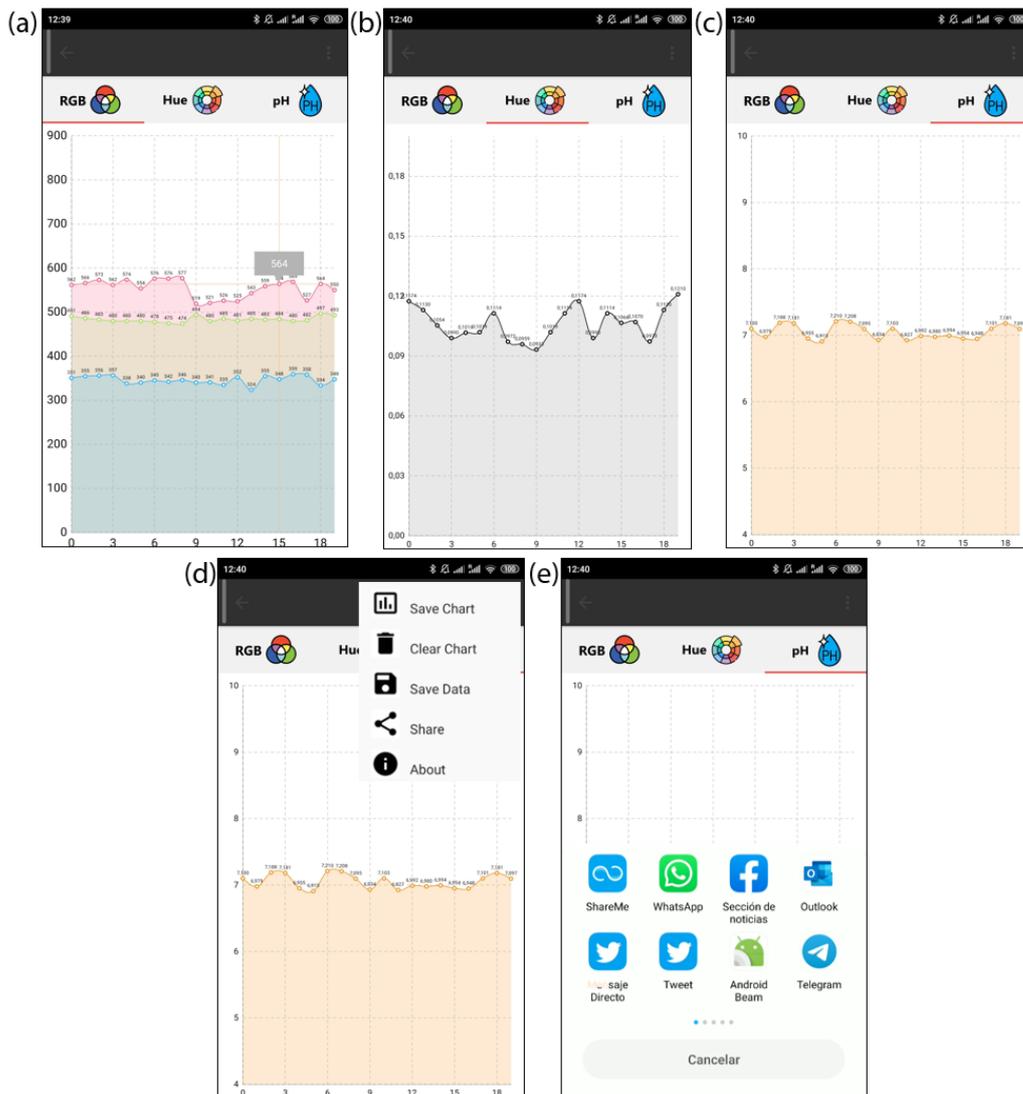


Figure 3.28 Screen captures of the custom-developed app showing (a) RGB coordinates, (b) H values and (c) pH values; (d) menu bar with the options offered to the user; (e) option Share where the user can send the logged data and graph through different messaging and/or cloud services.

3.14 Wristband performance and evaluation

As indicated in previous sections, the μ CAD was analytically characterized for pH sensing and a calibration function was obtained using a camera to register the color variations (see Fig. 3.25). At this stage, the whole system was characterized using the optimized μ CAD in combination with the readout and processing electronics. Thus, the way of registering the color changes in the μ CAD due to the sweat pH was conducted through the digital color sensor included in the readout circuit (see Fig. 3.29(a–b)). For the

calibration, a similar setup than the previous case was employed, i.e. a syringe pump was used to apply the sample on the sampling zone at a flow rate similar to the human sweat rate ($0.01 \mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$). Each pH standard solution was applied to the μCAD during two minutes and the color measurements from the digital sensor were transmitted every second to the smartphone app via Bluetooth. *Fig. 3.4(c)* shows the obtained calibration curve, that can be again fitted to a Boltzmann curve ($R^2 = 0.997$) (Eq. 2). In this case, the range of use of the μCAD ranges from 6.0–8.0, and the precision at different pH values goes from 3.6 to 6.0 % (see *Table 3.4*). In addition, the system was tested in real-life conditions by wearing it on the wrist while exercising and transmitting the data in real-time to a smartphone via Bluetooth. *Fig. 3.29(d)* shows the experimental setup and the obtained results. Two different sections can be distinguished in this graph: (i) a priming section (0–7 min) that comprise the time to start sweating as well as wetting the fluidic channel and sensing area; and (ii) a pH-responsive section once the whole system is conditioned. Once the priming time has finished (vertical dashed line in *Fig. 3.29(d)*) the sampling area has changed its color due to the sweat pH. Considering the device calibration depicted in *Fig. 3.29(c)*, which was conducted using pH standard solutions, we have highlighted in *Fig. 3.29(d)* some pH values in this section. At that point, the pH values stand at around 6.4–6.6, which is consistent with previous research works in this field [297,312].

3.15 Electronics performance

All the components in the readout and processing electronics were selected for low power consumption, thus allowing long battery life. The white LED has a very low power consumption of only 0.8 mW, while the S11059-02DT color detector only consumes 250 μW in operational mode. The heart of the readout circuit, i.e. the PIC12LF1822 MCU was setup at 500 kHz low-power internal oscillator. Without considering the Bluetooth module, the consumption of the readout circuit including the MCU, color sensor and LED is 8.5 mW in operational mode. The Bluetooth module in transmission mode has an average current consumption of 2.11 mA, meaning that the power consumption at the battery voltage supply of 3.7 V is 7.81 mW. Therefore, the consumption of the whole wristband system including the wireless transmission is 16.31 mW. Considering the

battery capacity, this means that the expected battery life is around 34 hours in continuous operational mode, which is enough for the proposed application.

Even so, the battery life was further extended by implementing a non-continuous sensing and transmission protocol in the MCU program. Due to the nature and rate of the human sweat, it is not necessary to sense and transmit the data in a continuous way. Instead, in a real-life application it would be enough to conduct the sensing measurements and transmit the data every 5 seconds. During the rest of the time, the system can be entered in a power-down mode. This means that the number of wakeups per hour is 720. The measured time needed by the system to take, process and transmit the color measurements in each wake up is roughly 1 second. In power-down mode, both the LED and the color sensor are switched off, while the MCU is configured to sleep mode with a power consumption of only 74 nW. During the non-operational periods, the Bluetooth module is set to a slow advertising mode. Altogether, the power consumption in power-down or sleep mode is reduced down to 5.25 mW. Considering the capacity rating of the battery (150 mAh), the power consumption of the wristband in each mode, and the number and duration of wakeups, the estimated battery life following this approach would be 2.63 days. In any of the cases (continuous or non-continuous operation), the wristband presents a battery life much longer than the absorption capacity of the Flexicel pad, which is currently limited to 1058 min. Depending on the sweating rate and the required application, the absorbent pad could be replaced to allow longer operations thanks to the low power consumption of the associated electronics. As an illustrative example, if the wristband was used daily during 100 min for a training session, the electronics would allow operation for more than one month before requiring the battery charging. In this case, only the disposable absorbent pad in the μ CAD would require a replacement every 1058 min, i.e. more than 17 hours. In the case of sessions of 100 min duration, this would mean a replacement every 10 sessions approximately.

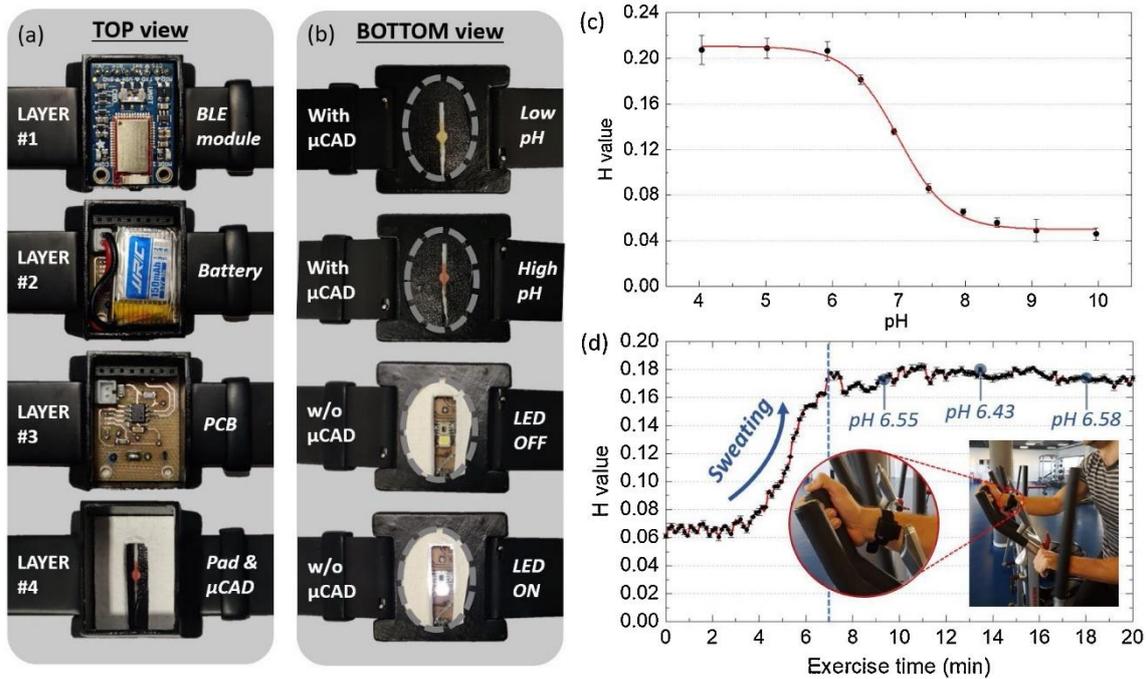


Figure 3.29 (a) Layer by layer top view of the wristband, including: 1) Low-Energy Bluetooth module, 2) battery, 3) PCB, and 4) absorbent pad with μ CAD; (b) Bottom view of the wristband (uncovered) with and without the μ CAD layer to allow the view of the LED and color detector; (c) Calibration curve of the wristband wearable system in terms of H value; (d) Real-time results of the wearable system placed on the wristband during exercise.

Table 3.4 Analytical parameters of the wristband.

Analytical parameters			
A_1	0.210	Precision (n=10)	
A_2	0.050	pH	CV(%)
A_3	0.699	6.00	4.0
A_4	0.377	6.43	6.0
R^2	0.997	6.93	4.5
LOD	6.1	7.97	4.3
Range	6.1-8.4	7.97	3.6

Overall, the developed system is convenient in terms of portability, ease of use and wearability. With a total weight of 25 g (including the strap), which is in line with the most popular fitness wristbands such as the Fitbit Charge 4 (30 g), Garmin Vivosport (27 g), or Samsung Galaxy Fit (24 g), the developed wristband is light-weight and comfortable to wear. Several previous works have focused on the development of sensing patches for sweat pH monitoring [281,288,291,293,295], but they lacked the

associated readout and processing electronics to obtain and transmit in real-time the measured information to the end user. In contrast to the RFID/NFC-based platforms for pH sweat sensing than can be found in previous literature [278,294,300], our proposed wristband does not require that the external reader is permanently placed in its close proximity, thus allowing a truly continuous real-time monitoring. In return, our system requires a battery for its operation, which is not needed in the case of RFID/NFC devices with energy harvesting capabilities [296]. However, the use of low-power components in combination with the non-continuous measurement strategy allows a long battery life of more than 2 days. In terms of response speed, our system only takes 90 s to get a steady signal in the sensing zone using the passive pump to collect the sweat, which is significantly lower than the time required in other systems to get the first readings [272]. Besides, the proposed wristband is distinguished from previous sweat pH monitoring systems in two more aspects: firstly, it features a very compact and light-weight design with a size similar to a wristwatch, making it more comfortable to use than other devices that must be placed, for instance, in the back; and secondly, it is completed by a custom-developed user-friendly smartphone application [273,291,297,303].

4. Conclusions

A wearable wristband for sweat pH wireless monitoring was developed combining a custom-designed μ CAD and associated readout and processing electronics. The μ CAD was designed in 100 % cotton cloth by immobilizing an acidochromic dye (AD-VS-1). The μ CAD consists of a sampling area to collect the sweat, a colorimetric sensing area, a passive pump path, and an absorbent pad that allows continuous operation up to 100 min if we consider a typical human sweat rate ($0.01 \mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$). The H value in the HSV color space was selected as the best parameter to correlate the color change in the sensing area due to the pH variations. The readout module consists of a low-power microcontroller unit that controls a white LED and a digital color sensor to detect the color variations in the μ CAD sensing area. In addition, a Bluetooth module transmits in real-time the measurements to a friendly-user smartphone application. The analytical characterization of the μ CAD alone showed that the H parameter can be related to the sweat pH value and fitted to a Boltzmann equation ($R^2 = 0.996$). The range of use of the

μ CAD goes from 6.1–8.4, which includes the pH range of sweat. The precision tested at different pH values goes from 2.3 to 3.6 %. When compared to a commercial pH-meter with different samples, the error in the determination was around 2% in almost all the cases. The analytical characterization of the complete wristband showed a good fitting ($R^2 = 0.997$ in the Boltzmann equation) with a range of use from 6 to 8 and a precision at different pH values from 3.6 to 6.0 %. With an estimated battery life up to 2.63 days in non-continuous sensing mode, the developed system has potential applications in the field of personal health assessment.

Acknowledgements

This work was founded by Spanish “Ministerio de Economía y Competitividad” (Projects PID2019-103938RB-I00 and CTQ2017-86125-P) and Junta de Andalucía (Projects B-FQM-243-UGR18 and P18-RT-2961). The projects were partially supported by European Regional Development Funds (ERDF).

FIGURE INDEX

Figure 3.1 Graphical abstract of the wristband components.	214
Figure 3.2 Synthesis of AD-VS-1.	217
Figure 3.3 Screen-printed pattern on the cotton cloth.	219
Figure 3.4 (a) Chemical structure of AD-VS-1; (b) μCAD design; (c) μCAD photograph; (d) Block diagram of the processing electronics in the readout module; (e) Schematic diagram of the sensing procedure	220
Figure 3.5 3D-printed wristband case design.	222
Figure 3.6 Wicking behavior of cotton cloth. A) Area vs time; B) Area vs <i>time</i>.	223
Figure 3.7 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) of compound 1.	225
Figure 3.8 $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) of compound 1.	226
Figure 3.9 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) of compound 2.	226
Figure 3.10 $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) of compound 2.	227
Figure 3.11 Absorbance spectra of AD-VS-1 solved in DMSO. Blue: $0.313 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	227
Figure 3.12 Molar extinction coefficient of AD-VS-1 calculated in DMSO.	228
Figure 3.13 Color change of the AD-VS indicator immobilized on cloth depending on the pH.	228
Figure 3.14 Variation of R (red dots), G (green dots), B (blue dots)	229
Figure 3.15 Dependence of H parameter with pH.	229
Figure 3.16 Aspect of the sensing area after addition of different volumes of Brilliant Blue solution:	231
Figure 3.17 Optimization of AD-VS-1 solution used for μCAD preparation. $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (blue dots),	231
Figure 3.18 μCAD response depending on the making procedure. Patterning and then AD-VS-1.	232
Figure 3.19 μCAD calibration from acidic to basic pH (blue dots)	233
Figure 3.20 μCAD calibration and fitting to a Boltzmann equation ($n=6$).	234
Figure 3.21 Water absorbed by Flexicel material depending on:	235
Figure 3.22 First whole μCAD design for continuous flow measurements.	236
Figure 3.23 Upside down first whole μCAD design for continuous pH measurements.	236
Figure 3.24. Black screen-printed cloth with dimensions	237
Figure 3.25 Calibration curve of the μCAD including the passive pump, where the	238
Figure 3.26 Reversibility of the μCAD. Acidic-basic-acidic cycle (blue line);	239
Figure 3.27 Lifetime of the μCAD. Dotted line: upper and lower control lines at $\pm 2\sigma$.	240
Figure 3.28 Screen captures of the custom-developed app showing (a) RGB coordinates,	242
Figure 3.29 (a) Layer by layer top view of the wristband, including: 1) Low-Energy Bluetooth module, 2) battery, 3) PCB, and 4) absorbent pad with μCAD; (b) Bottom view of the wristband (uncovered)	245

TABLE INDEX

<u>Table 3.1 Average CV from the 10 standard solutions tested with each AD-VS-1 solution (n=5)</u>	232
<u>Table 3.2 Analytical parameters of μCAD</u>	238
<u>Table 3.3 Validation of samples using the μCAD and a pH-meter as reference method (n=3)</u>	240
<u>Table 3.4 Analytical parameters of the wristband</u>	245

CAPÍTULO 4

QRSENS: DUAL-PURPOSE QUICK RESPONSE CODE WITH BUILT-IN COLORIMETRIC SENSORS

CAPÍTULO 4: QRSENS: DUAL-PURPOSE QUICK RESPONSE CODE WITH BUILT-IN COLORIMETRIC SENSORS

Planteamiento

El desperdicio de comida y la seguridad alimentaria son dos de los factores más importantes que afectan a las sociedades modernas tanto a nivel medioambiental y económico como a la salud pública y el bienestar. Una posible solución para prevenir hasta dos tercios del desperdicio de comida y controlar las enfermedades transmitidas por los alimentos es el seguimiento a tiempo real de la calidad alimentaria a través de toda la cadena de suministro de alimentos. Entre las tecnologías emergentes para llevar a cabo dicha tarea se encuentra el envasado inteligente, que ha ganado especial interés en los últimos años. El envasado inteligente podría definirse como aquel envasado que contiene un indicador externo o interno que provee de información en cuanto al historial del envase y/o la calidad de los alimentos. Los envases inteligentes tienen integrados un sensor para uno o varios analitos específicos, que puede suministrar información relacionada con atributos como el frescor, la emisión de gases o la contaminación microbiana, etc. y hacer llegar esta información al consumidor, fabricante o distribuidor.

El envasado inteligente principalmente incluye indicadores de frescor, de temperatura, de fugas y sensores de diferentes gases que pueden producirse debido a la descomposición del alimento. Un gas investigado en relación con la detección del deterioro de alimentos ricos en proteínas como son la carne, el pescado y algunos vegetales, es el amoníaco. En el caso del sulfuro de hidrógeno, gas volátil que se produce mayoritariamente durante el proceso de degradación de aminoácidos que contienen azufre, es característico para detectar la putrefacción de la carne. El dióxido de carbono, sin embargo, es un gas incoloro e inodoro que inhibe el crecimiento bacteriano y fúngico, por lo que suele emplearse como componente principal de la atmósfera modificada en envases alimentarios y constituye un parámetro clave para controlar si el envase ha sufrido fugas que puedan poner en peligro la integridad del alimento que contiene.

De igual manera, el control de los niveles de CO₂ también puede ser útil en aplicaciones relacionadas con la salud. Es de sobra conocido que los niveles atmosféricos de CO₂ normales no son perjudiciales para la salud humana, sin embargo, la acumulación de CO₂ en espacios cerrados sí puede constituir un peligro para la salud. Algunos estudios han descrito cómo la inhalación continuada de CO₂ en ambientes de interior lleva a síntomas de incomodidad, fatiga, mareo, dolor de cabeza, sudoración, debilidad muscular, dificultades para respirar y somnolencia. Además de la calidad del aire, la temperatura y la humedad también pueden asociarse con la exposición microbiana en interiores, que se relaciona con efectos pulmonares adversos. Adicionalmente, estudios recientes han relacionado la humedad, la temperatura y el nivel de CO₂ con la transmisión de enfermedades víricas como el COVID-19, por lo que también resulta de interés emplear sensores similares a los del envasado inteligente en ambientes cerrados para controlar que las condiciones ambientales sean saludables.

Finalmente, en 2019 se vivió una democratización en el uso de los códigos de respuesta rápida (QR) propiciada por la pandemia de COVID-19. Los códigos de respuesta rápida empezaron a producirse masivamente con el aumento de supermercados en los que era necesario un sistema automático para identificar los productos suministrados. Los primeros en aparecer fueron los códigos de barras (en 1970), que se podían leer con un escáner láser y poseían información codificada en forma de un conjunto de líneas de diferentes grosores apiladas [313]. Lo que se conoce actualmente como código QR no llegaría hasta más adelante, 1994, cuando en Japón una empresa decidió rastrear las partes de los vehículos durante su fabricación [314]. Un código QR generalmente consta de muchos bloques pequeños de forma cuadrada ordenados dentro de una cuadrícula con tres cuadrados más grandes en las esquinas que dan la posición de detección, el tamaño, el ángulo y el reconocimiento de forma exterior. Cuando un lector escanea el código QR lo primero que hace es identificar esos tres cuadrados y luego lee la información codificada dentro de ellos en todas las direcciones. Estos sistemas se han extendido en los últimos años a múltiples áreas de la vida cotidiana como son la educación, la salud, la nutrición, el entretenimiento y la cultura, el comercio y la seguridad entre otros, debido a las ventajas que presentan frente a otros tipos de sistemas como son la capacidad de codificar mayores volúmenes de información, ser

más rápidos y fáciles de leer y la facilidad de poder ser escaneados digitalmente mediante la cámara de un smartphone.

En ese sentido, la posibilidad de incluir en los códigos QR sensores químicos para envasado inteligente y control de ambientes cerrados resulta de especial interés por combinar la respuesta a tiempo real, simple, de bajo coste, fiable y no destructiva.

Objetivo

El objetivo de este trabajo es desarrollar una familia de códigos sensores de respuesta rápida (QR) para el análisis *in situ* con una aplicación móvil capaz de leer a la vez un código QR y sensores colorimétricos. En cada código QRsens se han integrado tres elementos sensores aprovechando la estructura y componentes del código QR en sí mismo, de manera que no se vea afectado su propósito principal como dispositivo de almacenamiento de datos.

Para lograr este objetivo lo primero que se hizo fue preparar cinco tintas diferentes capaces de mostrar variaciones colorimétricas frente a variaciones de temperatura, humedad relativa y concentraciones de CO₂, NH₃ y H₂S.

Para lograr la fabricación del código QR y el desarrollo de la aplicación móvil, se trabajó en colaboración de los miembros del ECsens pertenecientes al Departamento de Ingeniería Electrónica. El diseño del código se realizó sustituyendo los tres ojos interiores de los patrones de posición con las tintas e introduciendo en la zona central del código, normalmente empleada para imágenes corporativas, dos círculos adicionales como referencias blanca y negra para la corrección del color. La aplicación se programó para Android, implementando el procesado automático de la imagen para la detección, el almacenamiento de datos y la posible compartición de resultados. Además, se logró la corrección del color en función de la iluminación, un aspecto crucial para poder usar el QRsens de forma reproducible en diferentes lugares con diferente iluminación sin necesidad de accesorios externos.

Por último, se estudió la sensibilidad cruzada midiendo la variación máxima de señal de cada una de las tintas en presencia del resto de gases para una concentración fija del gas analito. Se comprobó también la influencia de la temperatura midiendo la señal frente a un incremento de 25°C. Otros trabajos similares en los que se han empleado códigos similares a los QR para análisis químico se recogen al final de este estudio.

Este trabajo puede resumirse en las siguientes etapas:

1. Preparación y disposición de las tintas colorimétricas
2. Desarrollo de la aplicación móvil

3. Corrección del color en función de la iluminación
4. Calibración del QRsens
5. Estudio de sensibilidades cruzadas

QRSENS: DUAL-PURPOSE QUICK RESPONSE CODE WITH BUILT-IN COLORIMETRIC SENSORS

Abstract

QRsens represents a family of Quick Response (QR) sensing codes for *in-situ* air analysis with a customized smartphone application to simultaneously read the QR code and the colorimetric sensors. Five colorimetric sensors (temperature, relative humidity (RH), and three gas sensors (CO₂, NH₃ and H₂S)) were designed with the aim of proposing two end-use applications for ambient analysis, i.e., enclosed spaces monitoring, and smart packaging. Both QR code and colorimetric sensing inks were deposited by standard screen printing on white paper. To ensure minimal ambient light dependence of QRsens during the real-time analysis, the smartphone application was programmed for an effective colour correction procedure based on black and white references for three standard illumination temperatures (3000, 4000 and 5000 K). Depending on the type of sensor being analysed, this integration achieved a reduction of ~71 – 87% of QRsens's dependence on the light temperature. After the illumination colour correction, colorimetric gas sensors exhibited a detection range of 0.7–4.1%, 0.7–7.5 ppm, and 0.13–0.7 ppm for CO₂, NH₃ and H₂S, respectively. In summary, the study presents an affordable built-in multi-sensing platform in the form of QRsens for *in-situ* monitoring with potential in different types of ambient air analysis applications.

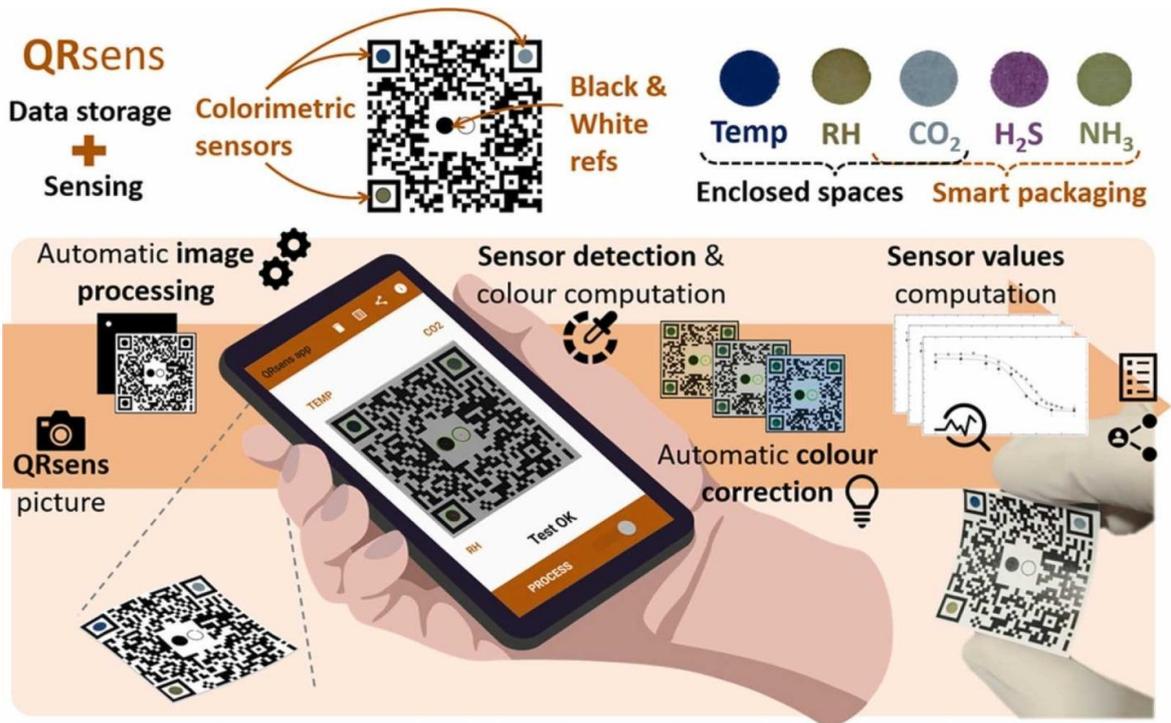


Figure 4.1 Graphical abstract.

Keywords

QR code, Colorimetric sensors, Colour correction, Smartphone, QR analytical devices.

1. Introduction

Quick Response codes emerged in the 1990s with additional advantages over traditional barcodes such as the possibility of encoding (storing) a greater volume of information, being faster and easier to read, and the ability to be digitally scanned through a smartphone camera [315]. A traditional QR code is a two-dimensional matrix with several small blocks arranged in a square-shaped grid with three large squares in the corner for position detection, size, angle, and outer shape recognition. Upon scanning a QR code, the reader (e.g., a smartphone) initially identifies these three squares' patterns and then reads the encoded information within it in all directions. QR codes were initially designed for inventory tracking in vehicle parts manufacturing [316], however, their use has expanded to products quality control, life cycle management, supply chain management, in the media (e.g., TV shows and newspapers) and to store Uniform Resource Locators (URLs) or other custom identifiers (e.g., the COVID-19 vaccination certificate). QR codes are also widely used in distinct areas of daily life such as education [317], health [318,319], nutrition [320,321], entertainment and culture [322,323], commerce [324], and security [325], among others [326–328]. The epidemic use of smartphones enables QR codes as a potential gateway to the Internet of Things (IoT) within the reach of any individual user [329].

In this context, herein we present QRsens, an enhanced QR code with built-in colorimetric sensors. The general concept of the developed system is shown in *Fig. 4.2*. Taking advantage of a traditional QR code anatomy, the three-positioned corners of the QR code have been replaced by circle-shaped colorimetric sensors [330]. In combination with a custom-developed smartphone application where image processing of QRsens is conducted, multiple sensing capabilities have been added to standard QR codes while retaining its original purpose as data storage systems. QRsens codes were fabricated by screen printing technology in a white paper substrate using a commercially available two-component thermochromic ink and custom-developed sensing inks for relative humidity (RH), carbon dioxide (CO₂), ammonia (NH₃), and hydrogen sulphide (H₂S). The colour change of the sensors was characterised by the evaluation of the hue (H) or saturation (S) values in the HSV colour space, captured and automatically processed through the developed smartphone application. By combining three of these five

sensors, two versions of QRsens codes are proposed in this work, aimed at two end-use applications: enclosed spaces monitoring (temperature, RH, and CO₂ sensors) and smart packaging applications (H₂S, NH₃, and CO₂ sensors). Additionally, two black and white (B/W) references are printed in the centre of QRsens to conduct automatic colour correction of environmental light conditions for the detected colorimetric sensors during the image processing pipeline. Although other developments of QR-like codes with colorimetric sensors can be found in the literature, the proposed device make use of five sensors (that can be combined into groups of three) that have never been simultaneously proposed in other solutions. Additionally, the presented system distinguishes from previous works by combining the following aspects simultaneously: *i)* QRsens can be manufactured using standard fabrication techniques, i.e., screen-printing; *ii)* The QR code still maintains its original functionality as data storage device; *iii)* It implements an automatic light colour correction technique; and *iv)* An ad-hoc smartphone application has been developed implementing automatic image processing for sensor detection and colour correction, data storage, and results sharing. The comparison with other systems is shown below in more detail in *Table 4.9* of the Results and Discussion section.

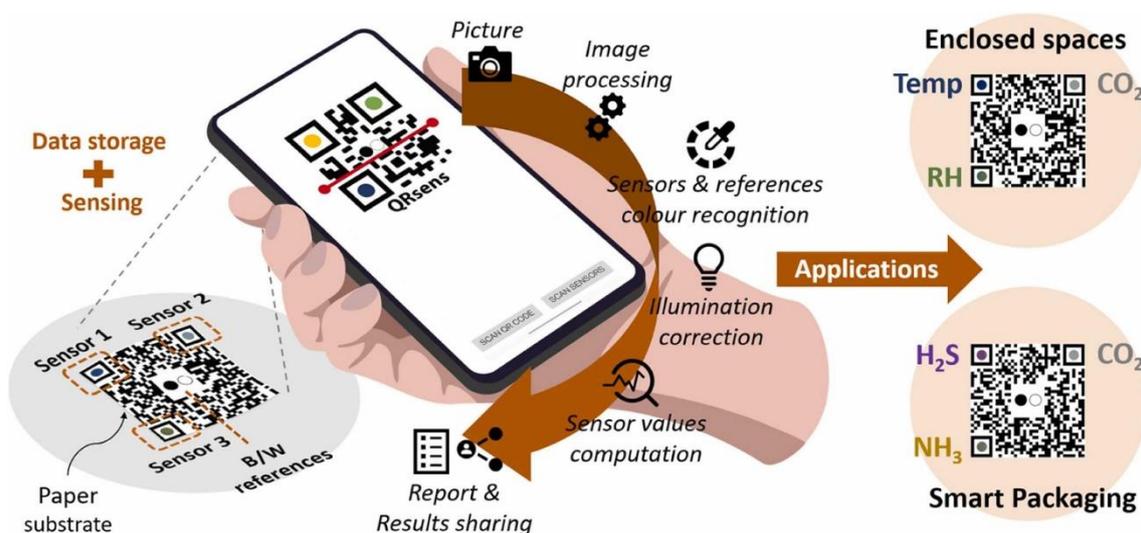


Figure 4.2 System overview and concept of QRsens, which consists of a QR code with integrated colorimetric sensors in combination with a custom-developed smartphone application for the acquisition and automatic processing of QRsens. Two different end-use applications are proposed by combining three of the five custom-developed sensors: enclosed spaces monitoring (temperature, RH, and CO₂) and smart packaging sensing (H₂S, NH₃, and CO₂).

The proposed applications of QRsens are based on the sensor's combination in each case. For instance, NH_3 detection can be used as a "freshness label" for smart food packaging applications due to its natural release from protein degradation. NH_3 detection is well suited for spoilage detection in protein-rich foods such as meat, fish, and vegetables [331,332]. In the case of H_2S , it is a volatile gas mainly produced during the degradation process of the sulphur-containing amino acids, so it is a characteristic compound to assess meat spoilage [333,334] as well. CO_2 inside food packages is also a key parameter to control in modified atmosphere packaging (MAP) applications to create a protective atmosphere surrounding the food, with the aim to decrease microbial growth rate and therefore extend the shelf life of the packed food [335]. Typically, CO_2 is flushed into the package to obtain concentrations above 60% [336]. In this context, QRsens could inform of a leakage in the package if CO_2 concentration falls drastically below this threshold. In any case, it is worth mentioning that for smart packaging applications the QRsens code would be placed inside the package to be monitored, which is a typical requirement in this type of systems [333,335,336]. In that case, it would be necessary to study migration of dyes, toxicity of chemicals, etc. Additionally, the package must be optically transparent as it is common in most of food packages. Likewise, CO_2 monitoring can also be useful in health-related applications. It is well known that normal atmospheric air levels ($\sim 0.04\%$) are not harmful, however, a continuous accumulation of CO_2 in confined spaces becomes a potential danger to human health. Some studies have related prolonged CO_2 inhalation in indoor environments to symptoms of discomfort, fatigue, dyspnoea, dizziness, headache, sweating, muscular weakness, and drowsiness [337,338]. In this case, QRsens could serve as a threshold detector if CO_2 exceeds safety limits. Along with air quality, temperature and RH can also be associated with indoor microbial exposure, which is related to adverse pulmonary health effects [339]. Additionally, many recent studies have also connected these three parameters with SARS-CoV-2 transmission [340–342]. It is worth mentioning that other QRsens codes could be proposed using different combinations of the colorimetric sensors, or alternative applications could also be targeted using the same sensors. For instance, temperature and RH can be also related to food spoilage [343]. Likewise, NH_3 and H_2S monitoring also have high relevance in terms of environmental safety [344,345].

2. Materials and methods

2.1 Reagents and materials

The chemicals used for the preparation of the sensing inks are tributyl phosphate (TBP), o-nitrophenyloctylether (NPOE), α -naphtholphthalein, Crystal Violet, tetraoctylammonium hydroxide (TOAOH), bromophenol blue sodium salt, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), a copper complex of 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol (PAN-Cu), ethanol, methanol, toluene, acetone, ethyl cellulose, nafion 5 wt. %. Tetraethyl orthosilicate (TEOS), trimethoxyphenylsilane (PTMOS) and hydrochloric acid 0.1M were also used for the sol-gel preparation. All the reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) and are analytical-reagent grade. ChromaZone thermochromic pigment from TMC Hallcrest (Flintshire, UK). Black plastisol ink (ref. 5051-BLACK, Marancolor S.L, Madrid, Spain). Filter paper (ref. 1248, basis weight 80 g·m⁻²; thickness 210 μ m; retention 25-30 μ m) from Filter-Lab as substrate.

A semiautomatic screen-printing machine MSM-004V (Croma Ibérica SL, Girona, Spain) and a 120 nylon threads per centimetre (T·cm⁻¹) mesh screen was used to fabricate the circular-shaped colorimetric sensors. The standard gas mixtures used to characterize the CO₂, NH₃ and H₂S sensing membranes were made using N₂ as the inert gas by controlling the flow rates of N₂ and different analytes with a computer-controlled mass flow controller (Iberfluid Instruments, Spain). The flow rate was 500 cm³·min⁻¹ and the pressure 1 atm. For humidity and temperature, a climatic chamber VCL4006 (Vötsch Industrietechnik, Germany) to obtain atmospheres with different humidity and temperature.

Android Studio 4.2.2 was used to develop the custom application, where the open-source computer vision OpenCV 3.1.0 library was employed for the acquisition and image processing tasks. The developed application was installed in a Samsung Galaxy S7 smartphone (Samsung, Seoul, South Korea) for the measurement process under different illumination conditions. For the calibration process under constant light conditions, the free app Camera Zoom FX was used with the following configuration: ISO 800, EV 0.0, auto focus, WB incandescent.

2.2 Colorimetric inks fabrication

Thermochromic ink

For the preparation of the temperature-sensitive ink, it was required to mix and homogenise in the same proportion (1.0 g each) of the two-component reversible thermochromic ink. The blue ink turns colourless when heated up.

RH sensitive ink

The humidity-sensitive ink requires a mixture of 1.2 mL of a solution of 10 mg of Crystal Violet in 1.4 mL of methanol and 1.3 mL of nafion 5%.

Thickening mixture

To improve the rheological properties of the sensing inks and be possible its deposition by screen printing, a thickening mixture was used. It was prepared with 20 g of ethyl cellulose, 100 mL of ethanol and 5 mL of TBP.

CO₂ sensitive ink

For the preparation of the CO₂-sensitive ink, 320 µL of a solution of 4.7 mg of α -naphtholphthalein in 4.3 mL of ethanol were added to 600 µL of TOAOH. Later, 1 mL of the sensing cocktail was added to 2 g of thickening mixture.

H₂S sensitive ink

The H₂S-sensitive ink was prepared with 7 mg of PAN-Cu complex, previously synthesised [346] with 5 mL of KOH (0.19 M) and 5 g of the thickening mixture with the carbon dioxide ink.

NH₃ sensitive ink

The NH₃-sensitive ink is composed of 6 mg of bromophenol blue sodium salt, 0.115 g of NPOE, 13.5 mg of CTAB in 2 mL of acetone. The needed sol-gel was prepared the day before the deposition by mixing 1.1 mL of TEOS, 470 µL of PTMOS, 500 µL of ethanol, 658 µL of water and 375 µL of HCl 0.1 M. Later it was vortexed for 15 seconds and sonicated at 20 °C for 10 min. Finally, a 1:1 mixture of dye and sol-gel was used for membrane preparation.

2.3 Colorimetric inks deposition

The deposition of the colorimetric inks in their specific QRsens locations was performed by screen printing (temperature, H₂S and CO₂) and by dropping (humidity and NH₃). In the case of temperature, H₂S and CO₂, the sensing membranes were screen-printed as circles included on three of the corner squares of a QR code, which was previously printed with plastisol black ink on filter paper. After the printing, the QR codes were dried at room temperature for ten minutes, and no further sintering was required. In the case of temperature, CO₂ and H₂S sensors, they were directly screen printed as 3-mm diameter circles included on the corresponding corner squares of the QR code.

On the other hand, for the NH₃ sensor, a 3-mm diameter empty circle was screen-printed using black plastisol ink during step 1 of the fabrication process, as depicted in *Fig. 4.2b* in the main manuscript. Later, 12 µL of 1:1 dye:sol-gel solution was dropped inside the circle, leaving it dry at room temperature for 10 minutes. Then, 25 µL of phosphate buffer pH 3.2 (0.2 M) was dropped, letting it dry. RH sensing membrane was prepared by spin coating 12 µL of RH sensitive ink at 140 rpm on a 1-cm diameter Mylar circle. After drying by leaving it at room temperature for 10 minutes, a 3-mm diameter circle of sensing membrane was glued on the corresponding corner of the QR code.

2.4 QRsens design and fabrication

QRsens was designed to simultaneously have dual functionality: (i) as a standard QR code to store custom information, and (ii) as a sensing platform with up to three colorimetric-based sensing elements. Such sensing elements have been integrated into the QR code taking advantage of the structure and components of the code itself, thus enhancing the functionality of the original QR code design without affecting its main purpose as a data storage device. In essence, QRsens benefits from the anatomy of a standard QR code to add the sensing functionalities, in particular from the position markers, i.e., the three large square patterns in the corners of the code used for detecting its position, size, angle and outer shape [315]. The inside code consisting of several small blocks where the information is encoded is kept unaltered, so the QR code continues to serve its original purpose. Additionally, QRsens takes advantage of two design aspects of standard QR codes: (i) the inner eyes of the position patterns (see *Fig.*

4.3a) can take other shapes different from the traditional square shape; and (ii) a free area or empty space can be left in the centre of the code, normally used to place any custom image or logo. In this way, the three inner eyes of the position patterns are replaced by the corresponding three circular-shaped colorimetric sensors, while the empty space in the centre is used to locate two additional circles -the black and white (B/W) references- for light colour correction during the image processing pipeline. The reason for the circular shape of the sensors and the B/W references is related to the image processing conducted in the developed smartphone application (see details in Section 3.2). Furthermore, the area in the QR code that contains the data (for example, an URL) is extended to also encode the information about which sensor is placed in each corner of the QRsens code. Following this approach, when the user reads the code with the custom smartphone application, such information regarding the sensors is automatically detected and separated from the original information of the QR code (e.g., the URL), so the process is transparent for the end-user and QRsens is self-contained with respect to its sensing functionality. To that end, information about the sensors is placed before the original data using specific keywords separated by semicolons, as detailed below. A visual summary of the design process from a standard original QR code to a QRsens code is given in *Fig. 4.3a*.

For the initial design of the code, any online QR code generator tool can be used (e.g., <https://www.qrcode-monkey.com/>). In this work, we propose two types of QRsens codes using two combinations of the five proposed sensors. Each combination is aimed at one particular application. In the first case, temperature, RH and CO₂ sensors are included in QRsens for enclosed spaces monitoring. The second combination includes H₂S, NH₃ and CO₂ sensors for smart packaging applications. According to the described design process, the first case will contain the following text encoded in the data area: *TEMP;CO₂;RH;URL*, while for the second case the encoded text will be: *H₂S;CO₂;NH₃;URL*. In both cases, for the fabrication of the different prototypes, the URL was chosen as the webpage of the research group for the proof-of-concept prototype. Following the same approach, other QRsens devices could be created by using different combinations of the colorimetric sensors, depending on the targeted application, and replacing the URL by any other custom information. The employed reagents and materials and the

colorimetric inks fabrication process are described in Sections 2.1 and 2.2, respectively. Fig. 4.3b shows the fabrication process of the QRsens codes including the colorimetric inks deposition, which is described in more detail in Section 2.3.

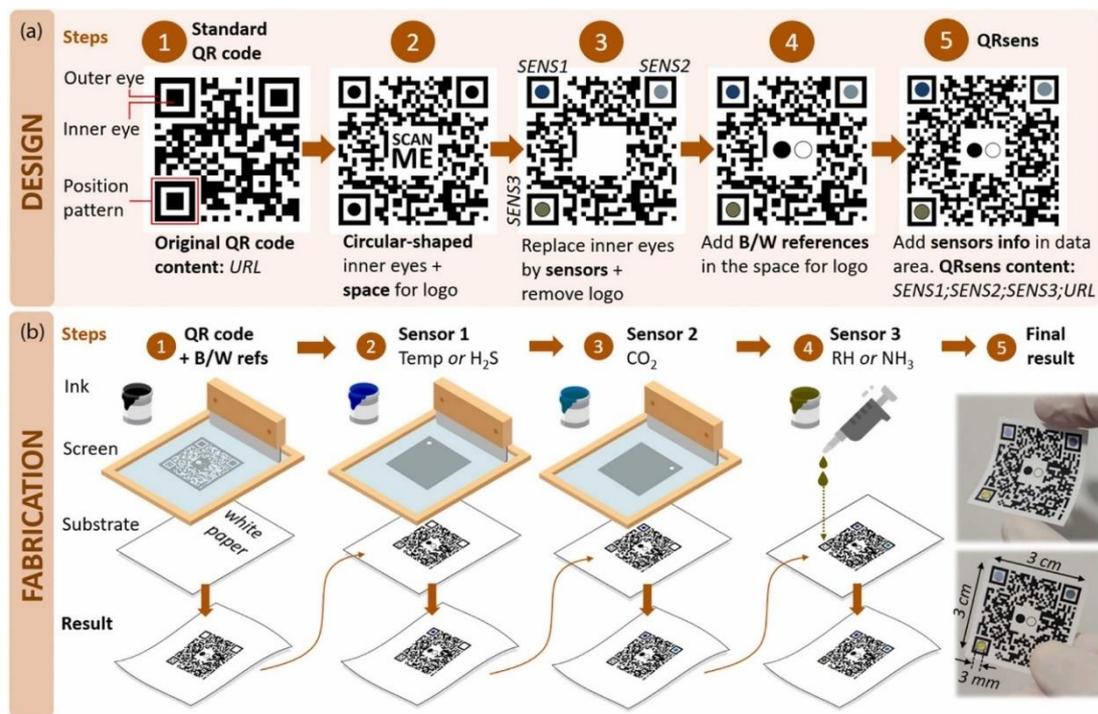


Figure 4.3 (a) Design process from a standard original QR code to a QRsens code. (b) Fabrication steps of the QRsens code by screen printing and drop-casting. The final result photograph corresponds to the combination of temperature, RH and CO₂ sensors.

2.5 Calibration setups and measurements

Calibration of the designed setups was conducted under constant illumination conditions by placing QRsens inside a custom cubic light box illuminated by two LED light strips (50 LEDs each – 550 lumens, 5600K colour temperature) located at a fixed position. To obtain the calibration curve for each sensor, one QRsens code with the same sensor in the three corners was fabricated for each of the five sensors, thus accounting for the three possible positions of the sensors. In the case of H₂S, NH₃ and CO₂, mixtures of N₂/analyte were obtained by using mass flow controllers and photographs of the three replicas at different gas concentration values were captured using the smartphone. An exposure time of 2 min was enough to reach the equilibrium in the developed sensing membranes. From then on, the analytical signal remained steady

while the concentration of chemical analytes was kept constant. The same procedure was repeated for the temperature and RH sensors, but in this case, the QRsens together with the cubic light box codes and the smartphone were placed inside the climatic chamber. The circular-shaped sensors in QRsens were processed to obtain the averaged colour coordinates in RGB and HSV colour spaces using the custom-developed application, but no use was made of the B/W references in the centre of the code since lighting conditions were controlled and constant in this setup. Range of concentration tested to calibrate the sensors were: RH% from 10 to 90 %; CO₂ from 1 to 60 %; NH₃ from 0 to 50 ppm; H₂S from 0 to 3 ppm and temperature from -10 to 45 °C.

To evaluate QRsens under different illumination conditions, a similar but slightly different calibration setup was employed. In this case, the illumination conditions were varied using as a light source a 10.2-inch LED ring light (ELEGANT EGL-02S) with three colour temperature modes: 3000 K (warm white, e.g., sunrise/sunset), 4000 K (neutral white) and 5000 K (daylight). This LED ring light comes with a tripod stand and phone holder, where the Samsung Galaxy S7 smartphone running the custom-developed Android app was used for the acquisition and processing of the QRsens photographs. As in the previous case, three replicas at different gas concentrations/temperature/RH values were captured and processed using the smartphone application, and the procedure was repeated for each colour temperature provided by the ring light. The circular geometry of the light ring source eliminates the potential problem of shadowing when taking the photographs, which could lead to inconsistencies during the colorimetric processing of the sensors. Additionally, B/W references were also detected and utilised for the detection and acquisition of the sensors' colour for each scenario in this calibration process to achieve the environmental light colour correction, as described in Section 3.4 in the manuscript.

The accuracies of the sensors have been computed considering the propagation of uncertainty (or propagation of error) in a measured value through the corresponding calibration curve to the final value being sought. *Table 4.1* shows the obtained results, which have been calculated using an intermediate point in the range with the steeper slope of each calibration curve as the representative value.

Table 4.1 Propagation of errors in a representative value considering the error of all parameters in the calibration functions. (Coverage factor $k = 1$).

Sensor	Calibration curve point (Target value)	Obtained value with Propagation of Uncertainty ($x \pm \Delta x$)	
		With controlled illumination	After light colour correction
CO ₂	3 %	2.8 ± 0.4 %	3.0 ± 0.7 %
H ₂ S	0.5 ppm	0.41 ± 0.03 ppm	0.46 ± 0.09 ppm
NH ₃	3 ppm	3.4 ± 0.4 ppm	4.4 ± 0.7 ppm
Temp	26 °C	25.0 ± 1.1 °C	26.4 ± 1.5 °C
RH	60 %	60 ± 4 %	60 ± 6 %

2.6 Smartphone application development

A customized smartphone application was developed to simultaneously read the QR code and the colorimetric sensors. The programmed application implements automatic image processing for sensor detection and colour correction, data storage, and results sharing. Android Studio 4.2.2 was the integrated development environment (IDE) used to program the QRsens smartphone application. It was designed and tested against API 26 (Android 8.0). However, the application also supports previous Android versions, being API 18 (Android 4.3) the lowest API level compatible. The open-source computer vision OpenCV 3.1.0 Android library was employed for the acquisition and image processing tasks [347].

2.6.1 Light colour correction

Practical usability of the developed QRsens smartphone application requires it to deliver consistent results independently of illumination changes. In many cases, this issue is mitigated through the attachment of external accessories to the smartphone to achieve controlled illumination conditions, such as opaque chambers to block ambient light, LEDs to provide constant illumination, and optical filters or lenses [348–350]. Software-based approaches have also been proposed to overcome this issue. One straightforward solution is to calibrate the system under different lighting conditions, storing several pre-loaded calibrations and fitting parameters within the application [351,352]. Another

approach consists of using multiple colour reference markers corresponding to the colorimetric responses of the sensors obtained during the calibration phase [298,353,354]. The use of black and white reference markers is also a wider strategy that has yielded satisfactory results [295,355–357]. In some cases, colour space transformation has proven to be an effective method for quantitative colorimetric analysis robust to ambient lighting conditions, for instance using the hue–saturation–value (HSV) space [345]. Other authors have proposed more complex alternative algorithms to account for variations in ambient light [349,358,359]. Taking into account certain limitations depending on the specific case, all these software-based techniques enable the use of equipment-free imaging analysis, which is highly desirable for the end-user convenience.

In our case, we propose a two-step algorithm combining two of the previously described methods: a correction stage in the RGB colour space based on the B/W reference markers (printed in the centre of QRsens), followed by a colour space transformation to the HSV space. In this way, each acquired RGB colour coordinate of the sensors is adjusted with respect to each detected RGB value of the B/W references by:

$$RGB_{corrected} = 256 \cdot \frac{RGB_{sensor} - RGB_{black\ ref}}{RGB_{white\ ref}} \quad (\text{Equation 4.1})$$

where RGB refers to the individual R, G or B colour coordinate of the sensor and reference in each case. The previous equation was applied in all cases except for the H₂S sensor, in which a slightly different correction experimentally delivered better results:

$$RGB_{corrected} = 256 \cdot \frac{RGB_{sensor} - RGB_{black\ ref}}{RGB_{white\ ref} - RGB_{black\ ref}} \quad (\text{Equation 4.2})$$

After the correction, the new RGB coordinates were converted to HSV values. In all cases, the normalised hue parameter ($H_{norm} = H/360$) was selected to quantify the sensor responses, except for the case of CO₂, where the saturation parameter (S) was chosen because it delivered a larger variation range or response (see Section 3.1). More details

regarding the calibration setup and the measurement procedure are given in Section 3.3.

3. Results and discussion

3.1 QRsens application user flow

The accompanying Android application of QRsens consists of several screens that guide the user through the steps required for the acquisition and processing of a QRsens code. The whole process is depicted in the application user flow of *Fig. 4.4a*. Initially, there is a welcome screen that includes a menu with two options: (1) Scan QR code; and (2) Scan sensors. If the user chooses the first option, the application starts a QR reader screen so that the user can aim at the code with the smartphone camera to read its content, which is done in less than a second without needing to take any photograph. Upon detection and reading of the QRsens code, a pop-up window (alert dialog) with two options informs the user about the three sensors present in the device (which is encoded as part of the QRsens content), as well as the rest of the encoded custom information (e.g., an URL). In the fabricated proof-of-concept prototypes, an URL was embedded in the code, so at this point, the user can choose to directly visit that website (option 1 of the alert dialog) or scan the sensors (option 2). If the latter option is chosen, the application automatically starts the rear camera of the device so that the user can take a photograph of the QRsens code. To take the photograph, the developed app invokes through an intent to the free app Camera Zoom FX with the following set-up parameters: ISO 800, EV 0,0, auto focus and WB natural light. In principle, any external app could be called to take the photograph as long as the camera settings always remain constant. After this, the app allows the user to easily pinch to zoom in and out to fit the taken photograph of QRsens with the template grid (a white square superimposed on the screen), as shown in *Fig 4.4c*. Once aligned, the user can slide the *Process* button to the right to start the automatic image processing, which is graphically summarised in *Fig. 4.4b*.

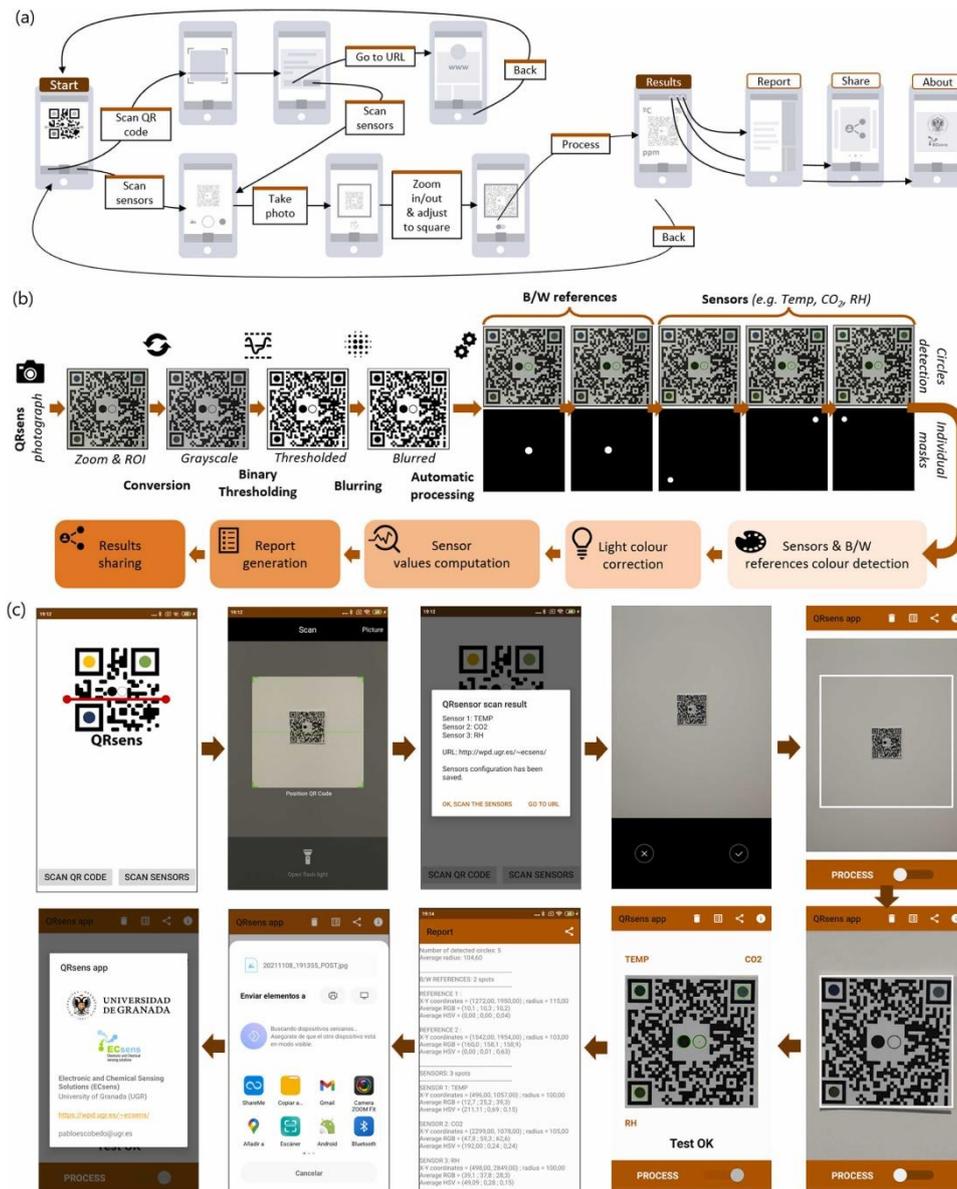


Figure 4.4 (a) Application user flow showing the path that the user follows through the developed smartphone app interface to complete the acquisition of the QRsens device. (b) Flow diagram describing the image processing sequence conducted by the smartphone application. (c) Screen captures of the smartphone application corresponding to different steps of the described user flow.

During the image processing conducted in the smartphone, the app only considers the region of interest (ROI) circumscribed by the white on-screen square, discarding the rest of the image to improve the consistency of the processing and eliminate the needless background. This masked image is then processed on the smartphone by means of the Circle Hough Transform (CHT) to detect the circle-shaped sensors and B/W references. CHT is a feature extraction technique used in digital image processing for detecting circular objects in imperfect digital image inputs, which our group has already employed

in previous works [350]. In a similar way to such work, the image is converted to grayscale prior to the circle's detection using CHT, and also a Gaussian blur filter is applied to reduce the noise and avoid false detections. However, in this work, a significant improvement has been implemented in the processing pipeline, which consists of the application of a thresholding operation on the grayscale image (see *Fig. 4.4b*).

After testing different thresholding methods, we concluded that the simplest technique (i.e., global binary thresholding) was the most suitable for our case. In binary thresholding, each pixel value is compared with a certain threshold value. If the pixel value is greater than the set threshold, that pixel is set to the maximum value (255); otherwise, it is set to 0 (black). Thresholding is a very popular segmentation technique with numerous applications in computer vision, and it is often used to separate objects considered as a foreground from its background (e.g., in text-recognition algorithms). We experimentally checked that this thresholding operation made the subsequent circle's detection algorithm much more reliable. After the binary thresholding and blurring operation, the Hough Transform function of OpenCV library was used to implement the circle detection in the QRsens code photograph. For each of the five circles detected by this algorithm (three corresponding to the sensors in the corners, and two corresponding to the B/W references), an individual mask is applied to eliminate everything from the image but the detected circle. In the creation of each mask, the radius of the circle is reduced by 20% to get away from the detected circle's edge. By doing so, we make sure that the colour of the sensor is detected completely inside the circle in case the edges are blurry. Upon the completion of the image processing, the app is able to provide information related to each detected circle, including its location (X-Y coordinates), size (radius), and average RGB and HSV colours. Based on the location information, the app automatically differentiates among the circles corresponding to the sensors and the B/W references. Subsequently, colour correction is applied using the B/W references to achieve a certain degree of environmental light independence (see Section 3.4). Afterwards, each sensor value is computed from the corresponding calibration curve, as previously described. When all the processing pipeline is finished, the app provides a report in plain text that is stored

in the phone's memory, containing all the collected information about the QRsens code. The results (both image and report) can be shared through email and/or different messaging services through the *Share* button in the top menu of the application.

3.2 Light colour correction

Fig. 4.5 shows some examples of QRsens codes used during the calibration setup (see Section 3.3). In this case, one representative value of each sensor has been selected to show the effect of the light colour temperature correction. It can be observed how the computed values of H_{norm} or S using the acquired RGB coordinates homogenise significantly after applying the light colour correction described in Section 3.4.

To provide a more accurate account of the achieved improvement, *Table 4.2* quantifies this homogenization in terms of maximum standard deviation values (SD_{max}) for each sensor at the three considered light colour temperatures before and after applying the correction. In terms of SD_{max} , the obtained results show a minimum percentage decrease of $\sim 71.4\%$ and a maximum one of $\sim 87\%$, which means a significant improvement and makes it possible to utilise QRsens under different illumination conditions. The chosen colour temperatures cover a wide range of potential real-life application scenarios of QRsens. For instance, warm white (3000 K) is typically used in general living spaces such as residences, hotels, restaurants, fruit and vegetable areas in supermarkets and commercial office spaces [360]. Neutral white (4000 K) is predominant in schools, office settings, hospitals, and shelf areas in supermarkets. Finally, 5000 K is similar to the midday sun, and it is best suited for places where high detail is required or where accurate colour rendering makes a difference on clothing, goods, or food. Some application scenarios would be warehouses, changing rooms, display areas, workshops, factories, manufacturing, and industrial facilities.

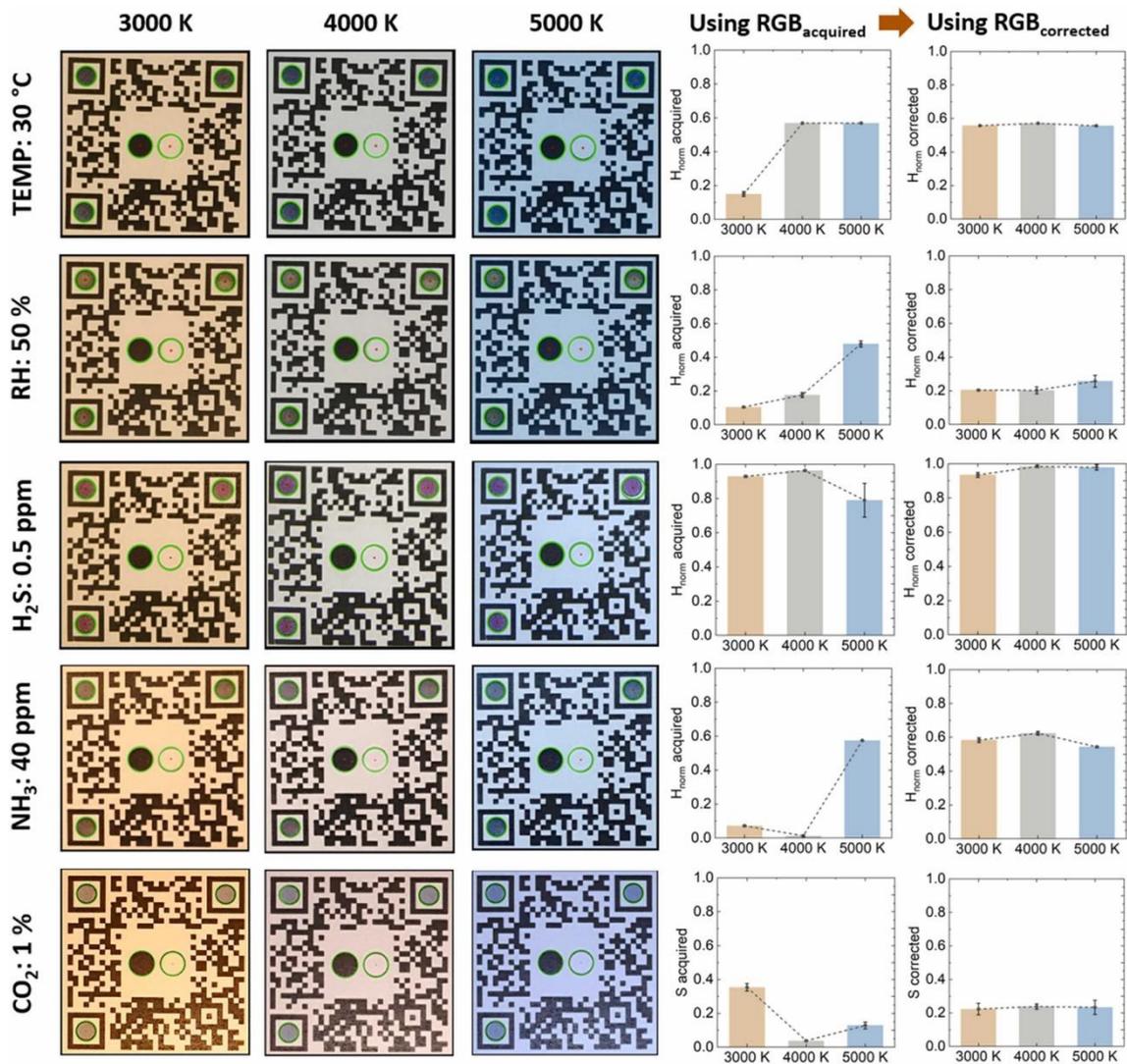


Figure 4.5 Some representative examples of QRsens photographs for each sensor at particular values and different light colour temperatures (3000 K, 4000 K and 5000 K), comparing the acquired H_{norm} parameter (for temperature, RH, H_2S and NH_3 sensors) or S parameter (for the CO_2 sensor) before and after applying the light colour correction.

Table 4.2 Maximum standard deviation values for each sensor at the three considered light colour temperatures before and after applying the correction.

Sensor	SD_{max} before correction	SD_{max} after correction	Percentage decrease (%)
Temperature	0.28	0.04	85.71
RH	0.21	0.06	71.43
H_2S	0.24	0.06	75.00
NH_3	0.32	0.08	75.00
CO_2	0.23	0.03	86.96

3.3 QRsens calibration and performance

Fig. 4.6 shows the performance curves obtained for the different sensors in QRsens, both under controlled illumination and after illumination correction. The exposure time for the tests was 2 min, time enough to prepare the standard analyte/nitrogen mixture and to reach the equilibrium (see Section 3.3).

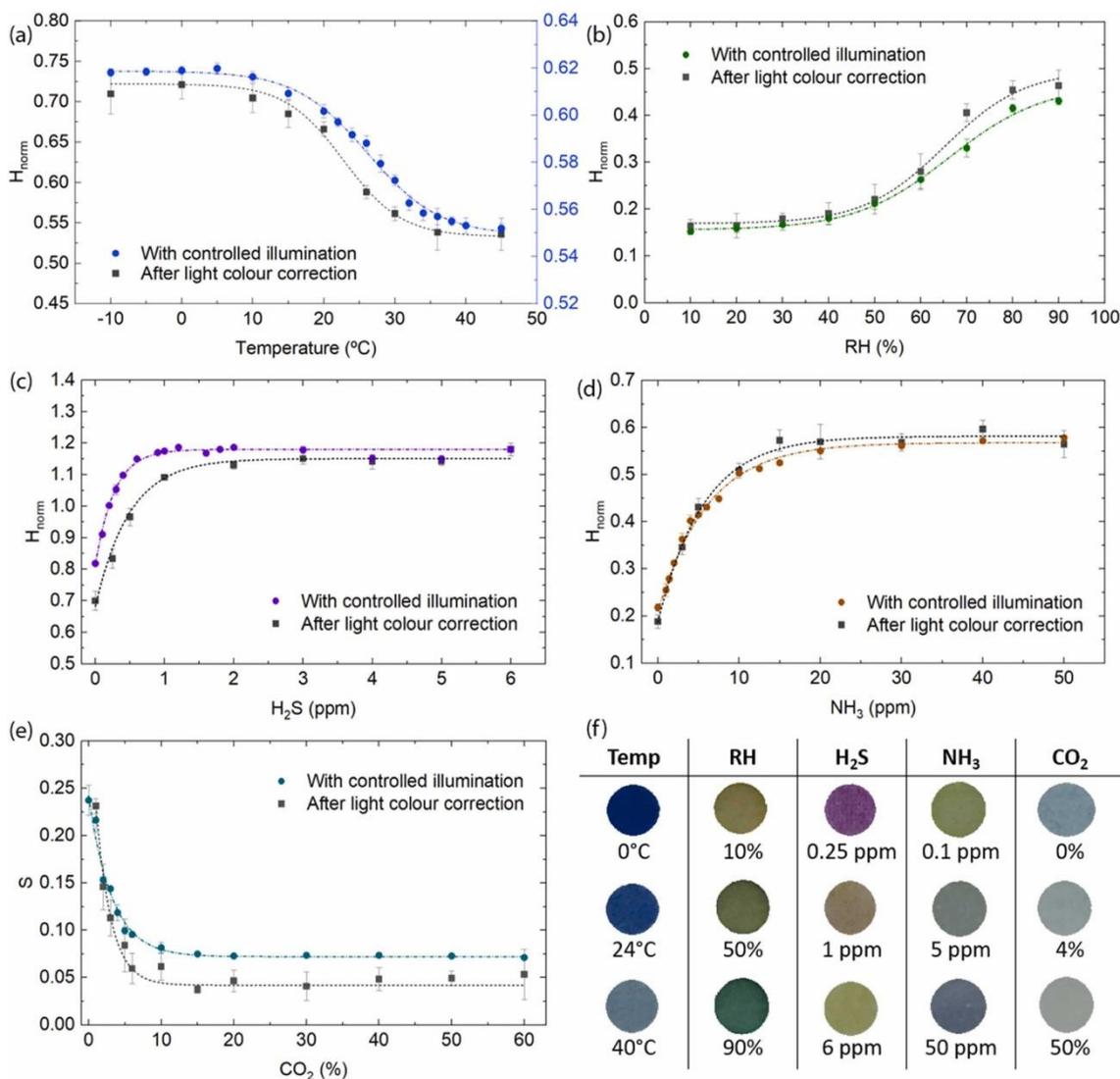


Figure 4.6 Calibration curves of each sensor, both with controlled illumination and after illumination correction. The response of the (a) temperature, (b) RH, (c) H_2S and (d) NH_3 are quantified by means of the normalised Hue parameter (H_{norm}), while the response of (e) CO_2 is quantified using the saturation (S) parameter. Fitting functions for each calibration curve and analytical parameters for each sensor are given in Table 4.2. Note that in the case of H_2S , from 1 ppm onwards it is necessary to add 1 unit to H_{norm} to avoid the discontinuity. (f) Some examples of colour changes of different colorimetric sensors at several gas concentration/temperature/RH values.

Typical fitting functions for this type of colorimetric sensors (i.e., Boltzmann sigmoidal and exponential functions) have been checked for each case, as shown in *Fig. 4.6*. Main analytical parameters of each sensor are shown in *Tables 4.3 to 4.7*. The limits of detection (LODs) were obtained as $3 s_b$ in case of exponential calibration function. When a sigmoidal shape response was obtained it was calculated by the tangent method as well as the upper limits [361]. The repeatability was quantified through the coefficient of variation (CV) of the signal, which is defined as the ratio between the standard deviation of a set of replicas and its mean value. An intermediate value in the range with the steeper slope was selected as representative for the CV calculation. The accuracies of the sensors considering the propagation of uncertainty (or propagation of error) of all parameters in the calibration functions have been also computed. *Table 4.2* shows the obtained results, which have been calculated using an intermediate point in the range with the steeper slope of each calibration curve as the representative value.

Table 4.3 Calibration functions and analytical parameters of the RH sensor with controlled illumination and after light colour correction.

RH sensor		
Boltzmann function: $y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x - A_3}{A_4}}} + A_2$		
Parameter	With controlled illumination	After light colour correction
A₁	0.156 ± 0.006	0.169 ± 0.005
A₂	0.466 ± 0.019	0.497 ± 0.03
A₃	66.3 ± 1.7	65 ± 3
A₄	10.3 ± 1.4	8.8 ± 1.6
R²	0.9962	0.99521
LOD	44.6%	46.7%
CV(%)	7.1 (at 60%)	13.7 (at 60%)
Detection range	44.6–85.7%	46.7–80.1%

Table 4.4 Calibration functions and analytical parameters of the temperature sensor with controlled illumination and after light colour correction.

Temperature sensor		
Boltzmann function: $y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x - A_3}{A_4}}} + A_2$		
Parameter	With controlled illumination	After light colour correction
A₁	0.6187 ± 0.0006	0.722 ± 0.006
A₂	0.5490 ± 0.0015	0.533 ± 0.008
A₃	26.2 ± 0.4	22.8 ± 0.9
A₄	5.1 ± 0.3	4.1 ± 0.7
R²	0.99733	0.99102
LOD	14.9°C	13.4°C
CV(%)	0.56 (at 26°C)	1.38 (at 26°C)
Detection range	14.9–35.8°C	13.4–32.3°C

Table 4.5 Calibration functions and analytical parameters of the NH₃ sensor with controlled illumination and after light colour correction.

NH ₃ sensor		
One-phase exponential growth function: $y = A_1 e^{\frac{x}{A_3}} + A_2$		
Parameter	With controlled illumination	After light colour correction
A₁	-0.358 ± 0.006	-0.394 ± 0.011
A₂	0.568 ± 0.003	0.582 ± 0.007
A₃	-6.13 ± 0.22	-8.6 ± 0.4
R²	0.99494	0.99516
LOD	0.6 ppm	0.7 ppm
CV(%)	3.4 (at 3 ppm)	4.6 (at 3 ppm)
Detection range	0.6–7.7 ppm	0.7–7.5 ppm

Table 4.6 Calibration functions and analytical parameters of the H₂S sensor with controlled illumination and after light colour correction.

H₂S sensor		
One-phase exponential growth function:		
$y = A_1 e^{\frac{x}{A_3}} + A_2$		
Parameter	<i>With controlled illumination</i>	<i>After light colour correction</i>
A₁	-0.37 ± 0.01	-0.47 ± 0.03
A₂	1.1802 ± 0.0023	1.151 ± 0.007
A₃	-0.273 ± 0.019	-0.49 ± 0.04
R²	0.98934	0.98213
LOD	0.01 ppm	0.13 ppm
CV(%)	1.1 (at 0.5 ppm)	2.8 (at 0.5 ppm)
Detection range	0.01–0.6 ppm	0.13–0.7 ppm

Table 4.7 Calibration functions and analytical parameters of the CO₂ sensor with controlled illumination and after light colour correction.

CO₂ sensor		
One-phase exponential decay function:		
$y = A_1 e^{\frac{-x}{A_3}} + A_2$		
Parameter	<i>With controlled illumination</i>	<i>After light colour correction</i>
A₁	0.170 ± 0.014	0.304 ± 0.024
A₂	0.0723 ± 0.0007	0.042 ± 0.002
A₃	3.2 ± 0.3	2.1 ± 0.3
R²	0.98702	0.99098
LOD	0.7%	0.7%
CV(%)	1.2 (at 3%)	16.7 (at 3%)
Detection range	0.7–5.2%	0.7–4.1%

Regarding the calibration results shown in *Fig. 4.6*, it is worth noting that the error bars of the curves corresponding to the sensors after light colour correction are calculated as the standard deviations of the corrected parameters (either H_{norm} or S) obtained after the corrections for the three colour temperatures. This is the reason why these error bars are significantly larger than the error bars for the cases where no light colour correction is conducted. Apart from this, it can also be observed in *Tables 4.3 to 4.7* that the performance of QRsens codes is better for the cases where illumination conditions are controlled, in terms of lower LODs and CVs and wider ranges, as would be expected.

However, in practice, illumination colour correction will be required in most cases. As shown in *Tables 4.3 to 4.7*, after light colour correction the colorimetric gas sensors exhibit a detection range of 0.7–4.1%, 0.7–7.5 ppm, and 0.13–0.7 ppm for CO_2 , NH_3 and H_2S , respectively. In the case of temperature and RH, the detection ranges are 13.4–32.3°C and 46.7–80.1%, respectively. The temperature detection range could be extended by using another commercial thermochromic ink different to the one used that exhibits an alternative detectable temperature window. On the other hand, we can observe in the case of light colour correction in *Fig. 4.6a,b,e* higher slopes in the non-saturation region, which means an increase of sensitivity of temperature, RH and CO_2 sensors. These slope increases resulted in decreased ranges due to the constancy of the difference of the saturation values. Therefore, the potential application scenario of QRsens will determine all these analytical parameters as well as the expected accuracy of the system. For instance, if QRsens is applied in a place where lightning conditions remain unchanged and controlled (e.g., display cabinet, supermarket, office, etc.), it will allow lower LODs and larger ranges with better repeatability and accuracy. Otherwise, if illumination conditions dynamically change and cannot be controlled, QRsens will still be usable, thanks to the implemented automatic light colour correction, although with a slightly lower performance. In some cases, the obtained dynamic ranges of the colorimetric sensors (*Tables 4.3 to 4.7*) will also influence the potential application scenarios of QRsens. The most restrictive case is obtained for the CO_2 sensor, which could be used in QRsens as a threshold detector to generate an alarm rather than a quantitative indicator. For instance, for smart packaging applications QRsens could inform of a leakage in the package, since CO_2 is typically flushed into the package to

obtain concentrations above 60%. For enclosed space monitoring, QRsens could serve as a threshold alarm if CO₂ largely exceeds the health safety limits.

3.4 Cross-sensitivity study

To study the cross-sensitivity among the sensors, the maximum variation of the output signal of the sensors in the presence of the rest of the gases was obtained for a fixed concentration of the target gas. The influence of the temperature was also quantified as the variation of the output signal to an increment of 25 °C. The obtained results are shown in *Table 4.8*.

Table 4.8 Cross-sensitivities between the sensors of QRsens.

Selective sensor	Interferent	Signal variation (%)
CO₂ (0%)	NH ₃ (100 ppm)	2.1
	H ₂ S (100 ppm)	0.3
	RH (90%)	0.1
	T (25°C)	2.6
NH₃ (0%)	CO ₂ (100%)	2.9
	H ₂ S (100 ppm)	0.1
	RH (90%)	1.7
	T (25°C)	1.8
H₂S (0%)	NH ₃ (100 ppm)	0.1
	CO ₂ (100%)	0.1
	RH (90%)	0.9
	T (25°C)	2.1
RH (35%)	CO ₂ (100%)	0.7
	H ₂ S (100 ppm)	2.8
	NH ₃ (100 ppm)	21.1
	T (25°C)	2.3

Data measured for this work and those taken from the literature have shown that, in a practical case, the cross-sensitivity can be neglected [336,346]. It can be observed that the interference produced by the gases in response to the other gases sensors is below 3%, presenting the maximum deviation when the interfering gas is present in a very high concentration, which is not a realistic case. This implies that in a practical case the cross-sensitivity can be neglected. There is only one exception to this fact: the influence of NH_3 on the response of the humidity sensor, with a maximum variation above 21%. Therefore, in the case of NH_3 in high concentrations, humidity sensor output should be corrected. In the light of this finding, the dependence of RH with NH_3 was experimentally characterised at the given point of RH = 35% and a linear relationship between both variables was found, as shown in *Fig. 4.7*.

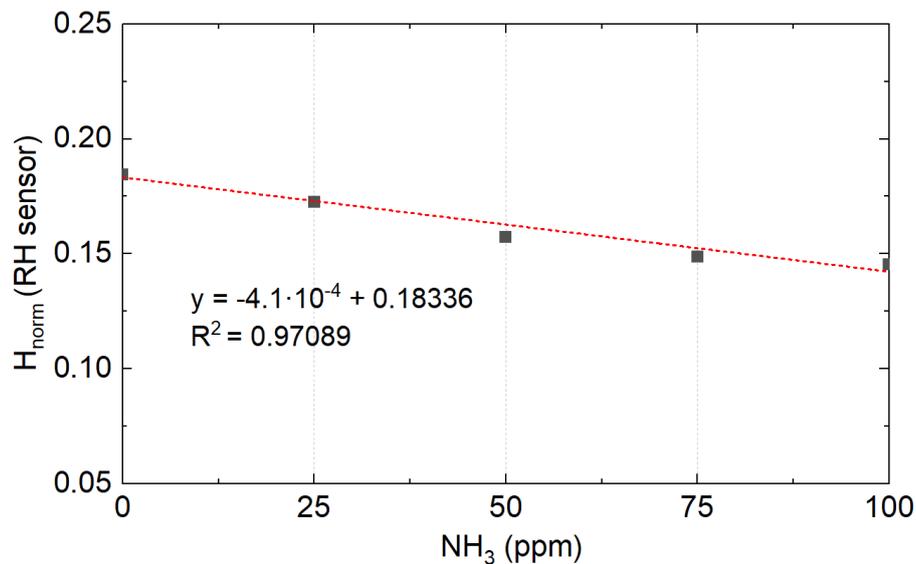


Figure 4.7 Dependence of the output signal of RH sensor with the increase of NH_3

Therefore, in potential applications where presence of NH_3 in high concentrations is expected, the RH sensor output should be corrected based on such a linear relationship.

3.5 Literature review

It is worth mentioning that in the same context as QRsens, several interesting developments of QR-like codes with colorimetric sensing can be found in the literature, which have been compiled and summarised in *Table 4.9*. In comparison with other

approaches, our solution proposes five different sensors (that can be combined into groups of three sensors), which have never been simultaneously combined in previous solutions, thus opening new potential applications

Table 4.9 Examples of QR-like codes with colorimetric sensors found in the literature.

Sensor (s)	Substrate	Fabrication technology	Light colour correction?	QR valid for data storage?	Smartphone app developed?	Ref
Temperature	Plastic (acetate)	Non-standard	No	Yes	Yes	[362]
12 chemoresponsive dyes for olive oil odour id.	Paper	Wax printing	No	No	No	[363]
NH ₃	Plastic (acetate/polyester)	Inkjet and screen printing	Yes	No	No	[364]
NH ₃ , CH ₂ O and H ₂ S	Paper/plastic	Screen printing	Yes	No	No	[365]
Enzyme-linked antibodies	Paper	LIFT	No	No	No	[366]
Cu ²⁺ (semiquantitative)	Paper	Solid ink and inkjet printing	Yes	Yes	No	[367]
Escherichia coli	Paper	Wax printing Deposition	No	Yes	No	[368]
Temperature	Paper	Inkjet printing	No	Yes	No	[369]
RH	Photonic crystal film	Spin coating	No	Yes	No	[370]
Protein	Paper	Wax printing	No	Yes	No	[371]
pH	Paper	Inkjet printing	No	Yes	No	[372]
Histidine-rich protein II (malarial biomarker)	Nitrocellulose membrane	Non-standard	Yes	Yes	Yes	[373]
Cholesterol	Paper	Wax printing	No	Yes	No	[374]
Cu ²⁺ for water and food	Paper	Non-standard	No		Yes	[375]
Temperature, RH, CO ₂ , NH ₃ and H ₂ S	Paper	Screen printing	Yes	Yes	Yes	This work

4. Conclusions

To sum up, a fully functional QR code has been enhanced with built-in multi-sensing functionality (QRsens) for *in situ* environment analysis. Our system distinguishes from state-of-the-art solutions by combining the following aspects simultaneously: Firstly, QRsens codes are still valid for their original purpose as information storage devices, being the sensing functionality an add-on feature that does not undermine the usefulness of the original QR code. Secondly, to provide fast and quantitative readings, a user-friendly smartphone application was programmed for image processing, data storage, and/or sharing. Thirdly, a light colour correction solution is seamlessly integrated into the code to make the system viable under different lighting conditions. Lastly, the use of a standard fabrication technique (screen-printing) and flexible substrate (paper) opens up the possibility to produce QRsens codes by establishing high-volume manufacturing methods such as roll-to-roll printing.

Acknowledgements

This study was funded by Spanish MCIN/AEI/10.13039/501100011033/ (Projects PID2019–103938RB-I00, ECQ2018–004937-P and grant IJC2020–043307-I) and Junta de Andalucía (Projects B-FQM-243-UGR18, P18-RT-2961). The projects and the grant were partially supported by European Regional Development Funds (ERDF) and by European Union NextGenerationEU/PRTR.

FIGURE INDEX

<u>Figure 4.1 Graphical abstract.</u>	262
<u>Figure 4.2 System overview and concept of QRsens, which consists of a QR code with integrated colorimetric sensors in combination with a custom-developed smartphone application for the acquisition and automatic processing of QRsens. Two different end-use applications are proposed by combining three of the five custom-developed sensors: enclosed spaces monitoring (temperature, RH, and CO₂) and smart packaging sensing (H₂S, NH₃, and CO₂).</u>	264
<u>Figure 4.3 (a) Design process from a standard original QR code to a QRsens code. (b) Fabrication steps of the QRsens code by screen printing and drop-casting. The final result photograph corresponds to the combination of temperature, RH and CO₂ sensors.</u> .	270
<u>Figure 4.4 (a) Application user flow showing the path that the user follows through the developed</u>	275
<u>Figure 4.5 Some representative examples of QRsens photographs for each sensor at particular values and different light colour temperatures (3000 K, 4000 K and 5000 K), comparing the acquired H_{norm} parameter (for temperature, RH, H₂S and NH₃ sensors) or S parameter (for the CO₂ sensor) before and after applying the light colour correction.</u>	278
<u>Figure 4.6 Calibration curves of each sensor, both with controlled illumination and after illumination correction. The response of the (a) temperature, (b) RH, (c) H₂S and (d) NH₃ are quantified by means of the normalised Hue parameter (H_{norm}), while the response of (e) CO₂ is quantified using the saturation (S) parameter. Fitting functions for each calibration curve and analytical parameters for each sensor are given in Table 4.2. Note that in the case of H₂S, from 1 ppm onwards it is necessary to add 1 unit to H_{norm} to avoid the discontinuity. (f) Some examples of colour changes of different colorimetric sensors at several gas concentration/temperature/RH values.</u>	279
<u>Figure 4.7 Dependence of the output signal of RH sensor with the increase of NH₃.</u> ..	285

TABLE INDEX

[Table 4.1](#) Propagation of errors in a representative value considering the error of all parameters in the calibration functions. (Coverage factor $k = 1$). 272

[Table 4.2](#) Maximum standard deviation values for each sensor at the three considered light colour temperatures before and after applying the correction. 278

[Table 4.3](#) Calibration functions and analytical parameters of the RH sensor with controlled illumination and after light colour correction. 280

[Table 4.4](#) Calibration functions and analytical parameters of the temperature sensor with controlled illumination and after light colour correction. 281

[Table 4.5](#) Calibration functions and analytical parameters of the NH₃ sensor with controlled illumination and after light colour correction. 281

[Table 4.6](#) Calibration functions and analytical parameters of the H₂S sensor with controlled illumination and after light colour correction. 282

[Table 4.7](#) Calibration functions and analytical parameters of the CO₂ sensor with controlled illumination and after light colour correction. 282

[Table 4.8](#) Cross-sensitivities between the sensors of QRsens. 284

[Table 4.9](#) Examples of QR-like codes with colorimetric sensors found in the literature. 285

CAPÍTULO 5

NIPAM SMART POLYMERS AS REAGENTS REPOSITORIES AND FLOW BARRIERS/DELAYERS

CAPÍTULO 5: NIPAM SMART POLYMERS AS REAGENTS REPOSITORIES AND FLOW BARRIERS/DELAYERS

Planteamiento

En las últimas décadas los sistemas microfluídicos han evolucionado no solo hacia el cumplimiento de las directrices REASSURED, que aseguran su funcionalidad como sensores, sino también hacia una mayor sostenibilidad empleando soportes como el papel, el hilo o la tela, si bien aún quedan aspectos que son mejorables, como son los análisis más complejos que pueden requerir de sistemas de mezclado de reactivos, de bombeo, control de flujo, liberación de reactivos a diferentes tiempos o el bloqueo de ciertos canales, entre otros, y para los que se busca no sacrificar la portabilidad y la facilidad de uso del sensor.

Las estrategias de control de flujo basadas en acciones físicas hasta ahora han sido más estudiadas que las químicas, que se han visto más limitadas. Sin embargo, el auge de los materiales inteligentes, capaces de responder a estímulos como el pH, la temperatura, la presión, los campos eléctricos o magnéticos, la concentración de ciertos compuestos químicos e, incluso, pares de estos estímulos, es una gran oportunidad para su uso en el control de flujo y liberación de reactivos en sistemas microfluídicos.

Es el caso de los materiales que responden a la temperatura, que tienen la ventaja de ser fácilmente accionados mediante calentadores miniaturizados, y en particular, el de los polímeros de NIPAM, que sufren un cambio de volumen considerable cuando sobrepasan una temperatura en torno a los 32°C (dependiendo de los comonomeros que se introduzcan en su estructura). Los polímeros de NIPAM podrían ser especialmente adecuados para su uso en dispositivos Point-of-Care ya que esta temperatura se encuentra cercana a la temperatura fisiológica de los seres humanos.

Es por ello que en este capítulo se han caracterizado hidrogeles de NIPAM para su uso como repositorios de reactivos y se han ensayado ionogeles de NIPAM fotopolimerizados como posibles barreras o ralentizadores del avance del flujo.

Objetivo

El objetivo de este estudio es encontrar y caracterizar polímeros inteligentes que puedan ser incluidos en sensores microfluídicos como sistemas de control de flujo o de liberación de reactivos fácilmente automatizables.

Para ello se ha recurrido a polímeros de NIPAM como los hidrogeles, que pueden ser accionados liberando disoluciones acuosas a temperaturas cercanas a la temperatura fisiológica de los seres humanos, o los ionogeles, que pueden actuar como barreras o ralentizadores del avance del flujo en μ PADs.

Los primeros se han caracterizado como repositorios, prestando especial atención a las cinéticas de absorción y desorción, puesto que los tiempos de análisis de un sensor deben ser los mínimos posibles. También se han tenido en cuenta cómo se ven afectados por el pH en vista de que puedan usarse en muchos casos para liberar disoluciones tamponadas y la posibilidad de que retengan disolventes orgánicos de polaridad intermedia y alta volatilidad. Para la caracterización se ha recurrido a diferencias de pesada.

Los segundos se han integrado por deposición de la mezcla pre-polimerizada y curado con radiación UV con la intención de que actúen ralentizando el flujo o deteniéndolo en función del volumen empleado. Para comprobar su funcionamiento se han grabado vídeos y comparado los tiempos que tarda el fluido en recorrer áreas iguales con y sin la presencia de los ionogeles.

El trabajo llevado a cabo puede dividirse en las siguientes etapas:

- Síntesis de los hidrogeles de NIPAM
- Caracterización de las cinéticas de absorción/desorción y de la capacidad de almacenamiento de reactivos de los hidrogeles
 - Análisis del efecto en la absorción de variaciones de pH, temperatura o tipo de disolvente
- Síntesis de los ionogeles de NIPAM
- Caracterización de la ralentización del flujo con ionogeles
- Primeras pruebas de dirección de flujo en μ PADs usando ionogeles

Abstract

In the last decades, microfluidic systems have evolved to approximate to the ideal ASSURED guidelines with great success. However, further investigation into flow control systems is needed to assist analysis in which mixers, valves, repositories or pumps are required. Physical strategies have already been investigated for this issue, but there is still room for finding new chemical strategies.

In recent years, smart materials have been placed into the spotlight due to their capacity to mimic nature responses to certain stimulus such as pH, radiation, heat, pressure, magnetic or electric fields by changing in volume, conformation or solubility. In particular, thermoresponsive smart materials have an enormous potential in the field of flow control in microfluidics sensors as their actuation can be easily automated with a miniaturized heater.

For this reason, in this chapter, we present NIPAM based ionogels and hydrogels as repositories and flow delayers or barriers. Two types of NIPAM hydrogel were synthesized. Both polymerizations were very similar, chemically initiated with ammonium persulfate, but in the second case AAm was also used as copolymer and after the polymerization the hydrogel was immersed in a 30% LiCl solution to introduce ions in the structure and thus prevent dehydration. The swelling/deswelling, pH-effect, evaporation at room conditions and behaviour in different solvents and below the LCST, were evaluated by weight loss.

On the other hand, ionogels were photopolymerized to be incorporated into different μ PAD designs and the delay in the flow front was observed by video recording comparing with μ PADs of the same dimensions without ionogel.

Keywords

NIPAM, flow control, repository, hydrogel, ionogel, analytical devices

1. Introduction

Porous membranes are capable of transporting fluids thanks to capillarity, which is the basis of microfluidic devices based on porous media such as paper, thread, or cloth. However, passive liquid flow is not enough to address new analytical requirements such as pumping, mixing, valves and flow control in general [376].

Some flow control strategies already have been studied. Fluid flow can be delayed manipulating the geometry [377,378], porosity of the material [379], fluid viscosity [380] and contact angle [381]. UV treatments and serigraphy can modify channel wettability have also been studied as an alternative for flow control [382,383].

The main type of flow control until now is mechanically actuated valves in which two paper channels are in contact, or not, in response to a physical stimulus [83] being the three-position valves proposed by Fratzl et al. [384] or the drawbridge magnetic valves design by Li et al. [385] examples of this. Nevertheless, for chemical flow delay there is room for further investigation of the potential use of smart polymer to respond to stimuli in predictable and controllable ways, mimicking the Mother Nature fashion [386,387].

In the last two decades, several stimuli-responsive materials, also known as “smart” materials, have been developed and have attracted an outstanding attention due to their physicochemical properties and structural conformations in response to the environment [388–396].

Responsive polymers undergo changes in conformation, volume or solubility in response to external triggers such as pH [397], radiation [398], temperature [399], ionic concentration [400], mechanical forces, magnetic/electric fields [401] or the chemical compounds. This gives them application in areas such as sensors [402], medicine [403], pharmacology [404], catalysis [405] or environmental remediation [406].

Of all the responsive polymers to date, the thermoresponsive polymers are the most extensively used. They can be categorized as having an upper critical solution temperature (UCST) or a lower critical solution temperature (LCST) depending on how their solubility change with temperature. The LCST-type are swollen in aqueous solution when the temperature is lower than the LCST but when this temperature is exceeded,

they collapse, releasing the aqueous solution that was embedded in their structure. NIPAM is an example of LCST-type thermoresponsive polymer and undergoes a coil-to-globule transition when heated above 32°C, which is especially convenient because it is close to physiological temperature.

Smart polymers usually are synthesized via polymerization of unsaturated acryl/vinyl-modified responsive moieties. Controlled free radical polymerization typically leads to polymers with preserved chain end functional groups and homogeneous predictable molecular weights so smart polymers can be designed with several different morphologies. One of these cases are the three-dimensional responsive polymer networks called gels [407].

A substance is described as a gel when there is a liquid phase dispersed in a continuous solid phase [408,409]. Gels are often difficult to classify because a gel can be soft, solid or liquid-like. In order to qualify as a gel, the material must be crafted from two or more components, one of which is a liquid, present in a considerable quantity [410,411].

The term gel is used ubiquitously in daily life to describe a material with behaviour lying somewhere between that of a solid and a liquid, and this rather general description has led to considerable confusion as to what comprises a gel state [412]. Some fundamental criteria to be met before a material can be considered a gel are:

- To be heterogeneous with two or more components, at least one liquid and one solid
- Having solid-like properties
- The presence of a 3D network

A gel therefore can be recognised as a two-phase heterogeneous mixture of a solid and a liquid which through self-assembly/bond formation (physical or chemical) is organised into a liquid dispersed phase and a solid continuous phase [413].

Gels classification can be done regarding several aspects such as nature of the interactions (physical and chemical), rheology, nature of the solid and the liquid, process of gel formation, etc. Depending in the nature of the liquid gels can be divided into oleogels, hydrogels, ionogels, organogels or alcogels [414].

As stated in the first chapter of this Thesis, hydrogels are tridimensional polymeric networks with hydrophilic properties [415]. For a material to be considered a hydrogel the 10% or more of its total volume or weight must be water and this is the main reason for hydrogel to possess a high degree of flexibility, behaving in a similar way to natural tissues [416].

Hydrogels exhibit significant volume changes or sol-gel phase transitions in response to certain physical or chemical stimuli. Physical stimuli include magnetic or electric fields, radiation, pressure, temperature, etc. while examples of chemical changes include variations in pH or concentration of ions or other chemical species in the solution [417].

In most cases, the magnitude of the response is directly proportional to the magnitude of the external stimulus applied, and the changes are reversible conformational transitions, so hydrogels can return to their initial state once the source or stimulus that caused the change is removed [99].

Hydrogels can be classified depending on several aspects such as: charge of side functional groups, crosslinking, network structure, monomers source and methods of synthesis as stated in the introduction of this Thesis.

Although hydrogels have been employed in many fields, they also have drawbacks such as easily drying out. An alternative to hydrogels are ionogels [418]. Ionogels' (or ionic gels) dispersed liquid phase is composed of ionic liquids (ILs) which are organic salts with low melting points (under 100°C) [419]. This implies, as their name indicate, that they are liquids at room temperature and they don't pack neatly together in a crystalline structure as most ionic salts, instead, ions are free to move and flow. That stated, ionic liquids can be imagined as a sea of charges with a strong association with each other, but incapable of organising into a highly regular structure [420]. In addition, as they consist of only ions, their properties are very different from those of molecular liquids. It is worth underlining that the intrinsic hybrid character of ionogels relies on the intimate combination of an IL and a solid-like network and in fact, the properties of ionogels are expected to derive both from those of the IL and those of the component forming the solid-like network [421]. Their physicochemical properties can be tuned as wished just by selecting the appropriate anion-cation pair [422].

The most common families of cations in ILs are imidazolium, pyridinium, piperidinium, pyrrolidinium and ammonium. Other than the ILs based on charged nitrogen, phosphonium and sulphonium are also common [423]. Similarly, some common anions are halides, NO_3^- , BF_4^- , PF_6^- , HSO_4^- (inorganic) DCA-, carboxylates, sulphates, sulphonates, phosphates, phosphonates as well as fluorinated ones.

Ionogels can be classified attending to formation methods as chemically or physically crosslinked networks. Physically crosslinks consist of non-covalent interactions. Van der Waals, ionic, host-guest interactions or hydrogen bonding are some examples of this. On the other hand, chemical cross-links are formed of covalent bonds by polymerizations or chemical reactions [418].

In the ionogel, the ionic liquid must be tightly embedded in the matrix structure to prevent IL loss. The use of polymers as ionogel gelling agents is ideal as they can effectively encapsulate the IL [424,425]. Also, direct mixing of the polymer with the IL is a very simple method to prepare ionogels. However, there are some difficulties regarding the miscibility of common polymers and ILs, which result in ionogels with low IL content [426].

To overcome this, monomers are gelled directly in the presence of the IL. Thermal, photo, free radical and ring opening are some efficient techniques to polymerize an ionogel with a high content of IL inside the polymer network [427,428]. In particular, photopolymerization has sparked considerable interest due to the several advantages it offers. It has low reaction times, does not release solvent vapours, requires low energy input, has low costs, occurs at room temperature and for sensors it is very versatile [429].

In this chapter we have synthesized and experimented with ionogels and hydrogels based on the thermoresponsive monomer NIPAM as repositories, flow barriers or flow delayers for microfluidic systems.

2. Materials and methods

2.1 Reagents, materials and instrumentation

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Spain) and are analytical-reagent grade unless otherwise indicated. For the synthesis of hydrogels, N-isopropylacrylamide, N,N'-methylenebis(acrylamide), Dextran, TEMED and a solution of APS 65 mM freshly prepared every day are required. The mixture of reagents is placed between the glass and short plate of the Mini-PROTEAN BIO-RAD shown in *Fig 5.1* for polymerization and the thickness of the sheets are controlled selecting glasses with spacers of 0.75, 1.0 or 1.5 mm. For the non-drying repository, AAm was added to the mixture as co-monomer and after the synthesis a solution of LiCl 30 wt.% was employed to introduce the ions in the hydrogel.



Figure 5.1 BIO-RAD casting cells and glass and short plates for shaping hydrogel into sheets.

In the case of ionogels, ionic liquids such as PDCA and EMIES were employed as solvent instead of Milli-Q water and instead of using ammonium sulfate (APS) as chemical initiator of the polymerization, DMPA was added to the mixture as photoinitiator. To initiate the photopolymerization a UV lamp model VL-6.LC from Vilber Lourmat (France) was placed at 7 cm from the piece of paper in which the ionogel pre polymerized mixture was casted and 254 nm wavelength was selected to irradiate for 10 minutes.

Phase transition of the NIPAM was achieved using the following laboratory instrumentation: A heater with a 22 Ω resistance and 0.5 x 0.5 cm dimensions fabricated on a printed circuit board and an 81/2-bit Digital Multimeter from Agilent Technologies

(USA). Differences in weight between swollen and dry hydrogel were carried out with an analytical balance DV215CD from Ohaus (EE.UU.) with precision of 0.1 mg.

Characterization of the hydrogel behaviour at pHs ranged from 5.0 to 10.0 was performed using KH_2PO_4 and K_2HPO_4 buffer solutions which were validated with a micro pH 2000 pH-meter (Crimson, Spain).

Whatman grade 1 paper with 180 μm thickness and ashes percentage lower than 0.06% from Whatman (United Kingdom) was laser cut with a Rayjet 50 laser printer (Austria) to shape the μCAD . The ashes from the paper cuts were withdrawn with a 1:1 solution of ethanol:water and for the characterization of the μPAD solutions of Bright Blue, Congo Red and Lemon Yellow dyes were prepared. Homogenization of the solutions were carried out with a BOE 8062000 vortex (Boeco, Germany) and an H-D ultrasounds bath (JP Selecta, Spain).

A superabsorbent material, Flexicel, was cut into 4 mm diameter disks with a perforator (KNIPEX, Germany) to act as passive pump in the μPADs .

A portable light box with 24 x 22 x 23 cm dimensions and 20 white LEDs from PULUZ (China) was used to fix illumination conditions. Videos were recorded with a Sony DSC-HX300 digital camera (Japan) with 50x optical zoom and CMOS sensor Exmor R[®] placed at a fixed position thanks to a camera tripod.

Finally, easy interface free software Avidemux was used for videos analysis.

2.2 Synthesis of the NIPAM repository

A NIPAM layer of 8 x 8 cm was synthesized via free-radical polymerization in aqueous solution in presence of BIS as a cross-linking agent following the procedure described by Samara et al [75]. 640 mg of N-isopropylacrylamide, 16 mg of N,N'-methylenebis(acrylamide) and 80 mg of Dextran were weighted and dissolved in 4 mL of Milli-Q water. Later, 48 μL of TEMED and 200 μL of an APS solution 65 mM were added. The mixture was vigorously stirred (2000 rpm) and poured into a Bio-Rad mold with 0.75 mm spacers. The polymerization was carried out for 60 min at room temperature. The layer was then kept in a vessel with water.

2.3 Synthesis of the LiCl NIPAM repository

Evaporation phenomena in NIPAM repositories are inevitable at high temperatures or even at room temperature due to the relatively large volumes of water contained in the hydrogels. This fact limits the applicability of the hydrogels since they cannot be kept filled with aqueous solutions for more than a few hours. Interestingly, a salt with high solvating power such as LiCl can be incorporated into the hydrogel to reduce the evaporation rate.

For the synthesis of the non-drying NIPAM repository, 320 mg of the AAm monomer and 8 mg of the copolymer, BIS, were weighed into a vial. The vial is kept in an ice bath while 24 μL of TEMED and 100 μL of APS are added. The mixture is shaken vigorously and poured into Bio-Rad glasses with 0.75 mm spacers to polymerize at room temperature for the next 24 h. The hydrogel thus obtained is immersed in the water for 24 h. The mixture is then added to the vial. The hydrogel thus obtained is immersed for 24 h in a 30 wt.% aqueous LiCl solution.

2.4 Preparation of the NIPAM ionogels

The ionogels synthesized to act as barriers or delayers consist of two monomeric units: NIPAM) and N,N'-methylenebisacrylamide (BIS) and DMPA as photoinitiator following the procedure developed by Benito-López et al. [430]. A pre-polymerization mixture solution was prepared dissolving the BIS (14.5 mg), NIPAM (456 mg) and DMPA (16.3 mg) in 1 mL of EMIES or alternatively, in the same volume of PDCA, and stirred for 30 min at 80°C at dark. These mixtures were kept in the refrigerator until use.

To include the NIPAM ionogels in the μPAD it was necessary to place known volumes of the mixture in the areas in which the deceleration of the flow is required and, immediately after, apply a UV radiation of 365 nm for 10 minutes at 7cm distance. During this process, the colourless liquids turn into a yellow solid showing the polymerization of the ionogel has been achieved.

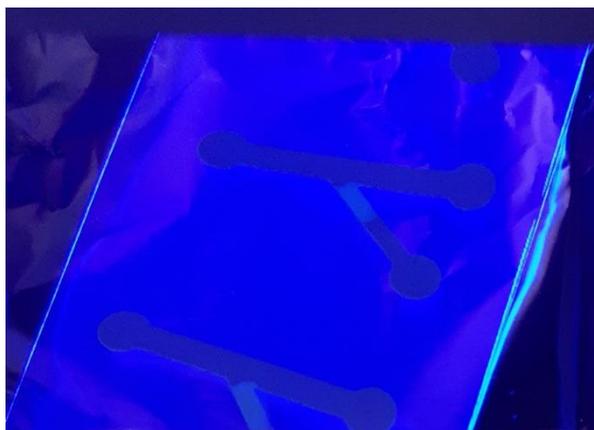


Figure 5.2 Photopolymerization of ionogels with UV light.

Once the polymerization has finished, the μ PADs with the gels are washed, first with Milli-Q water and then with ethanol, to remove any unpolymerized reactants and the excess of ionic liquid.

All μ PADs with ionogel were used at room temperature conditions, avoiding possible thermal response of the ionogel and limiting its function to act as a flow barrier or delay instead of using them as valves, which has already been reported [249,430,431].

2.5 Fabrication of the μ PADs

All the μ PADs tested were laser cut using a laser printer. The papers were washed twice with a 1:1 water:ethanol mixture and vortexed for 5 minutes each time to remove the ash generated by the cut. Once dry, the NIPAM ionogel barriers that are necessary in each case are immobilized. For this, the desired volume of the ionogel mixture is deposited with the pipette and then radiation of 365 nm wavelength is applied with a UV lamp for 10 minutes. This causes the DMPA to initiate polymer polymerization, changing from a viscous fluid to a yellowish gel.

Once polymerized, the gel is stable for long periods of time and can be stored until use.

For the incorporation of the NIPAM repository, it is synthesized as explained in section 2.2 and once polymerized, it is cut into pieces and stored in the solution of interest until its use. Prior to its introduction into the solution, the pieces of NIPAM must be collapsed,

since although NIPAM can enter equilibrium with the solution in which it is found, exchanging some ions, collapsing it avoids possible dilutions of the solutions of interest.

If necessary, the Flexicel is placed in contact with the μ PAD to act as a passive pump removing the sample flow.

2.6 Nanoflowers synthesis

The procedure for the nanoflower synthesis was as follows:

1. 12 Whatman 1 paper circles of 4 mm diameter were washed with 0.1 M sodium carbonate solution and let dry at room temperature.
2. Those papers were placed in a vial and 115 μ L of DVS were added. The vial was stirred for 2 hours.
3. DVS was retired with the help of a Pasteur pipette and the papers were washed two times with 1.15 mL of water stirring for 5 minutes each.
4. The desired units of enzyme were added in 0.38 mL of 0.01 M NaCl and KCl solution and the mixture is placed in the vial with the papers.
5. 40 μ L of 120 mM CuSO_4 aqueous solution was added and the mixture was incubated for two days.
6. Papers are washed to retire the excess of CuSO_4 and the papers are stored in the fridge until use.

2.7 Measurement protocol and data analysis

For this study two types of measurements were conducted. The first ones are related to differences in fluid absorption and the second ones are based on recordings of distances travelled by the fluid fronts and kinetics of the flow.

Fluid absorption was measured by weight differences between dry and wet conditions or even other intermediate states. Collapse of the NIPAM was achieved by heating above 43°C with the heater resistance described in Section 2.1 of this Chapter. To reach that temperature it is necessary to connect the heater resistance to a power supply and apply the appropriate voltage according to the indications of the resistance calibration function ($R^2 = 0.986$) shown in Eq. 1 and Fig. 5.3.

$$T = 11.6x + 2$$

(Equation 5.1)

The resistance was usually covered with adhesive tape to prevent its wetting from the leaking of the hydrogels. However, the adhesive did not lower the heat transmitted by the resistance, which reached adjustable and stable temperatures. Common NIPAM hydrogel empties quickly once the LCST temperature is reached and in less than a minute it can be observed how the hydrogel turns from colourless to white and shrinks. Usually, to be certain that the NIPAM has been completely emptied the fluid leaked is dried with a piece of absorbent paper until it stops draining. The dry pieces of hydrogel are easily manipulated to be weighted in an analytical balance. Then, these are immersed again in the desired solution for the NIPAM to be swell again. Until use, the NIPAM keeps preserved that way in a vessel of the solution covered with a plastic film to prevent contamination of the liquid. To weight the hydrated state, it is required for the hydrogel to have been dipped in the solution for at least 100 minutes to reach a stable state of swelling.

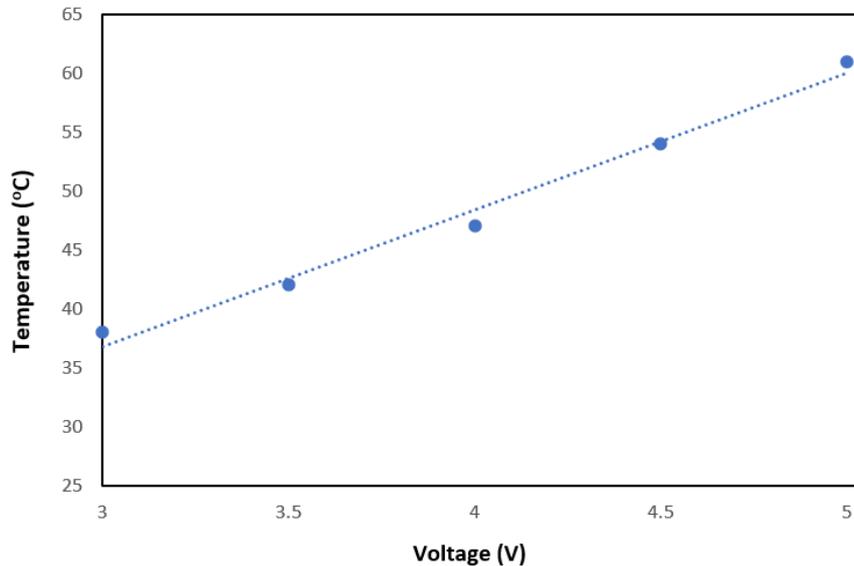


Figure 5.3 Calibration of the heater.

On the other hand, measurements related to the flow rate and its kinetics were conducted under constant illumination conditions by placing the μ PAD in a light box and placing camera used to record videos and take pictures in a fixed position by attaching it to a tripod. The camera is a DSC-HX300 from Sony and allows fully control of settings

such as resolution (3648 x 2736 pixels), exposure time 1/40 s, aperture value f/3.5, ISO-80 and white balance 2800 K. The free software Avidemux was used to analyse the videos recording distances covered by the flow front versus time.

3. Results

3.1 Swelling/Deswelling behaviour of the NIPAM repository

To obtain information for possible future applications of the NIPAM repository in microfluidic sensors, several swelling/deswelling experiments were carried out.

NIPAM sheets of three different thicknesses (0.75, 1.0 and 1.5 mm) were cut into rectangles of sizes 4, 6, 9, 16, 25, 30, 36, 49, 64, 81 and 100 mm², three replicates for each size and thickness; and their water absorption was measured by weight difference between the hydrated and collapsed form. To collapse the NIPAM, it was heated above 45°C on a hot plate drying the water that was released until it was observed that no more fluid was released.

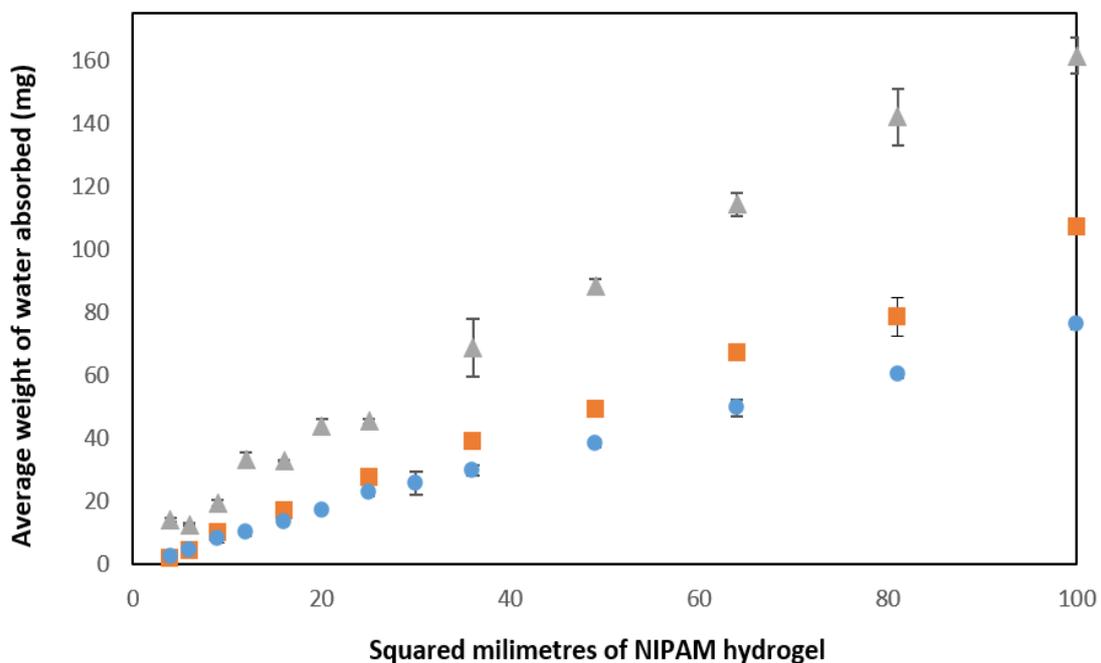


Figure 5.4 Average weight of water absorbed per NIPAM hydrogel surface (mm²) of 1.5 mm (gray), 1 mm (orange) and 0.75 mm (blue) thicknesses.

Table 5.1 Analytical parameters for the swelling/deswelling of the NIPAM hydrogel.

Thickness (mm)	Equation	R ²
0.75	$y = 0.7476x + 1.6260$	0.9964
1.00	$y = 1.0415x - 0.4006$	0.9950
1.50	$y = 1.6184x + 6.7446$	0.9953

As is well known, when NIPAM exceeds its LCST, it undergoes a phase transition from hydrophilic to hydrophobic. Thus, the water that previously interacted with its internal structure, filling it, becomes repelled and is expelled, observing how the NIPAM reduces its volume and changes from colourless to white.

Logically, for the same area, the thicker NIPAM can store higher volumes, the difference being proportional to the increase in thickness. However, as the thickness increases, a variation in the physical properties of the NIPAM was also found, becoming softer and more difficult to handle with respect to the 0.75 mm thickness. In addition, a greater thickness requires a higher heating power of the heating system per unit area, while a lower NIPAM thickness implies an increase in the repository area required to release the same volume as with higher thicknesses. This means that choosing a smaller NIPAM thickness requires a larger heater area if collapse is to occur in a timely manner rather than gradually.

Once the area and thickness of NIPAM required to release a given volume of water in the sensor were known, it was also considered interesting to demonstrate whether the absorption capacity of the NIPAM can be altered by carrying out several filling and emptying cycles. For this purpose, 1 x 1 cm squares of the NIPAM of 1 mm thickness were cut and subjected to several swelling/deswelling cycles with water. The absorption was measured as the difference in weight between the collapsed and filled state.

It was found that NIPAM always returns to the same dry weight, as it can be seen in *Fig. 5.5*, showing that it does not degrade in the heating processes and the absorption level remains around the initial value and can oscillate depending on the time left absorbing and the oscillations of the ambient temperature.

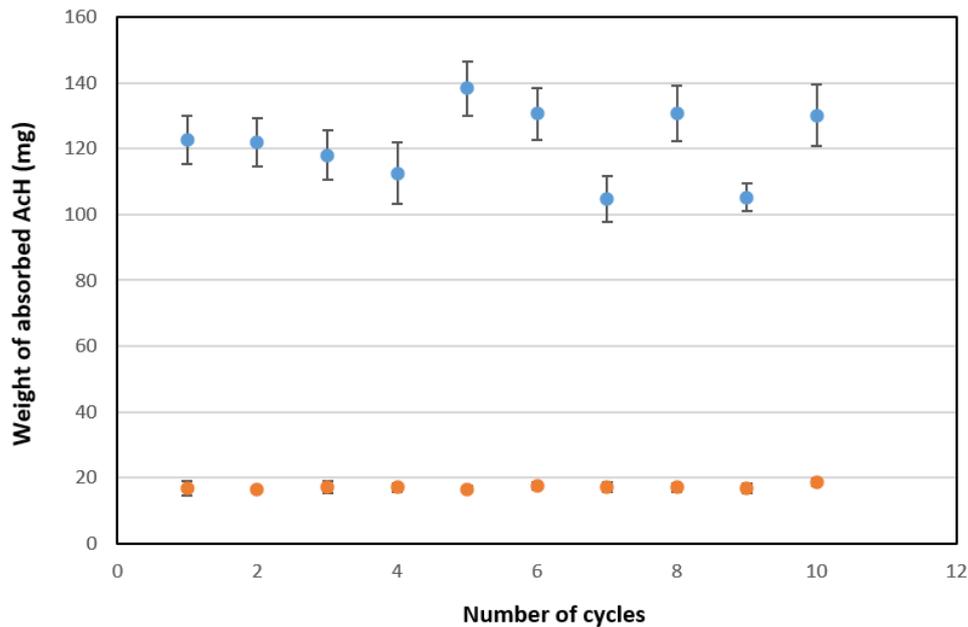


Figure 5.5 Average weight of 1 cm² NIPAM hydrogel in each of the 10 cycles of swelling (blue) with water and deswelling (orange).

The weight of water absorbed oscillates around 120 mg, which is consistent with what we observed in the calibration of the previous section.

Finally, it is well known that NIPAM hydrogels can collapse quickly, in less than a minute, releasing their whole water content. However, it is also interesting to address the kinetics of swelling at least in the case of the most common solvent, water, so it is known how much time it is required for a piece of hydrogel to reach a point of equilibrium where no more solvent can be loaded.

To study this, three pieces of NIPAM hydrogel of 1 cm² and 1 mm thickness were swelled with Milli-Q water during increasing times (13, 30, 60, 90, 120 and 150 minutes) and weighted. The results have been expressed per unit by dividing by the weight of the dried NIPAM pieces to eliminate the variability associated with the cutting process of the pieces and are shown in *Fig. 5.6*. At first the absorption increases linearly with time but after 90 minutes exchange of water molecules with the medium stabilizes, higher absorptions are not achieved by allowing the hydrogel to be immersed for longer periods than 90 minutes.

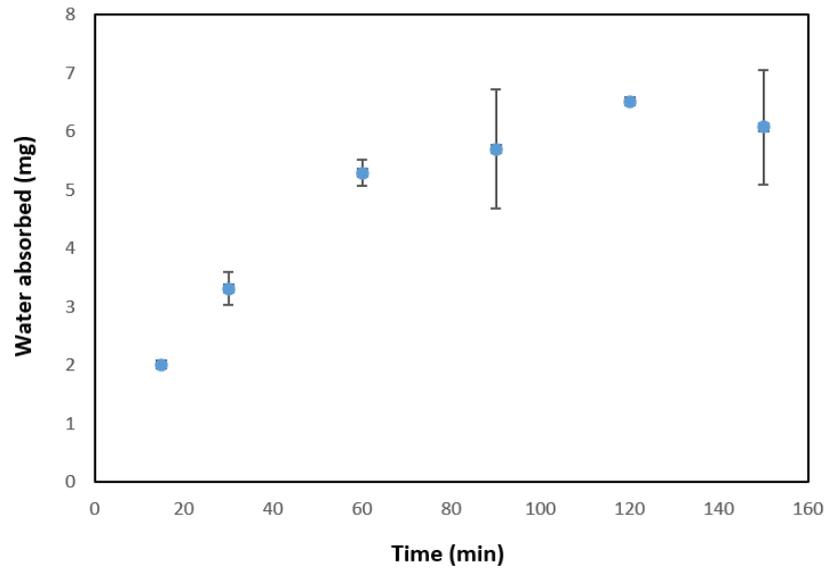


Figure 5.6 Swelling kinetics of the NIPAM hydrogel.

3.2 Behaviour in different solvents

Sometimes the use of organic solvents or mixtures of these with water is required in microfluidic devices. So, another interesting aspect to consider is the possibility of retaining and releasing organic solvents or aqueous mixtures of this in NIPAM. To this end, $1 \times 1 \text{ cm}^2$ squares of 1 mm thick hydrogel were immersed in ethanol and methanol. The weight of solvent absorbed was obtained by normalizing the weight of swollen NIPAM by that of the empty NIPAM. The normalized weight was found to be 1.5 mg less than that of water and very similar for ethanol and methanol, so NIPAM hydrogel can function as a repository for short tail alcohols, but corrections have to be done regarding the calibration of swelling per squared millimetre to address the lower absorption rates.

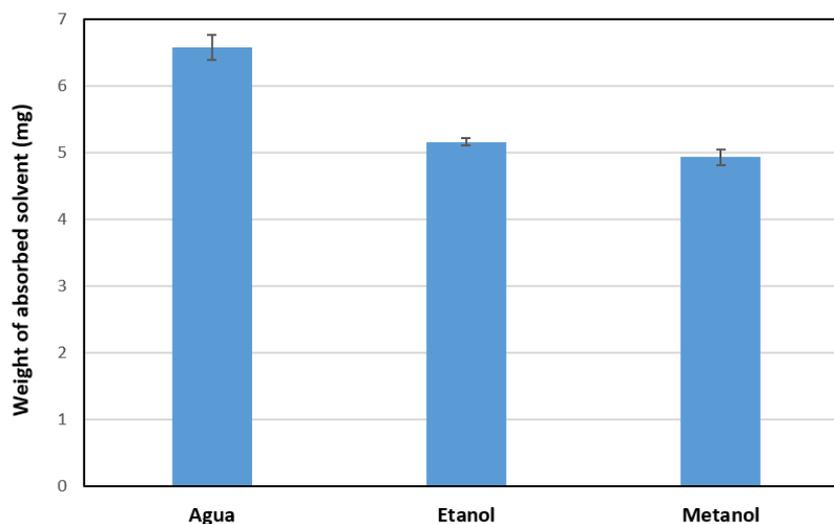


Figure 5.7 Differences in weight of solvent absorbed in 1 cm² NIPAM hydrogel.

3.3 Thermal behaviour below the LCST

It is commonly known that NIPAM undergoes a drastic change in its adsorptive properties when heated above its LCST, rapidly releasing all the volume it has previously absorbed. However, this variation might not be as drastic as thought since when performing the NIPAM swelling/deswelling cycling experiment, variations were observed that seemed to depend on ambient temperature and filling time, so it is interesting to check whether this dependence on temperature is relevant or not.

For this purpose, three pieces of NIPAM of size 1 x 1 cm and thickness 1 mm were placed in a vial with 25 mL of water in the refrigerator at 5°C and three other pieces of the same size in another vial with 25 mL of water at 20°C. After the same filling time for both, the amount of water absorbed was calculated by difference in weight between the swollen NIPAM and the collapsed NIPAM so as not to affect the variability of the cut in weight.

It was found that the amount of water absorbed was significantly higher for the NIPAM pieces that were at lower temperature (see Fig. 5.8). This confirms that although there is a marked phase transition at a given temperature, the lower degree of rearrangement is initiated at lower temperatures.

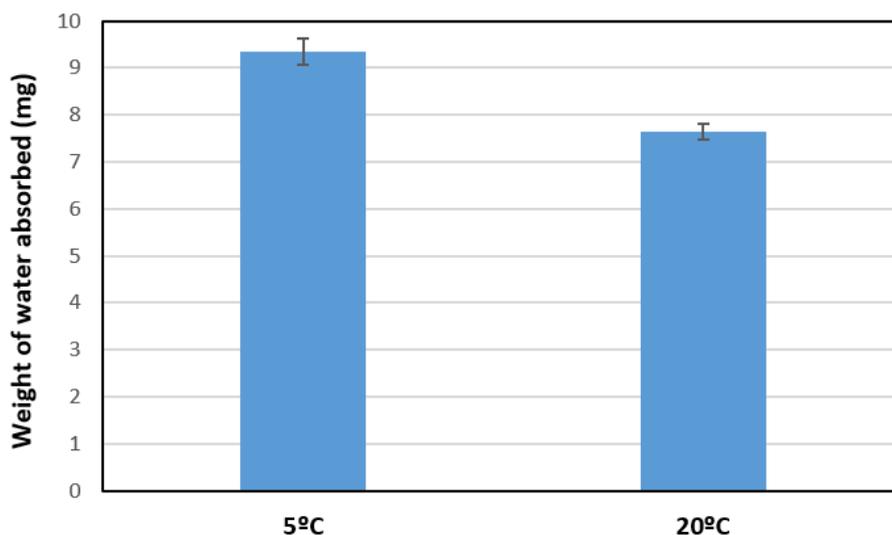


Figure 5.8 Water absorption of NIPAM hydrogel depending on temperature.

3.4 pH influence in adsorption

Another factor usually affecting smart polymers' degree of filling is the pH of the solution. The effect is noticeable or not depending on the functional groups of the side chains of the polymer. Some stimuli-responsive polymers may even collapse when they undergo pH variations. NIPAM has the advantage of not releasing all its content when this happens, however, it is not totally independent of pH, which makes it necessary to characterize the differences in absorption versus pH.

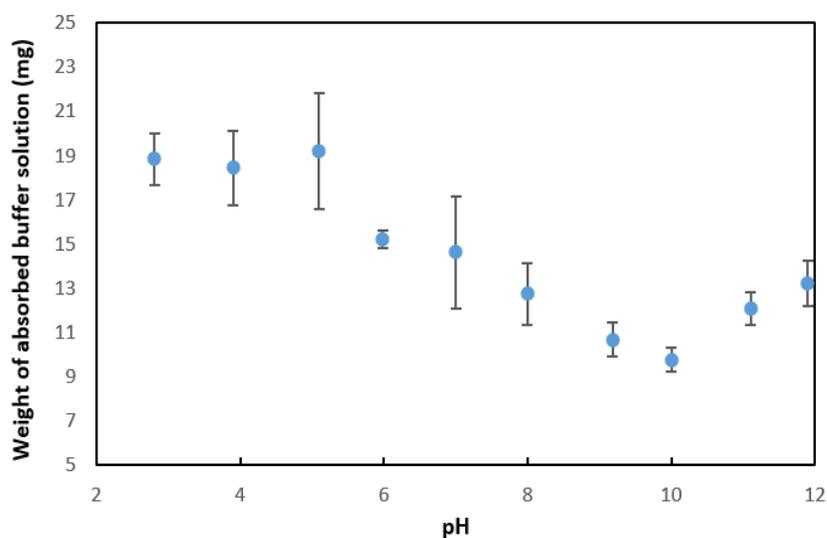


Figure 5.9 Normalized phosphate buffer absorption depending on the pH.

For this purpose, a set of phosphate buffers 0.1 M solutions with pHs ranging from 4.0 to 12.0 were absorbed in hydrogel and weighted before and after swelling.

The results shown in *Fig. 5.9* are normalized with the dry weight of the NIPAM pieces. It was found that at higher pH values, NIPAM absorbs less buffer solution. The decrease in absorptions is initially almost linear but then, above pH 10.0 the absorption goes up slightly. This agrees with the fact observed in previous studies that the polymer has difficulties retaining concentrated solutions of strong bases such as NaOH [75].

To further exploration of the possibility of using the repository for acid solutions the same cycles of swelling and deswelling of Section 3.1 were repeated in this case with 0.1 M solutions of acetic acid. Hydrogel was cut into 1 cm² squares with 1 mm thickness. Squares were emptied by heating and right after their weight was noted, immersed in the weak acid solution for 90 minutes and weighted again.

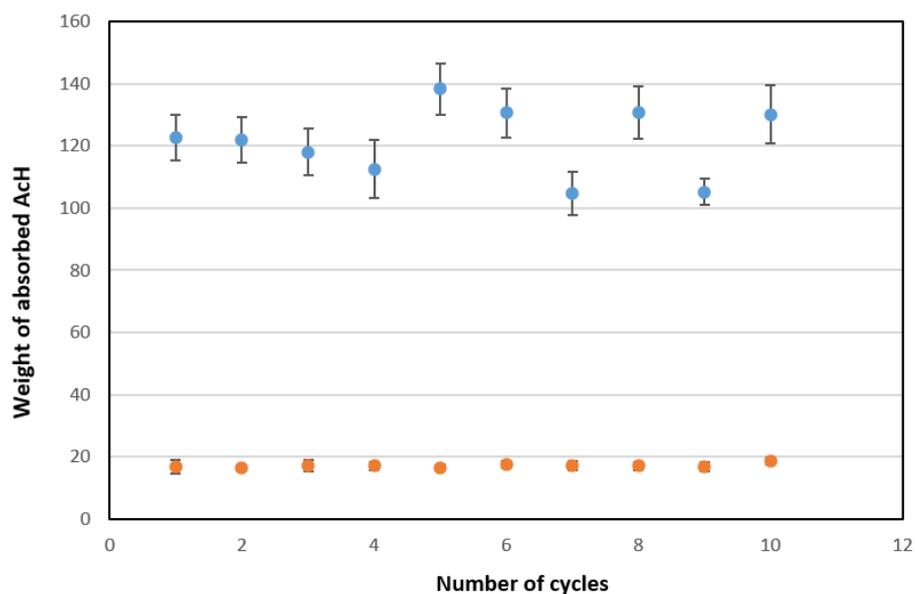


Figure 5.10 Average weight of 1 cm² NIPAM hydrogel in each of the 10 cycles of swelling (blue) with acetic acid and deswelling (orange).

Results in *Fig. 5.10* show that NIPAM is not affected by the number of swelling/deswelling cycles operated in moderately acid solutions, so it can be used as a repository for this type of reagents.

3.5 Evaporation processes in NIPAM hydrogels

As aforementioned, common NIPAM hydrogel is capable of absorbing large volumes of aqueous solutions but if not collapsed straight after being removed from the solutions evaporation process start taking place and actual volumes released may not be well known. To address whether this is crucial for the NIPAM use, three pieces of 0.5 cm² and 0.75 mm thickness NIPAM, which had been swelled with Milli-Q water, were left dry at room conditions for two hours weighting them every 15 minutes. Another three pieces of the same dimensions followed the same procedure but after being swollen with ethanol to compare the evaporation effects with those of the water swollen common NIPAM hydrogel.

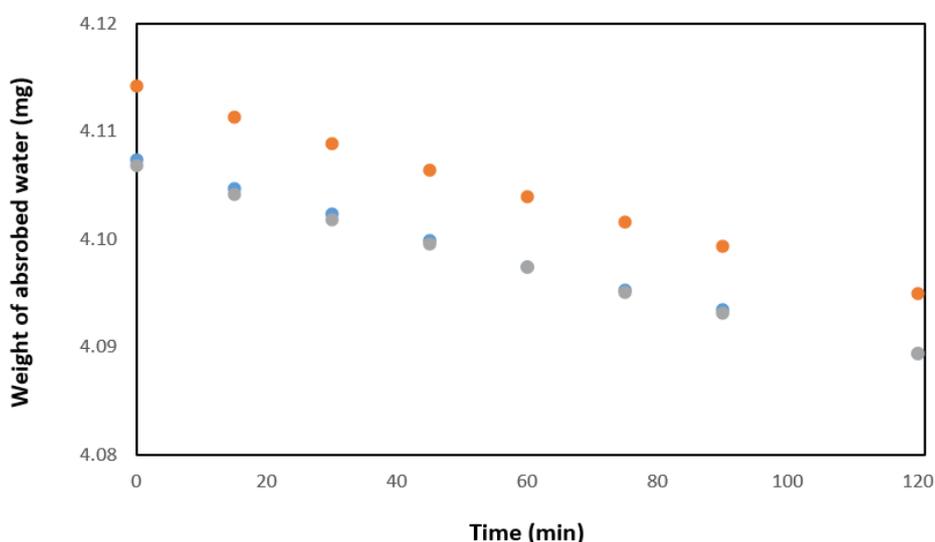


Figure 5.11 Three replicates of the weight loss in NIPAM hydrogel due to water evaporation processes.

In the case of water evaporation, hydrogel weight loss is linear indicating that after two hours, drying is still not complete. This gives enough time to operate most of the already existing microfluidic sensors, which usually only takes a few minutes to execute. In the case of ethanol, complete dryness could be achieved in an hour and after that weight signal stabilizes.

Considering these calibrations, it could be easily calculated the solvent loss just by noting down the time that the NIPAM has been removed from the solution.

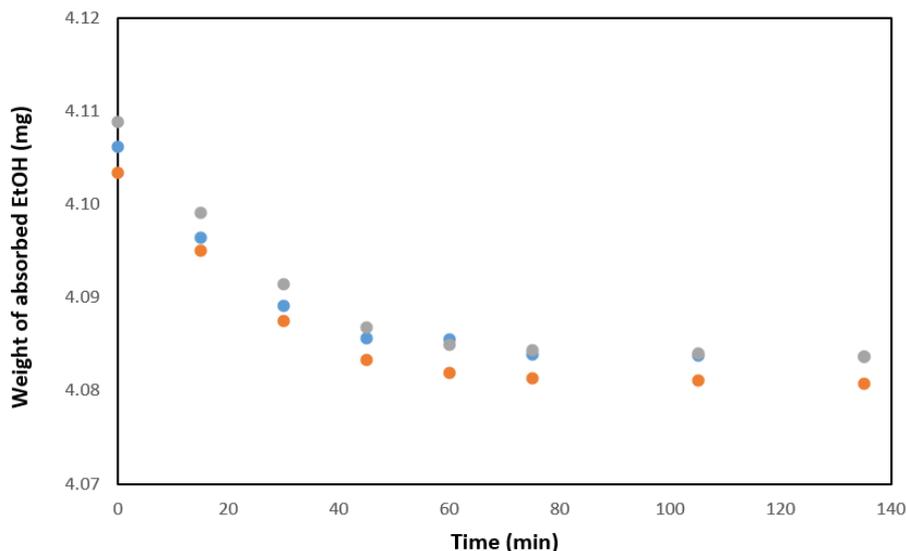


Figure 5.12 Three replicates of weight loss in NIPAM hydrogel due to ethanol evaporation processes.

In case of needing extended periods of hydration of the hydrogel they could be achieved by introducing ionic salts such as lithium chloride (LiCl) or calcium chloride (CaCl_2) in the polymer structure as it was demonstrated by Hong et al [432]. Highly hydratable salts improve the water retention capacity of the hydrogel in almost 90% of the initial water retained at room temperature.

Evaporation processes of the non-drying NIPAM were evaluated by synthesizing the hydrogel as described in section 2.3 of this chapter and letting it dry removed from solution at ambient conditions.

After one day, non-drying hydrogel experiment a 1.67% of weight loss and it stabilizes. Three days later no further weight loss was measured, and appearance of the polymer corroborates this. To be certain that the polymer still having its smart properties of swelling and deswelling, collapse of the non-drying NIPAM was induced in a stove at 50°C , and weight loss was noted every 5 or 10 minutes for 2.5 hours.

Although the NIPAM repository with ionic salts in its structure has the advantage of almost no suffering evaporation, collapse in this type of hydrogel becomes very slow so the uses for this polymer will be more oriented to keep humidity of membranes in a sensor than to be used as a repository.

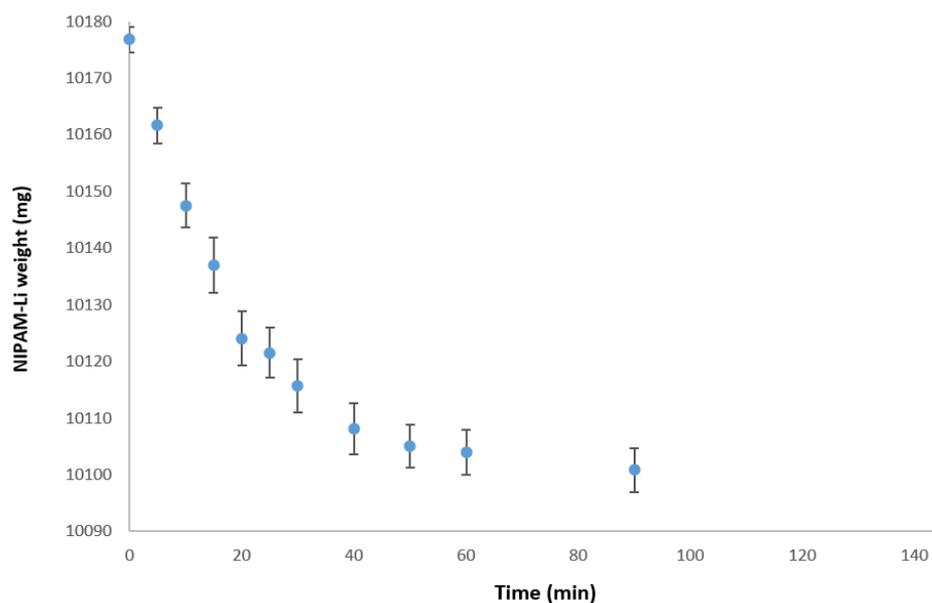


Figure 5.13 Non-drying NIPAM weight loss at 50°C versus time.

3.6 Ionogels as flow barriers or delayers

The effectiveness of ionogel as delayer was measured using a standard design by disposing a strip of paper which splits into two perpendicular arms of the same dimensions each one as shown in *Fig. 5.14*. Channel 1 contained ionogel, while channel 2 did not. This μ PAD was supported in adhesive tape and dyes solutions were drop casted onto them recording the advance of the flow front and comparing the times. Two ionogels were tried, one with EMIES and the other with PDCA as ionic liquid. The volumes used for the experiment were 0.5, 0.8, 1.0, 1.2 and 1.5 μ L.

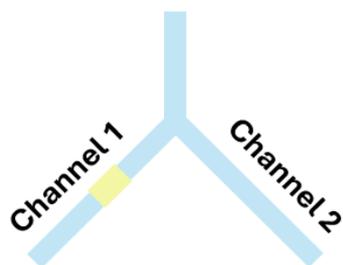


Figure 5.14 μ PAD design used to verify the delaying activity of ionogels.

For ionogel with EMIES ionic liquid, there was no significant flow rate difference for volumes lower than 1.0 μL and although volumes 1.0 and 1.2 μL always delayed flow some seconds, results are so irreproducible that they were considered unreliable. On the other hand, ionogel with PDCA showed more consistent results. In all cases adding this ionogel delayed flow compared to the ionogel-free channel. The lower (0.5 μL) and the higher (1.5 μL) volumes of ionogel tried in this case only gave 8 seconds of delay and were more irreproducible (SD = 5.2). However, volume 1.2 μL systematically stopped the flow and volume 0.8 μL delayed the flow front 68 seconds (SD = 7.8), proving the utility of ionogels as barriers or flow delayers for future microfluidic sensors.

To take a further step towards the development of microfluidic sensors employing ionogels, two other μPAD designs with ionogel barriers with PDCA were prepared. One of them consists of two parallel strips of paper connected at some points with another paper strip in zig zag. In this μPAD ionogel barriers were introduced in the junctions of the paper strips by drop casting 0.3 μL of ionogel with PDCA as ionic liquid following the protocol explained in Section 2.4 of this chapter. Then, 10 μL of lemon-yellow dye solution was added to one end of the zig zag paper strip and photographs were taken. The result is shown in *Fig. 5.15*.

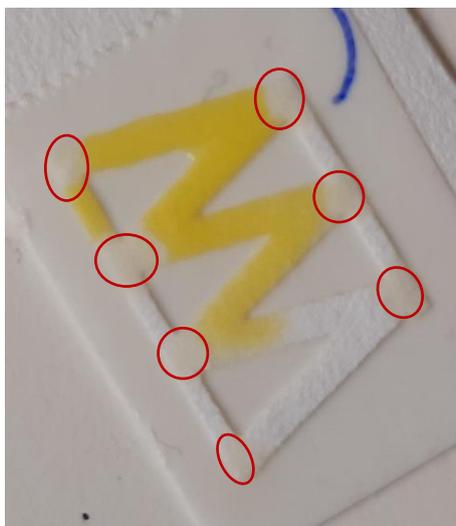


Figure 5.15 First example of the use of NIPAM ionogel barriers (rounded in red) within a μPAD .

The solution flowed mostly through the zigzag rather than through the other channels, demonstrating the effectiveness of the ionogel barrier in favouring certain paths over others.

Another design was tested to force two dye solutions (Brilliant Blue and Lemmon Yellow) to mix in a particular area of the μ PAD and not in the spaces in between. To demonstrate this, paper was cut as shown in *Fig. 5.16* and two ionogel barriers with PDCA as the ionic liquid were placed on the top and bottom of the paper. The blue dye was added to the top near the ionogel barrier but to the right, while the yellow dye was added to the left. A piece of Flexicel was placed on top of the point where the two solutions should meet to stimulate the flow. As desired, mixing of the two solutions only occurs on the central pad, above the second ionogel barrier.



Figure 5.16 *Second example the use of NIPAM ionogel barriers within a μ PAD.*

3.7 NIPAM assisted μ PAD model.

Once the NIPAM ionogels capability to slow down the flow and NIPAM hydrogel ability to release reagents were proven, it was considered the possibility of including these functionalities in a paper microfluidic device model for the analysis of different compounds, as they can be pesticides, that can block the enzymatic hydrolysis of acetylcholine by acetylcholinesterase.

The idea of the device (*Fig. 5.17*) is to retain a pH indicator covalently immobilized in the detection zone, which is preceded by a zone in which the enzyme has been retained in the form of nanoflowers to enhance its activity and prevent it from being washed away with the sample or substrate flow (acetylcholine, AChCl). The area where the enzyme is retained is the meeting point of two different pathways, one for the potentially pesticide-contaminated water sample and one for the enzyme substrate AChCl.

Ideally, the substrate should be included in a NIPAM reservoir and held immobile until the sample reaches the enzyme and inhibits its function. However, to prevent the sample from moving through the substrate channel instead of going to the enzyme, NIPAM ionogel is deposited in the path of the substrate. Once the inhibitor has blocked the enzyme, the heater below the NIPAM deposition site is activated, releasing the substrate, which reaches the enzyme, leaving it to act for a period of time. The enzyme not blocked by the inhibitor will degrade AChCl into choline and acetic acid. Acetic acid will act on the immobilised acid-base indicator and change its colour. After the reaction time has elapsed, a photograph is taken of the detection zone and the corresponding colour coordinate is measured.

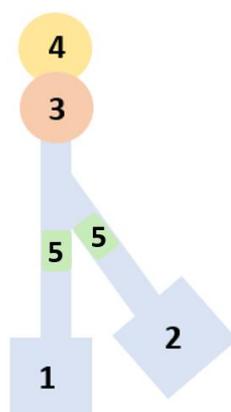


Figure 5.17 μ PAD design. 1. Inhibitor sampling zone. 2. Substrate reservoir zone. 3. Enzyme zone. 4. Detection zone. 5. NIPAM ionogels position.

The first step in optimising the device was to select the angle between the two channels that, together with the NIPAM ionogels, will facilitate the flowing in the desired direction. To do this, paper devices of the same dimensions with the second channel were laser cut at angles of 30, 45, 60 and 90 degrees to the first channel and all of them

were washed to remove ash residues with a 1:1 water:ethanol mixture for 10 minutes. Afterwards, all μ PADs were left to dry under ambient conditions.

A volume of 22 μ L of Bright Blue solution, enough to cover the whole μ PAD, was added in the tip of the first channel and the advance of the flow was measured by counting the time required for the solution to reach the tip of the second channel (Fig. 5.18).



Figure 5.18. Different angles tried for the second channel in the μ PAD.

Table 5.2 Average time required for the flow to reach the tip of the second channel depending on the angle between channels.

Angle (°)	Average time (s)	SD
30	13.0	3.6
45	15.3	1.1
60	10.8	0.7
90	13.3	2.5

The results shown in Table 5.2 show that the best angle for the two arms of the device was 45° as it is the angle in which longer time is required for the solution to reach the channel 2 tip, and this minimizes the backflow.

The second step in the design of the μ PAD was to select the length and width of the channels. For this, the first channel was fixed at a width of 2 mm and different widths of the second channel were laser cut and washed with the same procedure as in the previous sections, and then a volume of 25 μ L, which was sufficient to cover the entire

μ PAD in all cases, was added to the end of the first channel and the time taken to reach the end of the second channel was measured (Fig. 5.19).

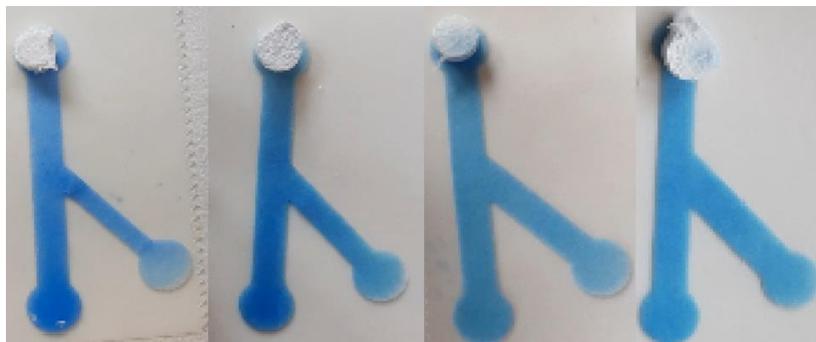


Figure 5.19 Different channel 2 widths tried in the μ PAD.

Table 5.3 Average time required for the flow to reach the tip of the second channel depending on channel 2 width.

Channel 2 width (mm)	Average time (s)	SD
2.0	31.8	4.7
2.5	11.6	5.6
3.0	6.6	1.3
3.5	7.5	0.5

The best result (Table 5.3) was obtained for the 2 mm width, which made it more difficult for the solution to move in the wrong direction, i.e. it took longer to reach the end of the channel where it should not flow.

pH indicator selection

Two options were considered for the selection of the pH indicator: AD-VS-1 and bromocresol blue as they are indicators that show more colour variation around the expected pH in the study.

Whatman 1 paper circles with a diameter of 4 mm were laser cut, washed and dried as in the previous sections. Then, 2 μ L of a 0.01 M solution of bromocresol blue dye were

added and left dried before adding 2.5 μL of PBS solutions ranging from pH 4 to 8.3. As the buffer solutions could not wet correctly the paper, sodium chloride was added to the buffer solutions to improve the permeation into the paper. Anyway, the solutions permeation seemed not fast enough.

In the case of the AD-VS-1 indicator, the synthesis was carried out with the same procedure described in Chapter 3 of this Thesis [433]. After the purification of the final product of the double step reaction, the retention of the dye was as follows: first the Whatman paper circles of 4 mm diameter were laser cut and washed with 0.1M sodium carbonate solution, then they were left dry at room temperature and the dye was added in volumes of 1.6 μL . The circles with the indicator were kept at dark during 24 hours for the dye to complete the oxa-Michael addition reaction with the cellulose and complete the click immobilization. Next day, the indicator residues not bound to the paper are removed by washing with a water: ethanol 1:1 mixture for 10 minutes in an ultrasonic bath. The colour changes with the pH variation due to the addition of PBS was recorded by photographs and the colour change was observed to be enough fast without need to add NaCl. Also, the covalent link between the indicator and the paper made this option the best as the colour does not lose intensity with the use.

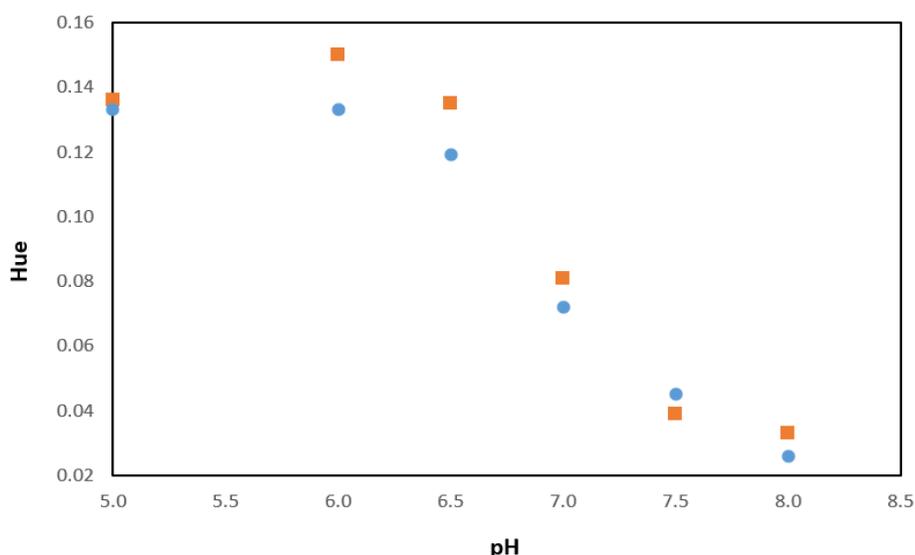


Figure 5.20 Hue change of 7 mg/mL (Blue) and 3.5 mg/mL (Orange) of AD-VS-1 due to pH variation.

Once the AD-VS-1 was selected as the indicator, its concentration for the μPAD had to be chosen. Concentrations 3.5, 5, 7, 10, 15 and 20 mg/mL were tested first with PBS with

pHs 4, 5, 6, 6.5, 7 and 7.5 (Fig. 5.20) and then with different concentrations of acetic acid (0.025, 0.05, 0.1 y 1 M). The images were analysed with ImageJ to extract R, G, B, H, S and grey coordinates (Fig. 5.21).

The comparison showed that the best coordinate to use was the hue from the HSV space colour and the curve was observed for 3.5 and 7 mg/mL while it did not work for higher concentrations of indicator as the papers were no capable of retaining enough dye and the results were very irreproducible.

However, at low concentrations of acetic acid the number of molecules of indicator were too much in comparison to those of protons for the dye to change colour, so a first attempt to use more diluted indicator concentrations were tried (0.07, 0.014 and 0.0014 mg/mL).

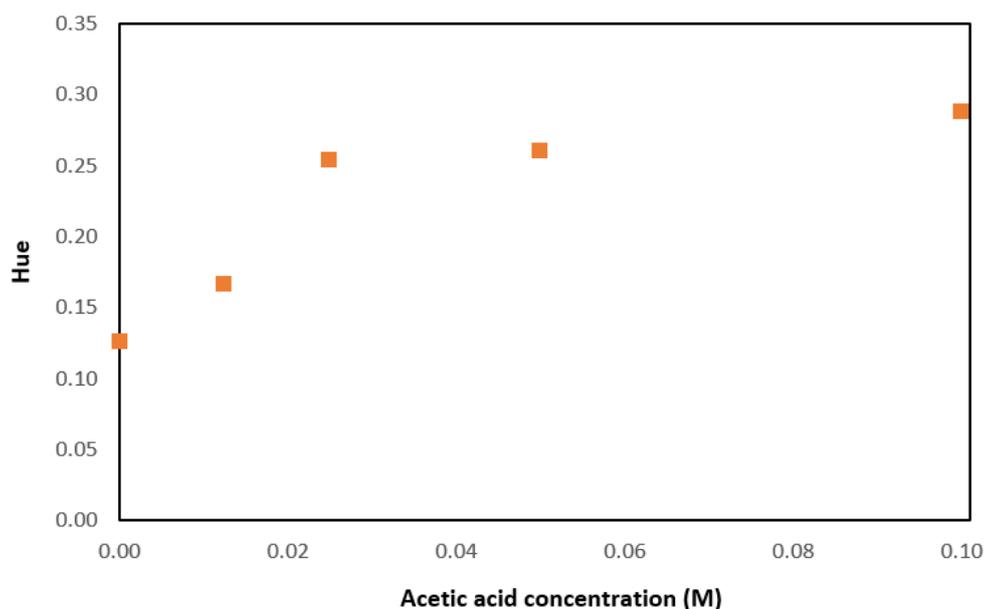


Figure 5.21 Hue variations of 0.014 mg/mL AD-VS-1 indicator with different concentrations of acetic acid.

The best results between those concentrations tried were achieved for the concentration of 0.014 mg/mL, which gave the highest signal variation (0.12), so it was selected for the first attempt to build a μ PAD system.

Enzyme optimization

A first approach was attempted by trying to immobilise the enzyme on the μ PAD as nanoflowers. For this, different enzyme concentrations were tested following the procedure described in Section 2.6 of this chapter. Enzyme concentrations of 2, 5, 10, 25, 50, 100 and 200 U/mL and substrate concentrations between 0.001 and 0.1 M were used to record shade variations over one hour. The results showed no significant signal variation in most cases and were completely irreproducible in the few cases where a trend was detected.

After several unsuccessful attempts, the initial idea was discarded in search of easier and more robust procedures. For this purpose, the enzyme was deposited directly on the paper before the detection zone. The signals shown in this case were better than with nanoflowers (*Fig. 5.22*).

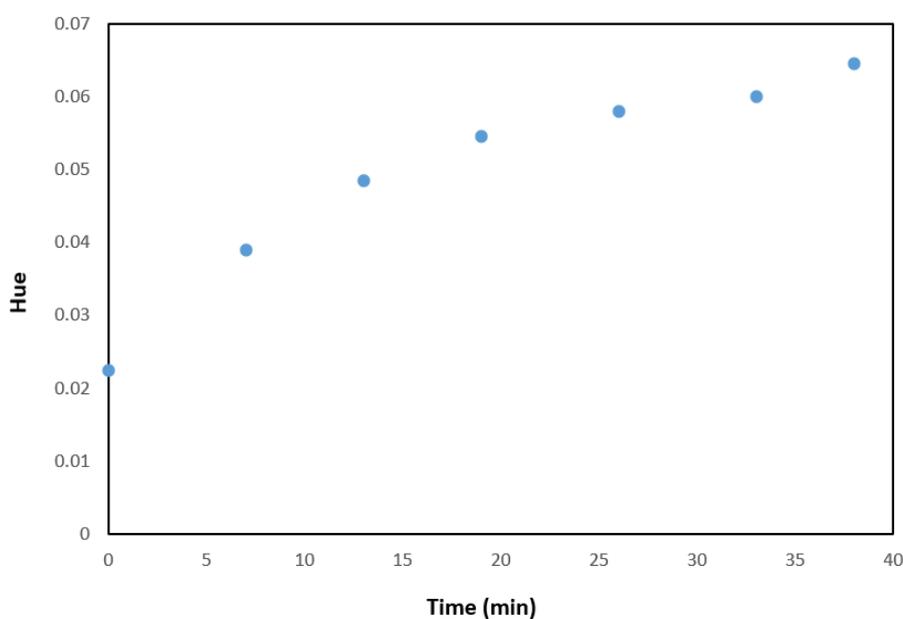


Figure 5.22 Hue variation with time for an enzyme concentration of 5 U/ml and a substrate concentration of 0.01 M.

NIPAM ionogels volume optimization

To achieve the flow control two forms of NIPAM were used in the device. First one was NIPAM ionogels in the channels of the μ PAD to slow down and direct the flow in the direction of the enzyme and detection zone ensuring the minimum possible backflow.

The optimum volume of ionogel for the first channel was selected by polymerising different volumes of ionogel in it and comparing the measured the time required for the same volume of a Brilliant Blue solution to flow from the second channel to the detection zone.. The optimal ionogel volume for the second channel was selected by following the same procedure but releasing the solution from the first channel. The optimal ionogel volumes were found to be 2.2 μ l for the first channel and 1.5 μ l for the second channel. With these volumes, a delay time was obtained without completely clogging the channels.

NIPAM repository

The second form of NIPAM introduced in the sensor was a hydrogel for substrate repositories. It was synthesized as described in Section 2.2 of this chapter. After that the hydrated hydrogel was cut into rectangular pieces of 20 mm² and heated until complete draining. After that, 0.04 M solution of substrate was prepared by weighting and dissolving acetylcholine and four pieces of NIPAM were immersed in the solution each of them for 1.5 hours.

The whole system was assembled to address the functioning of the sensor and the NIPAM repositories were collapsed with a heater connected to a power supply of 4.5 V and the colour variation in the detection area was tracked until the detection zone started to dry by recording the whole system. Photos of the sensor every 30 seconds were obtained with Avidemux software and were analysed with ImageJ software.

The results showed an increase in signal due to the acetic acid generated by the enzyme when the substrate reached to the sensing area.

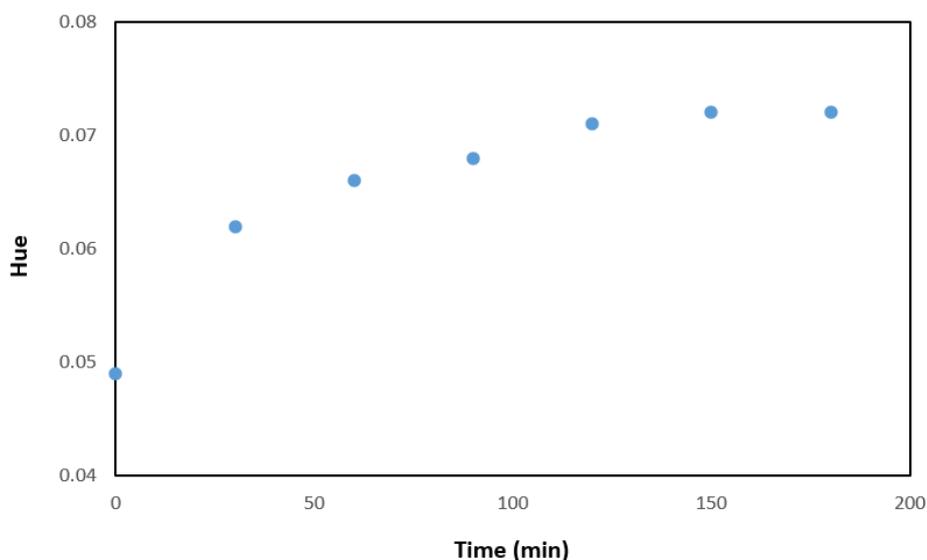


Figure 5.23 Hue variation for a NIPAM repository of 0.04M AChCl.

4. Conclusions

The suitability of different NIPAM polymers for the development of microfluidic systems has been demonstrated by the synthesis and inclusion of ionogel barriers and hydrogel repositories in different designs of μ PADs.

Characterization of NIPAM hydrogels was carried out with meticulous attention to detail including filling and casting studies in aqueous media for different hydrogel thicknesses and sizes, filling kinetics, drying under ambient conditions, compliance with a minimum number of use cycles of 10, variations of absorption capacity with pH, compliance with the same number of cycles in an acid medium, possibility of use with organic solvents with intermediate polarity and high volatility (such as ethanol and methanol), absorption differences due to changes in ambient temperature, filling kinetics and comparison with a hydrogel that includes ionic salts in its structure to prevent evaporation.

All this was done by means of weighing difference measurements while for the characterization of the two types of ionogels that were presented as candidates to act as flow barriers or delayers, flow front breakthrough times were compared for identical channels except for the presence of the photopolymerized ionogel. Results show that at least one of the two ionogels, the one with PDCA as ionic liquid, is capable of significantly

slowing down the flow and even stopping it being very useful to prevent mixture of the reagents before desired or to control where the mixing takes place.

Subsequent study of this analytical device on paper will allow it to be fine-tuned after all the influencing variables have been studied.

FIGURE INDEX

<u>Figure 5.1</u> BIO-RAD casting cells and glass and short plates for shaping hydrogel into sheets.....	305
<u>Figure 5.2</u> Photopolymerization of ionogels with UV light.	308
<u>Figure 5.3</u> Calibration of the heater.....	310
<u>Figure 5.4</u> Average weight of water absorbed per NIPAM hydrogel surface (mm ²)	311
<u>Figure 5.5</u> Average weight of 1 cm ² NIPAM hydrogel in each of.....	313
<u>Figure 5.6</u> Swelling kinetics of the NIPAM hydrogel.....	314
<u>Figure 5.7</u> Differences in weight of solvent absorbed in 1 cm ² NIPAM hydrogel.....	315
<u>Figure 5.8</u> Water absorption of NIPAM hydrogel depending on temperature.	316
<u>Figure 5.9</u> Normalized phosphate buffer absorption depending on the pH.....	316
<u>Figure 5.10</u> Average weight of 1 cm ² NIPAM hydrogel in each of the 10 cycles.....	317
<u>Figure 5.11</u> Three replicates of the weight loss in NIPAM hydrogel due to water evaporation processes.....	318
<u>Figure 5.12</u> Three replicates of weight loss in NIPAM hydrogel due to ethanol evaporation processes.....	319
<u>Figure 5.13</u> Non-drying NIPAM weight loss at 50°C versus time.	320
<u>Figure 5.14</u> μPAD design used to verify the delaying activity of ionogels.....	320
<u>Figure 5.15</u> First example of the use of NIPAM ionogel barriers (rounded in red) within a μPAD.....	321
<u>Figure 5.16</u> Second example the use of NIPAM ionogel barriers within a μPAD.....	322
<u>Figure 5.17</u> μPAD design. 1. Pesticide sampling zone. 2. Substrate.....	323
<u>Figure 5.18</u> . Different angles tried for the second channel in the μPAD.....	324
<u>Figure 5.19</u> Different channel 2 widths tried in the μPAD.....	325
<u>Figure 5.20</u> Hue change of 7 mg/mL (Blue) and 3.5 mg/mL (Orange) of AD-VS-1 due to pH variation.	326
<u>Figure 5.21</u> Hue variations of 0.014 mg/mL AD-VS-1 indicator.....	327
<u>Figure 5.22</u> Hue variation with time for an enzyme concentration.....	328
<u>Figure 5.23</u> Hue variation for the three replicates of 0.04M AChCl.....	330

TABLE INDEX

[Table 5.1 Analytical parameters for the swelling/deswelling of the NIPAM hydrogel.](#) 312
[Table 5.2 Average time required for the flow to reach the tip of the second.....](#) 324
[Table 5.3 Average time required for the flow to reach the tip of the second.....](#) 325

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En la presente Tesis Doctoral se han desarrollado dos dispositivos analíticos colorimétricos sobre soportes flexibles y sostenibles medioambientalmente como la tela (μ CAD) y el papel (μ PAD) para el análisis de muestras sanitarias, medioambientales y alimentarias. Además, se ha estudiado la posibilidad de incluir polímeros inteligentes que responden a estímulos en los dispositivos microfluídicos para lograr una mayor automatización del proceso de análisis. De ello se derivan las siguientes conclusiones:

- Se ha logrado la retención covalente el indicador AD-VS-1 a la celulosa presente tanto en la tela como en el papel, se han caracterizado los cambios de color de este frente al pH midiendo las variaciones en la coordenada H del espacio de color HSV, y se ha optimizado el proceso de preparación de la tela y el papel tanto previo a la adición del indicador, como posterior a la misma, para retirar el indicador no retenido.
- Se ha desarrollado y optimizado un μ CAD para el análisis del pH del sudor humano teniendo en cuenta parámetros como la concentración de indicador, el diseño de la serigrafía para adaptar el funcionamiento al volumen habitual de sudoración en el área de la muñeca y la inclusión de elementos de control de flujo, como las bombas pasivas, para lograr su funcionamiento a tiempo real. Además, se han estudiado aspectos como la reversibilidad y la estabilidad del μ CAD desarrollado. Se han comparado los resultados obtenidos con el μ CAD al medir el pH de muestras acuosas incoloras como aguas, líquido de lentillas y disoluciones tampón, con los que se obtienen cuando se emplea un pH-metro comercial.
- Se ha incluido el μ CAD en una pulsera que incorpora elementos electrónicos optimizados para lograr que el dispositivo funcione durante largos periodos de actividad física, enviando la información obtenida del pH del sudor mediante Bluetooth a una aplicación móvil creada específicamente para este dispositivo. Se ha asegurado la portabilidad de la pulsera en términos de peso, dimensiones y autonomía de la batería. Finalmente, se ha validado la pulsera y utilizado para

monitorizar el pH de la sudoración de deportistas, obteniéndose datos muy favorables.

- Se han desarrollado cinco tintas sensoras colorimétricas capaces de mostrar cambios sensibles y reproducibles en al menos una coordenada de color de los espacios HSV o RGB cuando varía la temperatura o las concentraciones de los gases NH_3 , H_2S , H_2O y CO_2 . Se han optimizado su composición y su aplicación en las esquinas de un código QR como parte de un dispositivo microfluídico de papel, para la medida de las condiciones del entorno en ambientes laborales y para el envasado inteligente de alimentos. Se han optimizado las medidas con una cámara de fotos bajo condiciones de iluminación controladas inicialmente, para más adelante incluir en una aplicación creada específicamente para este dispositivo sensor, correcciones de iluminación que permitan que el dispositivo funcione de manera robusta cuando se aplica a situaciones reales. Se han estudiado las interferencias entre los diferentes gases incluidos en el código y cómo estas pueden afectar al funcionamiento del sensor.
- Se ha comparado el funcionamiento del dispositivo desarrollado, con el funcionamiento de otros dispositivos sensores que incluyen códigos QR creados hasta la actualidad en términos de metodología de fabricación, material empleado en el soporte, capacidad de almacenar información, capacidad de corregir las variaciones de iluminación y creación de una aplicación propia para el dispositivo.
- Se han sintetizado diferentes polímeros inteligentes capaces de experimentar cambios de fase debidos a variaciones de temperatura basados en el monómero NIPAM, y se ha caracterizado el funcionamiento de aquellos que se han considerado más adecuados para su uso en dispositivos microfluídicos en cuanto a capacidad de almacenamiento de reactivos en disolución acuosa y cinéticas de liberación/absorción de estos en base a la temperatura y el pH. Se ha comparado la velocidad de avance de una disolución en tiras de papel con y sin polímeros de NIPAM para establecer los más adecuados para lograr el control de flujo de disoluciones en dispositivos analíticos microfluídicos.

- Se han realizado las primeras pruebas de diseño de un posible dispositivo para análisis de pesticidas organofosforados en muestras acuosas mediante la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, empleando polímeros de NIPAM como repositorios de reactivos y ralentizadores de flujo.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- [1] J.L.V. Shaw, Practical challenges related to point of care testing, *Pract Lab Med* 4 (2016) 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.plabm.2015.12.002>.
- [2] A.K. Yetisen, M.S. Akram, C.R. Lowe, Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices, *Lab Chip* 13 (2013) 2210–2251. <https://doi.org/10.1039/c3lc50169h>.
- [3] K.J. Land, D.I. Boeras, X.S. Chen, A.R. Ramsay, R.W. Peeling, REASSURED diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes, *Nat Microbiol* 4 (2019) 46–54. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0295-3>.
- [4] I. López-Rojo, O. Alonso, G. Ortega-Pérez, J. Galipienzo-García, S. González-Moreno, Prioritization, patient selection, and multimodal perioperative management of colorectal cancer facing health-care system saturation, *Cir Cir* 89 (2021). <https://doi.org/10.24875/CIRU.20000990>.
- [5] C.P. Price, Regular review: Point of care testing, *BMJ* 322 (2001) 1285–1288. <https://doi.org/10.1136/bmj.322.7297.1285>.
- [6] Grieve, Beech, Vincent, Mazurkiewicz, Near patient testing in diabetes clinics: appraising the costs and outcomes., *Health Technol Assess (Rockv)* 3 (1999). <https://doi.org/10.3310/hta3150>.
- [7] C.O. Laurence, J.R. Moss, N.E. Briggs, J.J. Beilby, The cost-effectiveness of point of care testing in a general practice setting: results from a randomised controlled trial, *BMC Health Serv Res* 10 (2010) 165. <https://doi.org/10.1186/1472-6963-10-165>.
- [8] J.D. Douketis, Patient Self-Monitoring of Oral Anticoagulant Therapy, *American Journal of Cardiovascular Drugs* 1 (2001) 245–251. <https://doi.org/10.2165/00129784-200101040-00003>.
- [9] V. Gubala, L.F. Harris, A.J. Ricco, M.X. Tan, D.E. Williams, Point of care diagnostics: Status and future, *Anal Chem* 84 (2012) 487–515. <https://doi.org/10.1021/ac2030199>.
- [10] C.F. Anticona Huaynate, M.J. Pajuelo Travezaño, M. Correa, H. Mayta Malpartida, R. Oberhelman, L.L. Murphy, V.A. Paz-Soldan, Diagnostics barriers and innovations in rural areas: insights from junior medical doctors on the frontlines of rural care in Peru, *BMC Health Serv Res* 15 (2015) 454. <https://doi.org/10.1186/s12913-015-1114-7>.
- [11] A. Ceci, C. Muñoz-Ballester, A.N. Tegge, K.L. Brown, R.A. Umans, F.M. Michel, D. Patel, B. Tewari, J. Martin, O. Alcoreza, T. Maynard, D. Martínez-Martínez, P. Bordwine, N. Bissell, M.J. Friedlander, H. Sontheimer, C. V. Finkelstein, Development and implementation of a scalable and versatile test for COVID-19

- diagnostics in rural communities, *Nat Commun* 12 (2021) 4400. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24552-4>.
- [12] D. Mabey, R.W. Peeling, A. Ustianowski, M.D. Perkins, Diagnostics for the developing world, *Nat Rev Microbiol* 2 (2004) 231–240. <https://doi.org/10.1038/nrmicro841>.
- [13] N. Varas-Díaz, I. Serrano-García, J. Toro-Alfonso, AIDS-Related Stigma and Social Interaction: Puerto Ricans Living With HIV/AIDS, *Qual Health Res* 15 (2005) 169–187. <https://doi.org/10.1177/1049732304272059>.
- [14] K. Lewandrowski, Point-of-Care Testing: An Overview and a Look to the Future (Circa 2009, United States), *Clin Lab Med* 29 (2009) 421–432. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2009.06.015>.
- [15] C.-T. Kung, C.-Y. Hou, Y.-N. Wang, L.-M. Fu, Microfluidic paper-based analytical devices for environmental analysis of soil, air, ecology and river water, *Sens Actuators B Chem* 301 (2019) 126855. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.126855>.
- [16] C. Hwang, W.J. Lee, S.D. Kim, S. Park, J.H. Kim, Recent Advances in Biosensor Technologies for Point-of-Care Urinalysis, *Biosensors (Basel)* 12 (2022). <https://doi.org/10.3390/bios12111020>.
- [17] J. Hu, S.Q. Wang, L. Wang, F. Li, B. Pingguan-Murphy, T.J. Lu, F. Xu, Advances in paper-based point-of-care diagnostics, *Biosens Bioelectron* 54 (2014) 585–597. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.10.075>.
- [18] J.M. Singer, C.M. Plotz, *The Latex Fixation Test* I. Application to the Serologic Diagnosis of Rheumatoid Arthritis*, 1956.
- [19] S.A. Berson, R.S. Yalow, *Quantitative Aspects of the Reaction between Insulin and Insulin-binding Antibody*, 1959.
- [20] S. Kumar, M. Nehra, S. Khurana, N. Dilbaghi, V. Kumar, A. Kaushik, K.H. Kim, Aspects of point-of-care diagnostics for personalized health wellness, *Int J Nanomedicine* 16 (2021) 383–402. <https://doi.org/10.2147/IJN.S267212>.
- [21] R. Wong, H. Tse, *Lateral Flow Immunoassay*, Humana Press, Totowa, NJ, 2009. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-240-3>.
- [22] Y. Dou, B. Wang, M. Jin, Y. Yu, G. Zhou, L. Shui, A review on self-assembly in microfluidic devices, *Journal of Micromechanics and Microengineering* 27 (2017) 113002. <https://doi.org/10.1088/1361-6439/aa84db>.
- [23] S.C. Terry, J.H. Herman, J.B. Angell, A Gas Chromatographic Air Analyzer Fabricated on a Silicon Wafer, *IEEE Trans Electron Devices* 26 (1979) 1880–1886. <https://doi.org/10.1109/T-ED.1979.19791>.

-
- [24] A. Manz, Y. Miyahara, J. Miura, Y. Watanabe, H. Miyagi, K. SatO, Design of an Open-tubular Column Liquid Chromatography Using Silicon Chip Technology, 1990.
- [25] D. Agustini, F.R. Caetano, R.F. Quero, J.A. Fracassi Da Silva, M.F. Bergamini, L.H. Marcolino-Junior, D.P. De Jesus, Microfluidic devices based on textile threads for analytical applications: State of the art and prospects, *Analytical Methods* 13 (2021) 4830–4857. <https://doi.org/10.1039/d1ay01337h>.
- [26] P.M. van Midwoud, A. Janse, M.T. Merema, G.M.M. Groothuis, E. Verpoorte, Comparison of Biocompatibility and Adsorption Properties of Different Plastics for Advanced Microfluidic Cell and Tissue Culture Models, *Anal Chem* 84 (2012) 3938–3944. <https://doi.org/10.1021/ac300771z>.
- [27] H. Becker, Polymer microfluidic devices, *Talanta* 56 (2002) 267–287. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(01\)00594-X](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(01)00594-X).
- [28] J. Zhou, A.V. Ellis, N.H. Voelcker, Recent developments in PDMS surface modification for microfluidic devices, *Electrophoresis* 31 (2010) 2–16. <https://doi.org/10.1002/elps.200900475>.
- [29] I. Miranda, A. Souza, P. Sousa, J. Ribeiro, E.M.S. Castanheira, R. Lima, G. Minas, Properties and Applications of PDMS for Biomedical Engineering: A Review, *J Funct Biomater* 13 (2021) 2. <https://doi.org/10.3390/jfb13010002>.
- [30] D.I. Walsh, D.S. Kong, S.K. Murthy, P.A. Carr, Enabling Microfluidics: from Clean Rooms to Makerspaces, *Trends Biotechnol* 35 (2017) 383–392. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.01.001>.
- [31] M.M. Bordbar, A. Sheini, P. Hashemi, A. Hajian, H. Bagheri, Disposable Paper-Based Biosensors for the Point-of-Care Detection of Hazardous Contaminations—A Review, *Biosensors (Basel)* 11 (2021) 316. <https://doi.org/10.3390/bios11090316>.
- [32] S. Li, S. Huang, Y. Ke, H. Chen, J. Dang, C. Huang, W. Liu, D. Cui, J. Wang, X. Zhi, X. Ding, A HiPAD Integrated with rGO/MWCNTs Nano-Circuit Heater for Visual Point-of-Care Testing of SARS-CoV-2, *Adv Funct Mater* 31 (2021) 2100801. <https://doi.org/10.1002/adfm.202100801>.
- [33] B.J. Toley, J.A. Wang, M. Gupta, J.R. Buser, L.K. Lafleur, B.R. Lutz, E. Fu, P. Yager, A versatile valving toolkit for automating fluidic operations in paper microfluidic devices, *Lab Chip* 15 (2015) 1432–1444. <https://doi.org/10.1039/c4lc01155d>.
- [34] S. Ahmed, M.P.N. Bui, A. Abbas, Paper-based chemical and biological sensors: Engineering aspects, *Biosens Bioelectron* 77 (2016) 249–263. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.09.038>.
- [35] M. Reches, K.A. Mirica, R. Dasgupta, M.D. Dickey, M.J. Butte, G.M. Whitesides, Thread as a Matrix for Biomedical Assays, *ACS Appl Mater Interfaces* 2 (2010) 1722–1728. <https://doi.org/10.1021/am1002266>.

- [36] X. Li, J. Tian, W. Shen, Thread as a Versatile Material for Low-Cost Microfluidic Diagnostics, *ACS Appl Mater Interfaces* 2 (2010) 1–6. <https://doi.org/10.1021/am9006148>.
- [37] W.K. Tomazelli Coltro, C.M. Cheng, E. Carrilho, D.P. de Jesus, Recent advances in low-cost microfluidic platforms for diagnostic applications, *Electrophoresis* 35 (2014) 2309–2324. <https://doi.org/10.1002/elps.201400006>.
- [38] R. Safavieh, G.Z. Zhou, D. Juncker, Microfluidics made of yarns and knots: from fundamental properties to simple networks and operations, *Lab Chip* 11 (2011) 2618. <https://doi.org/10.1039/c1lc20336c>.
- [39] W. Tan, E. Powles, L. Zhang, W. Shen, Go with the capillary flow. Simple thread-based microfluidics, *Sens Actuators B Chem* 334 (2021) 129670. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.129670>.
- [40] A. Nilghaz, D.R. Ballerini, W. Shen, Exploration of microfluidic devices based on multi-filament threads and textiles: A review, *Biomicrofluidics* 7 (2013). <https://doi.org/10.1063/1.4820413>.
- [41] S.-H. Jeon, K.-H. Hwang, J.S. Lee, J.-H. Boo, S.H. Yun, Plasma treatments of wool fiber surface for microfluidic applications, *Mater Res Bull* 69 (2015) 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2015.02.025>.
- [42] M.J. Arroyo, I. de Orbe-Payá, M. Ortega-Muñoz, J. Vilar-Tenorio, D. Gallego, G.J. Mohr, L.F. Capitán-Vallvey, M.M. Erenas, Capillary microfluidic platform for sulfite determination in wines, *Sens Actuators B Chem* 359 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.131549>.
- [43] W.T. Suarez, M.O.K. Franco, L.F. Capitán-Vallvey, M.M. Erenas, Chitosan-modified cotton thread for the preconcentration and colorimetric trace determination of Co(II), *Microchemical Journal* 158 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105137>.
- [44] M.J. Arroyo, M.M. Erenas, I. de Orbe-Payá, K. Cantrell, J.A. Dobado, P. Ballester, P. Blondeau, A. Salinas-Castillo, L.F. Capitán-Vallvey, Thread based microfluidic platform for urinary creatinine analysis, *Sens Actuators B Chem* 305 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127407>.
- [45] Y. Yang, E. Noviana, M.P. Nguyen, B.J. Geiss, D.S. Dandy, C.S. Henry, Paper-Based Microfluidic Devices: Emerging Themes and Applications, *Anal Chem* 89 (2017) 71–91. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04581>.
- [46] L.M. Fu, Y.N. Wang, Detection methods and applications of microfluidic paper-based analytical devices, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 107 (2018) 196–211. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.08.018>.

- [47] A.W. Martinez, S.T. Phillips, G.M. Whitesides, E. Carrilho, Diagnostics for the developing world: Microfluidic paper-based analytical devices, *Anal Chem* 82 (2010) 3–10. <https://doi.org/10.1021/ac9013989>.
- [48] A.-G. Niculescu, C. Chircov, A.C. Bîrcă, A.M. Grumezescu, Fabrication and Applications of Microfluidic Devices: A Review, *Int J Mol Sci* 22 (2021) 2011. <https://doi.org/10.3390/ijms22042011>.
- [49] A.W. Martinez, S.T. Phillips, M.J. Butte, G.M. Whitesides, Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays, *Angewandte Chemie - International Edition* 46 (2007) 1318–1320. <https://doi.org/10.1002/anie.200603817>.
- [50] D. Ma, S. Chon, S. Cho, Y. Lee, M. Yoo, D. Kim, D.Y. Lee, J.K. Lim, A novel photolithographic method for fabrication of flexible micro-patterned glucose sensors, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 876 (2020) 114720. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114720>.
- [51] M. Asif, F.R. Awan, Q.M. Khan, B. Ngamsom, N. Pamme, Paper-based analytical devices for colorimetric detection of *S. aureus* and *E. coli* and their antibiotic resistant strains in milk, *Analyst* 145 (2020) 7320–7329. <https://doi.org/10.1039/D0AN01075H>.
- [52] J. Nie, Y. Zhang, L. Lin, C. Zhou, S. Li, L. Zhang, J. Li, Low-cost fabrication of paper-based microfluidic devices by one-step plotting, *Anal Chem* 84 (2012) 6331–6335. <https://doi.org/10.1021/ac203496c>.
- [53] N.K. Mani, A. Prabhu, S.K. Biswas, S. Chakraborty, Fabricating Paper Based Devices Using Correction Pens, *Sci Rep* 9 (2019) 1752. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38308-6>.
- [54] X. Li, J. Tian, G. Garnier, W. Shen, Fabrication of paper-based microfluidic sensors by printing, *Colloids Surf B Biointerfaces* 76 (2010) 564–570. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.12.023>.
- [55] Anushka, A. Bandopadhyay, P.K. Das, Paper based microfluidic devices: a review of fabrication techniques and applications, *Eur Phys J Spec Top* 232 (2023) 781–815. <https://doi.org/10.1140/epjs/s11734-022-00727-y>.
- [56] K. Abe, K. Suzuki, D. Citterio, Inkjet-Printed Microfluidic Multianalyte Chemical Sensing Paper, *Anal Chem* 80 (2008) 6928–6934. <https://doi.org/10.1021/ac800604v>.
- [57] H. Shibata, Y. Hiruta, D. Citterio, Fully inkjet-printed distance-based paper microfluidic devices for colorimetric calcium determination using ion-selective optodes, *Analyst* 144 (2019) 1178–1186. <https://doi.org/10.1039/C8AN02146E>.
- [58] J. Olkkonen, K. Lehtinen, T. Erho, Flexographically Printed Fluidic Structures in Paper, *Anal Chem* 82 (2010) 10246–10250. <https://doi.org/10.1021/ac1027066>.

- [59] J. Hiltunen, C. Liedert, M. Hiltunen, O.-H. Huttunen, J. Hiitola-Keinänen, S. Aikio, M. Harjanne, M. Kurkinen, L. Hakalahti, L.P. Lee, Roll-to-roll fabrication of integrated PDMS–paper microfluidics for nucleic acid amplification, *Lab Chip* 18 (2018) 1552–1559. <https://doi.org/10.1039/C8LC00269J>.
- [60] V.F. Curto, N. Lopez-Ruiz, L.F. Capitan-Vallvey, A.J. Palma, F. Benito-Lopez, D. Diamond, Fast prototyping of paper-based microfluidic devices by contact stamping using indelible ink, *RSC Adv* 3 (2013) 18811–18816. <https://doi.org/10.1039/c3ra43825b>.
- [61] P. De Tarso Garcia, T.M. Garcia Cardoso, C.D. Garcia, E. Carrilho, W.K. Tomazelli Coltro, A handheld stamping process to fabricate microfluidic paper-based analytical devices with chemically modified surface for clinical assays, *RSC Adv* 4 (2014) 37637–37644. <https://doi.org/10.1039/c4ra07112c>.
- [62] T. Lam, J.P. Devadhasan, R. Howse, J. Kim, A Chemically Patterned Microfluidic Paper-based Analytical Device (C- μ PAD) for Point-of-Care Diagnostics, *Sci Rep* 7 (2017) 1188. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01343-w>.
- [63] L. Cai, C. Xu, S.H. Lin, J. Luo, M. Wu, F. Yang, A simple paper-based sensor fabricated by selective wet etching of silanized filter paper using a paper mask, *Biomicrofluidics* 8 (2014). <https://doi.org/10.1063/1.4898096>.
- [64] Y. Jiang, Z. Hao, Q. He, H. Chen, A simple method for fabrication of microfluidic paper-based analytical devices and on-device fluid control with a portable corona generator, *RSC Adv* 6 (2016) 2888–2894. <https://doi.org/10.1039/C5RA23470K>.
- [65] H. Lim, A.T. Jafry, J. Lee, Fabrication, flow control, and applications of microfluidic paper-based analytical devices, *Molecules* 24 (2019). <https://doi.org/10.3390/molecules24162869>.
- [66] E. Carrilho, A.W. Martinez, G.M. Whitesides, Understanding wax printing: A simple micropatterning process for paper-based microfluidics, *Anal Chem* 81 (2009) 7091–7095. <https://doi.org/10.1021/ac901071p>.
- [67] P.J. Lamas-Ardisana, G. Martínez-Paredes, L. Añorga, H.J. Grande, Glucose biosensor based on disposable electrochemical paper-based transducers fully fabricated by screen-printing, *Biosens Bioelectron* 109 (2018) 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.02.061>.
- [68] I. Ruiz-García, P. Escobedo, C.E. Ramos-Lorente, M.M. Erenas, L.F. Capitán-Vallvey, M.A. Carvajal, A.J. Palma, N. López-Ruiz, Capacitive platform for real-time wireless monitoring of liquid wicking in a paper strip, *Lab Chip* (2023). <https://doi.org/10.1039/D3LC00368J>.
- [69] N. Liu, J. Xu, H.-J. An, D.-T. Phan, M. Hashimoto, W.S. Lew, Direct spraying method for fabrication of paper-based microfluidic devices, *Journal of Micromechanics and Microengineering* 27 (2017) 104001. <https://doi.org/10.1088/1361-6439/aa82ce>.

- [70] T. Songjaroen, W. Dungchai, O. Chailapakul, W. Laiwattanapaisai, Novel, simple and low-cost alternative method for fabrication of paper-based microfluidics by wax dipping, *Talanta* 85 (2011) 2587–2593. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.08.024>.
- [71] J. Nie, Y. Zhang, L. Lin, C. Zhou, S. Li, L. Zhang, J. Li, Low-cost fabrication of paper-based microfluidic devices by one-step plotting, *Anal Chem* 84 (2012) 6331–6335. <https://doi.org/10.1021/ac203496c>.
- [72] E.M. Fenton, M.R. Mascarenas, G.P. López, S.S. Sibbett, Multiplex lateral-flow test strips fabricated by two-dimensional shaping, *ACS Appl Mater Interfaces* 1 (2009) 124–129. <https://doi.org/10.1021/am800043z>.
- [73] W. Liu, C.L. Cassano, X. Xu, Z.H. Fan, Laminated paper-based analytical devices (LPAD) with origami-enabled chemiluminescence immunoassay for cotinine detection in mouse serum, *Anal Chem* 85 (2013) 10270–10276. <https://doi.org/10.1021/ac402055n>.
- [74] G. Chitnis, Z. Ding, C.L. Chang, C.A. Savran, B. Ziaie, Laser-treated hydrophobic paper: An inexpensive microfluidic platform, in: *Lab Chip*, Royal Society of Chemistry, 2011: pp. 1161–1165. <https://doi.org/10.1039/c0lc00512f>.
- [75] S. Soares, C.E. Ramos-Lorente, I. Ruiz-García, F.R.P. Rocha, M.M. Erenas, I. de Orbe-Payá, N. López-Ruiz, L.F. Capitán-Vallvey, A cost-effective microfluidic device for determination of biodiesel content in diesel blends, *Sens Actuators B Chem* 390 (2023) 134033. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2023.134033>.
- [76] H. Liu, R.M. Crooks, Three-dimensional paper microfluidic devices assembled using the principles of origami, *J Am Chem Soc* 133 (2011) 17564–17566. <https://doi.org/10.1021/ja2071779>.
- [77] L. Ge, S. Wang, X. Song, S. Ge, J. Yu, 3D Origami-based multifunction-integrated immunodevice: Low-cost and multiplexed sandwich chemiluminescence immunoassay on microfluidic paper-based analytical device, *Lab Chip* 12 (2012) 3150–3158. <https://doi.org/10.1039/c2lc40325k>.
- [78] Q. He, C. Ma, X. Hu, H. Chen, Method for Fabrication of Paper-Based Microfluidic Devices by Alkylsilane Self-Assembling and UV/O₃-Patterning, *Anal Chem* 85 (2013) 1327–1331. <https://doi.org/10.1021/ac303138x>.
- [79] J. Nie, Y. Liang, Y. Zhang, S. Le, D. Li, S. Zhang, One-step patterning of hollow microstructures in paper by laser cutting to create microfluidic analytical devices, *Analyst* 138 (2013) 671–676. <https://doi.org/10.1039/c2an36219h>.
- [80] A.W. Martinez, S.T. Phillips, G.M. Whitesides, Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape, *PNAS* 105 (2018) 19606–19611. <https://doi.org/www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0810903105>.

- [81] C.M. Cheng, A.D. Mazzeo, J. Gong, A.W. Martinez, S.T. Phillips, N. Jain, G.M. Whitesides, Millimeter-scale contact printing of aqueous solutions using a stamp made out of paper and tape, *Lab Chip* 10 (2010) 3201–3205. <https://doi.org/10.1039/c004903d>.
- [82] Y. Koo, J. Sankar, Y. Yun, High performance magnesium anode in paper-based microfluidic battery, powering on-chip fluorescence assay, *Biomicrofluidics* 8 (2014) 054104. <https://doi.org/10.1063/1.4894784>.
- [83] T. Rosenfeld, M. Bercovici, Dynamic control of capillary flow in porous media by electroosmotic pumping, *Lab Chip* 19 (2019) 328–334. <https://doi.org/10.1039/C8LC01077C>.
- [84] X. Li, P. Zwanenburg, X. Liu, Magnetic timing valves for fluid control in paper-based microfluidics, *Lab Chip* 13 (2013) 2609–2614. <https://doi.org/10.1039/c3lc00006k>.
- [85] B.R. Lutz, P. Trinh, C. Ball, E. Fu, P. Yager, Two-dimensional paper networks: Programmable fluidic disconnects for multi-step processes in shaped paper, *Lab Chip* 11 (2011) 4274–4278. <https://doi.org/10.1039/c1lc20758j>.
- [86] R. Tang, N. Alam, M. Li, M. Xie, Y. Ni, Dissolvable sugar barriers to enhance the sensitivity of nitrocellulose membrane lateral flow assay for COVID-19 nucleic acid, *Carbohydr Polym* 268 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118259>.
- [87] S. Jahanshahi-Anbuhi, A. Henry, V. Leung, C. Sicard, K. Pennings, R. Pelton, J.D. Brennan, C.D.M. Filipe, Paper-based microfluidics with an erodible polymeric bridge giving controlled release and timed flow shutoff, *Lab Chip* 14 (2014) 229–236. <https://doi.org/10.1039/c3lc50762a>.
- [88] B. Lutz, T. Liang, E. Fu, S. Ramachandran, P. Kauffman, P. Yager, Dissolvable fluidic time delays for programming multi-step assays in instrument-free paper diagnostics, *Lab Chip* 13 (2013) 2840–2847. <https://doi.org/10.1039/c3lc50178g>.
- [89] D. Roy, J.N. Cambre, B.S. Sumerlin, Future perspectives and recent advances in stimuli-responsive materials, *Prog Polym Sci* 35 (2010) 278–301. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.10.008>.
- [90] S. Guragain, B.P. Bastakoti, V. Malgras, K. Nakashima, Y. Yamauchi, Multi-Stimuli-Responsive Polymeric Materials, *Chemistry - A European Journal* 21 (2015) 13164–13174. <https://doi.org/10.1002/chem.201501101>.
- [91] D.E. Bergbreiter, V.M. Mariagnanam, L. Zhang, Polymer ligands that can regulate reaction temperature in "smart" catalysts, *Advanced Materials* 7 (1995) 69–71. <https://doi.org/10.1002/adma.19950070116>.

-
- [92] S.K. Li, A. D'Emanuele, On-off transport through a thermoresponsive hydrogel composite membrane, *Journal of Controlled Release* 75 (2001) 55–67. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00365-0](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00365-0).
- [93] A. Kikuchi, T. Okano, Pulsatile drug release control using hydrogels, *Adv Drug Deliv Rev* 54 (2002) 53–77. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00243-5](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00243-5).
- [94] S.L.R. Barker, D. Ross, M.J. Tarlov, M. Gaitan, L.E. Locascio, Control of Flow Direction in Microfluidic Devices with Polyelectrolyte Multilayers, *Anal Chem* 72 (2000) 5925–5929. <https://doi.org/10.1021/ac0008690>.
- [95] F. Ullah, M.B.H. Othman, F. Javed, Z. Ahmad, H.M. Akil, Classification, processing and application of hydrogels: A review, *Materials Science and Engineering C* 57 (2015) 414–433. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.053>.
- [96] S. Khan, A. Ullah, K. Ullah, N.U. Rehman, Insight into hydrogels, *Des Monomers Polym* 19 (2016) 456–478. <https://doi.org/10.1080/15685551.2016.1169380>.
- [97] K.R. Kamath, K. Park, Biodegradable hydrogels in drug delivery, *Adv Drug Deliv Rev* 11 (1993) 59–84. [https://doi.org/10.1016/0169-409X\(93\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0169-409X(93)90027-2).
- [98] A.M. Lowman, N.A. Peppas, Analysis of the Complexation/Decomplexation Phenomena in Graft Copolymer Networks, 1997. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
- [99] M. Bahram, N. Mohseni, M. Moghtader, An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications, in: *Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels*, InTech, 2016. <https://doi.org/10.5772/64301>.
- [100] M.R. Islam, M.L. Oyen, Mechanical characterization of hydrogels, in: *The Mechanics of Hydrogels*, Elsevier, 2022: pp. 1–24. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102862-9.00014-2>.
- [101] E.M. Ahmed, Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, *J Adv Res* 6 (2015) 105–121. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>.
- [102] N. Srivastava, A.R. Choudhury, Stimuli-Responsive Polysaccharide-Based Smart Hydrogels and Their Emerging Applications, *Ind Eng Chem Res* 62 (2023) 841–866. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.2c02779>.
- [103] A.D. Jenkins, P. Kratochvíl, R.F.T. Stepto, U.W. Suter, Glossary of basic terms in polymer science (IUPAC Recommendations 1996), *Pure and Applied Chemistry* 68 (1996) 2287–2311. <https://doi.org/10.1351/pac199668122287>.
- [104] N. Zoratto, P. Matricardi, Semi-IPN- and IPN-Based Hydrogels, in: 2018: pp. 155–188. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76735-2_7.
- [105] A. Patel, K. Mequanint, Hydrogel Biomaterials, in: *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges*, InTech, 2011. <https://doi.org/10.5772/24856>.

- [106] M. Concilio, V.P. Beyer, C.R. Becer, Thermoresponsive polymers in non-aqueous solutions, *Polym Chem* 13 (2022) 6423–6474. <https://doi.org/10.1039/d2py01147f>.
- [107] L. Serra, J. Doménech, N.A. Peppas, Drug transport mechanisms and release kinetics from molecularly designed poly(acrylic acid-g-ethylene glycol) hydrogels, *Biomaterials* 27 (2006) 5440–5451. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.06.011>.
- [108] N. Kashyap, N. Kumar, M.N.V.R. Kumar, Hydrogels for Pharmaceutical and Biomedical Applications, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 22 (2005) 107–150. <https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v22.i2.10>.
- [109] M. Behl, J. Zotzmann, A. Lendlein, Shape-Memory Polymers and Shape-Changing Polymers, in: 2009: pp. 1–40. https://doi.org/10.1007/12_2009_26.
- [110] Y. Wang, S. Xu, T. Chen, H. Guo, Q. Liu, B. Ye, Z. Zhang, Z. He, S. Cao, Synthesis and preliminary photovoltaic behavior study of a soluble polyimide containing ruthenium complexes, *Polym Chem* 1 (2010) 1048. <https://doi.org/10.1039/c0py00096e>.
- [111] J. Kopeček, J. Yang, Peptide-directed self-assembly of hydrogels, *Acta Biomater* 5 (2009) 805–816. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.10.001>.
- [112] J. Kopeček, Smart and genetically engineered biomaterials and drug delivery systems, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 20 (2003) 1–16. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(03\)00164-7](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(03)00164-7).
- [113] T. Miyata, N. Asami, T. Uragami, A reversibly antigen-responsive hydrogel, *Nature* 399 (1999) 766–769. <https://doi.org/10.1038/21619>.
- [114] T. Miyata, T. Uragami, K. Nakamae, Biomolecule-sensitive hydrogels, *Adv Drug Deliv Rev* 54 (2002) 79–98. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00241-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00241-1).
- [115] A.J. DeFail, C.R. Chu, N. Izzo, K.G. Marra, Controlled release of bioactive TGF- β 1 from microspheres embedded within biodegradable hydrogels, *Biomaterials* 27 (2006) 1579–1585. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.08.013>.
- [116] T.G. Park, A.S. Hoffman, Immobilization of *Arthrobacter simplex* in a thermally reversible hydrogel: Effect of temperature cycling on steroid conversion, *Biotechnol Bioeng* 35 (1990) 152–159. <https://doi.org/10.1002/bit.260350207>.
- [117] H.L. Abd El-Mohdy, A. Safrany, Preparation of fast response superabsorbent hydrogels by radiation polymerization and crosslinking of N-isopropylacrylamide in solution, *Radiation Physics and Chemistry* 77 (2008) 273–279. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2007.05.006>.
- [118] D.J. Overstreet, R.Y. McLemore, B.D. Doan, A. Farag, B.L. Vernon, Temperature-Responsive Graft Copolymer Hydrogels for Controlled Swelling and Drug Delivery, *Soft Mater* 11 (2013) 294–304. <https://doi.org/10.1080/1539445X.2011.640731>.

- [119] Y.Y. Kim, B.Y. Lee, J.K. Kim, Evaluation of fiber dispersion of PVA-ECC., (2008).
- [120] G.-B. Jiang, Z.-T. Lin, X.-Y. Huang, Y.-Q. Zheng, C.-C. Ren, C.-K. Huang, Z.-J. Huang, Potential biosorbent based on sugarcane bagasse modified with tetraethylenepentamine for removal of eosin Y, *Int J Biol Macromol* 50 (2012) 707–712. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.12.030>.
- [121] M. Dalaran, S. Emik, G. Güçlü, T.B. İyim, S. Özgümüş, Study on a novel polyampholyte nanocomposite superabsorbent hydrogels: Synthesis, characterization and investigation of removal of indigo carmine from aqueous solution, *Desalination* 279 (2011) 170–182. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.06.004>.
- [122] A. Guiseppi-Elie, Electroconductive hydrogels: Synthesis, characterization and biomedical applications, *Biomaterials* 31 (2010) 2701–2716. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.12.052>.
- [123] Z. Yue, S.E. Moulton, M. Cook, S. O’Leary, G.G. Wallace, Controlled delivery for neuro-bionic devices, *Adv Drug Deliv Rev* 65 (2013) 559–569. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.06.002>.
- [124] X. Zeng, H. Jiang, Liquid tunable microlenses based on MEMS techniques, *J Phys D Appl Phys* 46 (2013) 323001. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/46/32/323001>.
- [125] G.R. Hendrickson, M.H. Smith, A.B. South, L.A. Lyon, Design of Multiresponsive Hydrogel Particles and Assemblies, *Adv Funct Mater* 20 (2010) 1697–1712. <https://doi.org/10.1002/adfm.200902429>.
- [126] C. Schmitt, S.L. Turgeon, Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems, *Adv Colloid Interface Sci* 167 (2011) 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.10.001>.
- [127] V.B. Patravale, S.D. Mandawgade, Novel cosmetic delivery systems: an application update, *Int J Cosmet Sci* 30 (2008) 19–33. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2008.00416.x>.
- [128] J. Bobacka, Electrochemical sensors for real-world applications, *Journal of Solid State Electrochemistry* 24 (2020) 2039–2040. <https://doi.org/10.1007/s10008-020-04700-4>.
- [129] F.R. Simões, M.G. Xavier, Electrochemical Sensors, in: *Nanoscience and Its Applications*, Elsevier, 2017: pp. 155–178. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-49780-0.00006-5>.
- [130] C.I.L. Justino, T.A. Rocha-Santos, A.C. Duarte, Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 29 (2010) 1172–1183. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.07.008>.

- [131] A. Hulanicki, S. Geab, F. Ingman, International union of pure and applied chemistry analytical chemistry division commission on general aspects of analytical chemistry: Chemical sensors definitions and classification., 1991.
- [132] H.H. Qazi, A.B. Bin Mohammad, M. Akram, Recent progress in optical chemical sensors, *Sensors (Switzerland)* 12 (2012) 16522–16556. <https://doi.org/10.3390/s121216522>.
- [133] A.D. Tjandra, J.Y.H. Chang, S. Ladame, R. Chandrawati, Optical sensors, in: *Bioengineering Innovative Solutions for Cancer*, Elsevier, 2020: pp. 23–45. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813886-1.00003-6>.
- [134] F. Caroleo, G. Magna, M.L. Naitana, L. Di Zazzo, R. Martini, F. Pizzoli, M. Muduganti, L. Lvova, F. Mandoj, S. Nardis, M. Stefanelli, C. Di Natale, R. Paolesse, *Advances in Optical Sensors for Persistent Organic Pollutant Environmental Monitoring*, *Sensors* 22 (2022). <https://doi.org/10.3390/s22072649>.
- [135] G. Sriram, M.P. Bhat, P. Patil, U.T. Uthappa, H.-Y. Jung, T. Altalhi, T. Kumeria, T.M. Aminabhavi, R.K. Pai, Madhuprasad, M.D. Kurkuri, Paper-based microfluidic analytical devices for colorimetric detection of toxic ions: A review, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 93 (2017) 212–227. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.06.005>.
- [136] L.F. Capitán-Vallvey, N. López-Ruiz, A. Martínez-Olmos, M.M. Erenas, A.J. Palma, Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review, *Anal Chim Acta* 899 (2015) 23–56. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.009>.
- [137] R. Cote, Photoreceptor Phosphodiesterase (PDE6), in: *Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases in Health and Disease*, CRC Press, 2006. <https://doi.org/10.1201/9781420020847.ch8>.
- [138] L.L.A. Price, P. Blattner, Circadian and visual photometry, in: 2022: pp. 1–11. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2022.02.014>.
- [139] M. Saltzman, F.W. Billmeyer, *Principles of color technology*, 2nd ed., Wiley Interscience, 2000.
- [140] S.K. Shevell, *Optical Society of America., The science of color*, Elsevier, 2003.
- [141] K. Abe, K. Suzuki, D. Citterio, Inkjet-Printed Microfluidic Multianalyte Chemical Sensing Paper, *Anal Chem* 80 (2008) 6928–6934. <https://doi.org/10.1021/ac800604v>.
- [142] Yu.L. Shishkin, S.G. Dmitrienko, O.M. Medvedeva, S.A. Badakova, L.N. Pyatkova, Use of a Scanner and Digital Image-Processing Software for the Quantification of Adsorbed Substances, *Journal of Analytical Chemistry* 59 (2004) 102–106. <https://doi.org/10.1023/B:JANC.0000014733.32082.4b>.

- [143] D. Filippini, K. Tejle, I. Lundstrom, ELISA test for anti-neutrophil cytoplasm antibodies detection evaluated by a computer screen photo-assisted technique, *Biosens Bioelectron* 21 (2005) 266–272. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.09.033>.
- [144] A.R. Tôrres, W. da Silva Lyra, S.I.E. de Andrade, R.A.N. Andrade, E.C. da Silva, M.C.U. Araújo, E. da Nóbrega Gaião, A digital image-based method for determining of total acidity in red wines using acid–base titration without indicator, *Talanta* 84 (2011) 601–606. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.02.002>.
- [145] A. Safavi, N. Maleki, A. Rostamzadeh, S. Maesum, CCD camera full range pH sensor array, *Talanta* 71 (2007) 498–501. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.04.030>.
- [146] S.M.Z. Hossain, R.E. Luckham, A.M. Smith, J.M. Lebert, L.M. Davies, R.H. Pelton, C.D.M. Filipe, J.D. Brennan, Development of a Bioactive Paper Sensor for Detection of Neurotoxins Using Piezoelectric Inkjet Printing of Sol–Gel-Derived Bioinks, *Anal Chem* 81 (2009) 5474–5483. <https://doi.org/10.1021/ac900660p>.
- [147] N. Maleki, Single-step calibration, prediction and real samples data acquisition for artificial neural network using a CCD camera, *Talanta* 64 (2004) 830–835. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.02.041>.
- [148] H.P. Ninh, Y. Tanaka, T. Nakamoto, K. Hamada, A bad-smell sensing network using gas detector tubes and mobile phone cameras, *Sens Actuators B Chem* 125 (2007) 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2007.01.049>.
- [149] Y. Michikawa, T. Suga, A. Ishikawa, H. Hayashi, A. Oka, H. Inoko, M. Iwakawa, T. Imai, Genome wide screen identifies microsatellite markers associated with acute adverse effects following radiotherapy in cancer patients, *BMC Med Genet* 11 (2010) 123. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-11-123>.
- [150] P.J.R. Roche, S. Filion-Côté, M.C.-K. Cheung, V.P. Chodavarapu, A.G. Kirk, A Camera Phone Localised Surface Plasmon Biosensing Platform towards Low-Cost Label-Free Diagnostic Testing, *J Sens* 2011 (2011) 1–7. <https://doi.org/10.1155/2011/406425>.
- [151] S.C. Kishore, K. Samikannu, R. Atchudan, S. Perumal, T.N.J. Immanuel Edison, M. Alagan, A.K. Sundramoorthy, Y.R. Lee, Smartphone-Operated Wireless Chemical Sensors: A Review, *Chemosensors* 10 (2022). <https://doi.org/10.3390/chemosensors10020055>.
- [152] S. Lee, V. Oncescu, M. Mancuso, S. Mehta, D. Erickson, A smartphone platform for the quantification of vitamin D levels, *Lab Chip* 14 (2014) 1437–1442. <https://doi.org/10.1039/C3LC51375K>.
- [153] M. Zangheri, L. Cevenini, L. Anfossi, C. Baggiani, P. Simoni, F. Di Nardo, A. Roda, A simple and compact smartphone accessory for quantitative chemiluminescence-

- based lateral flow immunoassay for salivary cortisol detection, *Biosens Bioelectron* 64 (2015) 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.08.048>.
- [154] S.C. Kim, U.M. Jalal, S.B. Im, S. Ko, J.S. Shim, A smartphone-based optical platform for colorimetric analysis of microfluidic device, *Sens Actuators B Chem* 239 (2017) 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.07.159>.
- [155] Y. Wu, A. Boonloed, N. Sleszynski, M. Koesdjojo, C. Armstrong, S. Bracha, V.T. Remcho, Clinical chemistry measurements with commercially available test slides on a smartphone platform: Colorimetric determination of glucose and urea, *Clinica Chimica Acta* 448 (2015) 133–138. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.05.020>.
- [156] M. Mancuso, E. Cesarman, D. Erickson, Detection of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus nucleic acids using a smartphone accessory, *Lab Chip* 14 (2014) 3809–3816. <https://doi.org/10.1039/C4LC00517A>.
- [157] J.E. Smith, D.K. Griffin, J.K. Leny, J.A. Hagen, J.L. Chávez, N. Kelley-Loughnane, Colorimetric detection with aptamer-gold nanoparticle conjugates coupled to an android-based color analysis application for use in the field, *Talanta* 121 (2014) 247–255. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.12.062>.
- [158] H. Wang, Y. Li, J. Wei, J. Xu, Y. Wang, G. Zheng, Paper-based three-dimensional microfluidic device for monitoring of heavy metals with a camera cell phone, *Anal Bioanal Chem* 406 (2014) 2799–2807. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7715-x>.
- [159] A. Choodum, P. Kanatharana, W. Wongniramaikul, N. Nic Daeid, Using the iPhone as a device for a rapid quantitative analysis of trinitrotoluene in soil, *Talanta* 115 (2013) 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.04.037>.
- [160] G. Xing, J. Ai, N. Wang, Q. Pu, Recent progress of smartphone-assisted microfluidic sensors for point of care testing, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 157 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116792>.
- [161] D. Pascale, A Review of RGB Color Spaces, n.d.
- [162] A. Hård, L. Sivik, G. Tonnquist, NCS, natural color system-from concept to research and applications. Part I, *Color Res Appl* 21 (1996) 180–205. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6378\(199606\)21:3<180::AID-COL2>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6378(199606)21:3<180::AID-COL2>3.0.CO;2-O).
- [163] S. Naji, H.A. Jalab, S.A. Kareem, A survey on skin detection in colored images, *Artif Intell Rev* 52 (2019) 1041–1087. <https://doi.org/10.1007/s10462-018-9664-9>.
- [164] F. Pammolli, L. Magazzini, M. Riccaboni, The productivity crisis in pharmaceutical R&D, *Nat Rev Drug Discov* 10 (2011) 428–438. <https://doi.org/10.1038/nrd3405>.
- [165] Y. Manmana, B. Chutvirasakul, L. Suntornsuk, N. Nuchtavorn, Cost effective paper-based colorimetric devices for a simple assay of dopamine in pharmaceutical

- formulations using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine – silver nitrate as a chromogenic reagent, *Pharmaceutical Sciences Asia* 46 (2019) 270–277. <https://doi.org/10.29090/psa.2019.04.018.0037>.
- [166] P.N. Newton, M.D. Green, F.M. Fernández, N.P. Day, N.J. White, Counterfeit anti-infective drugs, *Lancet Infect Dis* 6 (2006) 602–613. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70581-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70581-3).
- [167] K.E. Boehle, C.S. Carrell, J. Caraway, C.S. Henry, Paper-Based Enzyme Competition Assay for Detecting Falsified β -Lactam Antibiotics, *ACS Sens* 3 (2018) 1299–1307. <https://doi.org/10.1021/acssensors.8b00163>.
- [168] G. Musile, C. Grazioli, S. Fornasaro, N. Dossi, E.F. De Palo, F. Tagliaro, F. Bortolotti, Application of Paper-Based Microfluidic Analytical Devices (μ PAD) in Forensic and Clinical Toxicology: A Review, *Biosensors (Basel)* 13 (2023) 743. <https://doi.org/10.3390/bios13070743>.
- [169] A. Saadati, F. Farshchi, M. Hasanzadeh, Y. Liu, F. Seidi, Colorimetric and naked-eye detection of arsenic(As^{3+}) using a paper-based microfluidic device decorated with silver nanoparticles, *RSC Adv* 12 (2022) 21836–21850. <https://doi.org/10.1039/D2RA02820D>.
- [170] J. Wang, L. Yang, B. Liu, H. Jiang, R. Liu, J. Yang, G. Han, Q. Mei, Z. Zhang, Inkjet-Printed Silver Nanoparticle Paper Detects Airborne Species from Crystalline Explosives and Their Ultratrace Residues in Open Environment, *Anal Chem* 86 (2014) 3338–3345. <https://doi.org/10.1021/ac403409q>.
- [171] S.H. Nam, Y.J. An, Paper-disc method: An efficient assay for evaluating metal toxicity to soil algae, *Environmental Pollution* 216 (2016) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.061>.
- [172] R.S.J. Alkadir, A. Rossner, S. Andreescu, Portable Colorimetric Paper-Based Biosensing Device for the Assessment of Bisphenol A in Indoor Dust, *Environ Sci Technol* 49 (2015) 9889–9897. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01588>.
- [173] A. Apilux, C.I.N. Ayudhya, T. Tantimongcolwat, V. Prachayasittikul, Paper-based acetylcholinesterase inhibition assay combining a wet system for organophosphate and carbamate pesticides detection, *EXCLI J* 14 (2015) 307–319. <https://doi.org/10.17179/excli2014-684>.
- [174] A. Maity, A.K. Raychaudhuri, B. Ghosh, High sensitivity NH_3 gas sensor with electrical readout made on paper with perovskite halide as sensor material, *Sci Rep* 9 (2019) 7777. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43961-6>.
- [175] H. Kan, M. Li, J. Luo, B. Zhang, J. Liu, Z. Hu, G. Zhang, S. Jiang, H. Liu, PbS Nanowires-on-Paper Sensors for Room-Temperature Gas Detection, *IEEE Sens J* 19 (2019) 846–851. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2018.2879895>.

- [176] A. Quddious, S. Yang, M. Khan, F. Tahir, A. Shamim, K. Salama, H. Cheema, Disposable, Paper-Based, Inkjet-Printed Humidity and H₂S Gas Sensor for Passive Sensing Applications, *Sensors* 16 (2016) 2073. <https://doi.org/10.3390/s16122073>.
- [177] D. Schaefer, W.M. Cheung, Smart Packaging: Opportunities and Challenges, *Procedia CIRP* 72 (2018) 1022–1027. <https://doi.org/10.1016/j.procir.2018.03.240>.
- [178] C. Grazioli, G. Faura, N. Dossi, R. Toniolo, F. Tubaro, F. Terzi, G. Bontempelli, A colorimetric paper-based smart label soaked with a deep-eutectic solvent for the detection of malondialdehyde, *Sens Actuators B Chem* 329 (2021) 129174. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.129174>.
- [179] N. Aliabbasi, M. Fathi, Z. Emam-Djomeh, Curcumin: A promising bioactive agent for application in food packaging systems, *J Environ Chem Eng* 9 (2021) 105520. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105520>.
- [180] S. Mukherjee, S. Suleman, R. Pilloton, J. Narang, K. Rani, State of the Art in Smart Portable, Wearable, Ingestible and Implantable Devices for Health Status Monitoring and Disease Management, *Sensors* 22 (2022). <https://doi.org/10.3390/s22114228>.
- [181] J.R. Windmiller, J. Wang, Wearable Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review, *Electroanalysis* 25 (2013) 29–46. <https://doi.org/10.1002/elan.201200349>.
- [182] A.M.V. Mohan, V. Rajendran, R.K. Mishra, M. Jayaraman, Recent advances and perspectives in sweat based wearable electrochemical sensors, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 131 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116024>.
- [183] P. Kassal, M. Zubak, G. Scheipl, G.J. Mohr, M.D. Steinberg, I. Murković Steinberg, Smart bandage with wireless connectivity for optical monitoring of pH, *Sens Actuators B Chem* 246 (2017) 455–460. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.02.095>.
- [184] S. Bian, B. Zhu, G. Rong, M. Sawan, Towards wearable and implantable continuous drug monitoring: A review, *J Pharm Anal* 11 (2021) 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.08.001>.
- [185] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 50 (2013) 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>.
- [186] L.P. Murray, C.R. Mace, Usability as a guiding principle for the design of paper-based, point-of-care devices – A review, *Anal Chim Acta* 1140 (2020) 236–249. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.09.063>.

- [187] F.W. Kimani, S.M. Mwangi, B.J. Kwasa, A.M. Kusow, B.K. Ngugi, J. Chen, X. Liu, R. Cademartiri, M.M. Thuo, Rethinking the design of low-cost point-of-care diagnostic devices, *Micromachines* (Basel) 8 (2017). <https://doi.org/10.3390/mi8110317>.
- [188] T.L. Rogers, C.L. Ostrow, The use of EMLA cream to decrease venipuncture pain in children, *J Pediatr Nurs* 19 (2004) 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.pedn.2003.09.005>.
- [189] A.P. Wong, M. Gupta, S.S. Shevkopyas, G.M. Whitesides, Egg beater as centrifuge: Isolating human blood plasma from whole blood in resource-poor settings, *Lab Chip* 8 (2008) 2032–2037. <https://doi.org/10.1039/b809830c>.
- [190] A.L. Horst, J.M. Rosenbohm, N. Kolluri, J. Hardick, C.A. Gaydos, M. Cabodi, C.M. Klapperich, J.C. Linnes, A paperfluidic platform to detect *Neisseria gonorrhoeae* in clinical samples, *Biomed Microdevices* 20 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10544-018-0280-x>.
- [191] H. İlhan, B. Guven, U. Dogan, H. Torul, S. Evran, D. Çetin, Z. Suludere, N. Sağlam, İ.H. Boyacı, U. Tamer, The coupling of immunomagnetic enrichment of bacteria with paper-based platform, *Talanta* 201 (2019) 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.04.017>.
- [192] Applying Human Factors and Usability Engineering to Medical Devices Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff Preface Public Comment, 2000. <https://www.regulations.gov/docket/FDA-2011-D-0469> (accessed May 22, 2023).
- [193] S. Smith, J.G. Korvink, D. Mager, K. Land, The potential of paper-based diagnostics to meet the ASSURED criteria, *RSC Adv* 8 (2018) 34012–34034. <https://doi.org/10.1039/C8RA06132G>.
- [194] L. Shen, J.A. Hagen, I. Papautsky, Point-of-care colorimetric detection with a smartphone, *Lab Chip* 12 (2012) 4240–4243. <https://doi.org/10.1039/c2lc40741h>.
- [195] A. Agrawal, Ü.Y. Yıldız, C.G. Hussain, S.K. Kailasa, R. Keçili, C.M. Hussain, Greenness of lab-on-a-chip devices for analytical processes: Advances & future prospects, *J Pharm Biomed Anal* 219 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114914>.
- [196] W.K. Tomazelli Coltro, C.M. Cheng, E. Carrilho, D.P. de Jesus, Recent advances in low-cost microfluidic platforms for diagnostic applications, *Electrophoresis* 35 (2014) 2309–2324. <https://doi.org/10.1002/elps.201400006>.
- [197] A. Nilghaz, L. Guan, W. Tan, W. Shen, Advances of Paper-Based Microfluidics for Diagnostics - The Original Motivation and Current Status, *ACS Sens* 1 (2016) 1382–1393. <https://doi.org/10.1021/acssensors.6b00578>.

- [198] D.R. Ballerini, X. Li, W. Shen, Patterned paper and alternative materials as substrates for low-cost microfluidic diagnostics, *Microfluid Nanofluidics* 13 (2012) 769–787. <https://doi.org/10.1007/s10404-012-0999-2>.
- [199] X. Weng, Y. Kang, Q. Guo, B. Peng, H. Jiang, Recent advances in thread-based microfluidics for diagnostic applications, *Biosens Bioelectron* 132 (2019) 171–185. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.03.009>.
- [200] S. Yadav, N.N. Sharma, J. Akhtar, Paper for microfluidics: Selection criteria, in: *AIP Conf Proc*, American Institute of Physics Inc., 2020. <https://doi.org/10.1063/5.0031966>.
- [201] M.C. Riva, D. López, Impacto ambiental de los efluentes del proceso de blanqueo de algodón: parámetros químicos y biológicos, 2001.
- [202] W.C. Smith, Commentary/overview of textile coating and lamination, in: *Smart Textile Coatings and Laminates*, Elsevier, 2018: pp. 3–10. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102428-7.00001-8>.
- [203] C.M. Wang, C.Y. Chen, W.S. Liao, Enclosed paper-based analytical devices: Concept, variety, and outlook, *Anal Chim Acta* 1144 (2021) 158–174. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.10.007>.
- [204] M. Sauer, S. Meilchen, A. Kalleder, M. Mennig, H. Schmidt, Screen printing, in: *Springer Science, Business Media (Eds.), Sol-Gel Technologies for Glass Producers and Users*, New York, 2004: pp. 117–122.
- [205] D. Novaković, N. Kašiković, G. Vladić, M. Pál, Screen Printing, in: *Printing on Polymers: Fundamentals and Applications*, Elsevier Inc., 2015: pp. 247–261. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-37468-2.00015-4>.
- [206] A.G. Emslie, F.T. Bonner, L.G. Peck, Flow of a viscous liquid on a rotating disk, *J Appl Phys* 29 (1958) 858–862. <https://doi.org/10.1063/1.1723300>.
- [207] C.J. Lawrence, W. Zhou, Spin coating of non-Newtonian fluids, 1991.
- [208] N. Sahu, B. Parija, S. Panigrahi, Fundamental understanding and modeling of spin coating process: A review, in: *Indian Journal of Physics*, Scientific Publishers, 2009: pp. 493–502. <https://doi.org/10.1007/s12648-009-0009-z>.
- [209] R.D. Deegan, O. Bakajin, T.F. Dupont, G. Huber, S.R. Nagel, T.A. Witten, Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops, *Nature* 389 (1997) 827–829. <https://doi.org/10.1038/39827>.
- [210] D.P. Birnie, Spin Coating Technique, in: *Sol-Gel Technologies for Glass Producers and Users*, Springer US, Boston, MA, 2004: pp. 49–55. https://doi.org/10.1007/978-0-387-88953-5_4.
- [211] L.E. SCRIVEN, C. V. STERNLING, The Marangoni Effects, *Nature* 187 (1960) 186–188. <https://doi.org/10.1038/187186a0>.

- [212] M. Noeske, J. Degenhardt, S. Strudthoff, U. Lommatzsch, Plasma jet treatment of five polymers at atmospheric pressure: Surface modifications and the relevance for adhesion, *Int J Adhes Adhes* 24 (2004) 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2003.09.006>.
- [213] E. Lepore, P. Faraldi, D. Bongini, L. Boarino, N. Pugno, Plasma and thermoforming treatments to tune the bio-inspired wettability of polystyrene, *Compos B Eng* 43 (2012) 681–690. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2011.05.028>.
- [214] J. Izdebska, Corona Treatment, in: *Printing on Polymers: Fundamentals and Applications*, Elsevier Inc., 2015: pp. 123–142. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-37468-2.00008-7>.
- [215] V.C. Louzi, J.S. de C. Campos, Corona treatment applied to synthetic polymeric monofilaments (PP, PET, and PA-6), *Surfaces and Interfaces* 14 (2019) 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2018.12.005>.
- [216] K.S. Johansson, Surface Modification of Plastics, in: *Applied Plastics Engineering Handbook: Processing, Materials, and Applications: Second Edition*, Elsevier Inc., Stockholm, 2017: pp. 443–487. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39040-8.00020-1>.
- [217] T. Ching, Y. Li, R. Karyappa, A. Ohno, Y.C. Toh, M. Hashimoto, Fabrication of integrated microfluidic devices by direct ink writing (DIW) 3D printing, *Sens Actuators B Chem* 297 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.05.086>.
- [218] S.Z. Guo, K. Qiu, F. Meng, S.H. Park, M.C. McAlpine, 3D Printed Stretchable Tactile Sensors, *Advanced Materials* 29 (2017). <https://doi.org/10.1002/adma.201701218>.
- [219] E.H. Tümer, H.Y. Erbil, Extrusion-based 3d printing applications of pla composites: A review, *Coatings* 11 (2021). <https://doi.org/10.3390/coatings11040390>.
- [220] S. Park, W. Shou, L. Makatura, W. Matusik, K. (Kelvin) Fu, 3D printing of polymer composites: Materials, processes, and applications, *Matter* 5 (2022) 43–76. <https://doi.org/10.1016/j.matt.2021.10.018>.
- [221] J. De Jong, R.G.H. Lammertink, M. Wessling, Membranes and microfluidics: A review, *Lab Chip* 6 (2006) 1125–1139. <https://doi.org/10.1039/b603275c>.
- [222] M.E. Díaz-García, R.B. Laíño, Molecular imprinting in sol-gel materials: Recent developments and applications, *Microchimica Acta* 149 (2005) 19–36. <https://doi.org/10.1007/s00604-004-0274-7>.
- [223] L. Lebrun, J.F. Blanco, M. Métayer, Preparation of ion-exchange membranes using pullulan as polymer matrix, *Carbohydr Polym* 61 (2005) 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2002.10.001>.
- [224] H. Okuno, T. Uragami, Characteristics of permeation and separation of aqueous alcohol solutions through crosslinked pullulan membranes, 1992.

- [225] S. Li, J. Yi, X. Yu, Z. Wang, L. Wang, Preparation and characterization of pullulan derivative antibacterial composite films, *Materials Science and Engineering C* 110 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110721>.
- [226] S. Jahanshahi-Anbuhi, K. Pennings, V. Leung, M. Liu, C. Carrasquilla, B. Kannan, Y. Li, R. Pelton, J.D. Brennan, C.D.M. Filipe, Pullulan encapsulation of labile biomolecules to give stable bioassay tablets, *Angewandte Chemie - International Edition* 53 (2014) 6155–6158. <https://doi.org/10.1002/anie.201403222>.
- [227] B. Kannan, S. Jahanshahi-Anbuhi, R.H. Pelton, Y. Li, C.D.M. Filipe, J.D. Brennan, Printed Paper Sensors for Serum Lactate Dehydrogenase using Pullulan-Based Inks to Immobilize Reagents, *Anal Chem* 87 (2015) 9288–9293. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01923>.
- [228] Y.D. Li, W.Y. Li, H.H. Chai, C. Fang, Y.J. Kang, C.M. Li, L. Yu, Chitosan functionalization to prolong stable hydrophilicity of cotton thread for thread-based analytical device application, *Cellulose* 25 (2018) 4831–4840. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-1891-3>.
- [229] C. Oliver Urrutia, R. Rosales-Ibáñez, M.V. Dominguez García, J. Flores-Estrada, M. V Flores-Merino, Synthesis and assessment of poly(acrylic acid)/polyvinylpyrrolidone interpenetrating network as a matrix for oral mucosa cells, *J Biomater Appl* 34 (2020) 998–1008. <https://doi.org/10.1177/0885328219883482>.
- [230] C. Boztepe, A. Künkül, M. Yüceer, Application of artificial intelligence in modeling of the doxorubicin release behavior of pH and temperature responsive poly(NIPAAm-co-AAc)-PEG IPN hydrogel, *J Drug Deliv Sci Technol* 57 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101603>.
- [231] C.R.F. Junior, R. da S. Fernandes, M.R. de Moura, F.A. Aouada, On the preparation and physicochemical properties of pH-responsive hydrogel nanocomposite based on poly(acid methacrylic)/laponite RDS, *Mater Today Commun* 23 (2020) 100936. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.100936>.
- [232] H.J. Zhang, F. Luo, Y. Ye, T.L. Sun, T. Nonoyama, T. Kurokawa, T. Nakajima, Tough Triblock Copolymer Hydrogels with Different Micromorphologies for Medical and Sensory Materials, *ACS Appl Polym Mater* 1 (2019) 1948–1953. <https://doi.org/10.1021/acsapm.9b00395>.
- [233] K.M. Lee, Y. Oh, H. Yoon, M. Chang, H. Kim, Multifunctional Role of MoS₂ in Preparation of Composite Hydrogels: Radical Initiation and Cross-Linking, *ACS Appl Mater Interfaces* 12 (2020) 8642–8649. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b19567>.
- [234] D. Li, H. Gao, M. Li, G. Chen, L. Guan, M. He, J. Tian, R. Cao, Nanochitin/metal ion dual reinforcement in synthetic polyacrylamide network-based nanocomposite

- hydrogels, Carbohydr Polym 236 (2020) 116061. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116061>.
- [235] J. Liang, J.J. Struckhoff, H. Du, P.D. Hamilton, N. Ravi, Synthesis and characterization of in situ forming anionic hydrogel as vitreous substitutes, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 105 (2017) 977–988. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33632>.
- [236] P.I. Sepulveda-Medina, C. Wang, R. Li, M. Fukuto, R.A. Weiss, B.D. Vogt, Kinetically controlled morphology in copolymer-based hydrogels crosslinked by crystalline nanodomains determines efficacy of ice inhibition, *Mol Syst Des Eng* 5 (2020) 645–655. <https://doi.org/10.1039/C9ME00101H>.
- [237] S. Jana, S. Jana, eds., *Interpenetrating Polymer Network: Biomedical Applications*, Springer Singapore, Singapore, 2020. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-0283-5>.
- [238] T. Jayaramudu, K. Varaprasad, E.R. Sadiku, J. Amalraj, Temperature-sensitive semi-IPN composite hydrogels for antibacterial applications, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 572 (2019) 307–316. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.04.012>.
- [239] Y. Meng, J. Cao, Y. Chen, Y. Yu, L. Ye, 3D printing of a poly(vinyl alcohol)-based nanocomposite hydrogel as an artificial cartilage replacement and the improvement mechanism of printing accuracy, *J Mater Chem B* 8 (2020) 677–690. <https://doi.org/10.1039/C9TB02278C>.
- [240] Z. Sadakbayeva, M. Dušková-Smrčková, A. Šturcová, J. Pflieger, K. Dušek, Microstructured poly(2-hydroxyethyl methacrylate)/poly(glycerol monomethacrylate) interpenetrating network hydrogels: UV-scattering induced accelerated formation and tensile behavior, *Eur Polym J* 101 (2018) 304–313. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.02.035>.
- [241] T. Nakajima, Generalization of the sacrificial bond principle for gel and elastomer toughening, *Polym J* 49 (2017) 477–485. <https://doi.org/10.1038/pj.2017.12>.
- [242] K. Brewer, B. Gundsambuu, P. Facal Marina, S.C. Barry, A. Blencowe, Thermoresponsive Poly(ϵ -Caprolactone)-Poly(Ethylene/Propylene Glycol) Copolymers as Injectable Hydrogels for Cell Therapies, *Polymers (Basel)* 12 (2020) 367. <https://doi.org/10.3390/polym12020367>.
- [243] O.I. Timaeva, G.M. Kuz'micheva, I.I. Pashkin, O. Czakkel, S. Prevost, Structure and dynamics of titania – poly(N-vinyl caprolactam) composite hydrogels, *Soft Matter* 16 (2020) 219–228. <https://doi.org/10.1039/C9SM01619H>.
- [244] B. Taşdelen, Preparation and characterization of conducting hydrogels composite made of polyaniline, polyacrylamide and kaolin, *Mater Today Proc* 5 (2018) 15983–15989. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.05.042>.

- [245] R.D. Pyarasani, T. Jayaramudu, A. John, Polyaniline-based conducting hydrogels, *J Mater Sci* 54 (2019) 974–996. <https://doi.org/10.1007/s10853-018-2977-x>.
- [246] Y.-M. Ha, Y.N. Kim, Y.C. Jung, Rapid and Local Self-Healing Ability of Polyurethane Nanocomposites Using Photothermal Polydopamine-Coated Graphene Oxide Triggered by Near-Infrared Laser, *Polymers (Basel)* 13 (2021) 1274. <https://doi.org/10.3390/polym13081274>.
- [247] W.E. Hennink, C.F. van Nostrum, Novel crosslinking methods to design hydrogels, *Adv Drug Deliv Rev* 64 (2012) 223–236. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.009>.
- [248] U.S.K. Madduma-Bandarage, S. V. Madihally, Synthetic hydrogels: Synthesis, novel trends, and applications, *J Appl Polym Sci* 138 (2021). <https://doi.org/10.1002/app.50376>.
- [249] T. Akyazi, J. Saez, A. Tudor, C. Delaney, W. Francis, D. Diamond, L. Basabe-Desmonts, L. Florea, F. Benito-Lopez, CHAPTER X Application of Ionic Liquid Materials in Microfluidic Devices, n.d.
- [250] X. Jing, H. Wang, X. Huang, Z. Chen, J. Zhu, X. Wang, Digital image colorimetry detection of carbaryl in food samples based on liquid phase microextraction coupled with a microfluidic thread-based analytical device, *Food Chem* 337 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127971>.
- [251] G. Xing, J. Ai, N. Wang, Q. Pu, Recent progress of smartphone-assisted microfluidic sensors for point of care testing, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 157 (2022) 116792. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116792>.
- [252] S. Dutta, Point of care sensing and biosensing using ambient light sensor of smartphone: Critical review, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 110 (2019) 393–400. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.014>.
- [253] S. Lee, S.K. Thio, S.Y. Park, S. Bae, An automated 3D-printed smartphone platform integrated with optoelectrowetting (OEW) microfluidic chip for on-site monitoring of viable algae in water, *Harmful Algae* 88 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101638>.
- [254] I.P. Alves, N.M. Reis, Microfluidic smartphone quantitation of Escherichia coli in synthetic urine, *Biosens Bioelectron* 145 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111624>.
- [255] F. Li, Y. Zheng, J. Wu, L. Zhao, L. Shui, Q. Pu, S. Liu, Smartphone assisted immunodetection of HIV p24 antigen using reusable, centrifugal microchannel array chip, *Talanta* 203 (2019) 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.042>.

- [256] J. Schindelin, C.T. Rueden, M.C. Hiner, K.W. Eliceiri, The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis, *Mol Reprod Dev* 82 (2015) 518–529. <https://doi.org/10.1002/mrd.22489>.
- [257] S.B. Somvanshi, A.M. Ulloa, M. Zhao, Q. Liang, A.K. Barui, A. Lucas, K.M. Jadhav, J.P. Allebach, L.A. Stanciu, Microfluidic paper-based aptasensor devices for multiplexed detection of pathogenic bacteria, *Biosens Bioelectron* 207 (2022) 114214. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114214>.
- [258] A.A. Edwards, B.D. Alexander, UV-visible absorption spectroscopy, organic applications, in: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, Elsevier, 2016: pp. 511–519. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803224-4.00013-3>.
- [259] B. Diehl, Principles in NMR Spectroscopy, in: *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*, Elsevier, 2008: pp. 1–41. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53173-5.00001-9>.
- [260] M.A.G. González, E.S. Mendoza, N.H.W. Minsky, A.L. Saucedo, Fundamentals and analogies to better understand NMR spectroscopy, *Educacion Quimica* 33 (2022) 3–13. <https://doi.org/10.22201/fq.18708404E.2022.4.0.81520>.
- [261] P.J. Hore, *Nuclear magnetic resonance* / P.J. Hore, 2nd ed., Oxford University Press, Oxford, 2015.
- [262] A. Requena Rodríguez, J. Zúñiga Román, *Espectroscopía* / Alberto Requena Rodríguez, José Zúñiga Román, Garcia Maroto Editores, Madrid, 2020.
- [263] M. Hesse, B. Zeeh, H. Meier, *Métodos espectroscópicos en Química orgánica* / Manfred Hess, Herbert Meier, Bernd Zeeh, 2ª ed. act. y amp., Síntesis, Madrid, 2005.
- [264] B.W. An, J.H. Shin, S.Y. Kim, J. Kim, S. Ji, J. Park, Y. Lee, J. Jang, Y.G. Park, E. Cho, S. Jo, J.U. Park, Smart sensor systems for wearable electronic devices, *Polymers (Basel)* 9 (2017). <https://doi.org/10.3390/polym9080303>.
- [265] I.C. Jeong, D. Bychkov, P.C. Searson, Wearable devices for precision medicine and health state monitoring, *IEEE Trans Biomed Eng* 66 (2019) 1242–1258. <https://doi.org/10.1109/TBME.2018.2871638>.
- [266] MarketsandMarkets, *Wearable Fitness Technology Market*, (2016). <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/wearable-fitness-technology-market-139869705.html>.
- [267] P.J. Chacon, L. Pu, T.H. Da Costa, Y.H. Shin, T. Ghomian, H. Shamkhalichenar, H.C. Wu, B.A. Irving, J.W. Choi, A Wearable Pulse Oximeter With Wireless Communication and Motion Artifact Tailoring for Continuous Use, *IEEE Trans Biomed Eng* 66 (2019) 1505–1513. <https://doi.org/10.1109/TBME.2018.2874885>.
- [268] F. Riaz, M.A. Azad, J. Arshad, M. Imran, A. Hassan, S. Rehman, Pervasive blood pressure monitoring using Photoplethysmogram (PPG) sensor, *Future Generation*

- Computer Systems 98 (2019) 120–130.
<https://doi.org/10.1016/j.future.2019.02.032>.
- [269] C.M. Boutry, L. Beker, Y. Kaizawa, C. Vassos, H. Tran, A.C. Hinckley, R. Pfattner, S. Niu, J. Li, J. Claverie, Z. Wang, J. Chang, P.M. Fox, Z. Bao, Biodegradable and flexible arterial-pulse sensor for the wireless monitoring of blood flow, *Nat Biomed Eng* 3 (2019) 47–57. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41551-018-0336-5>.
- [270] F. Güder, A. Ainla, J. Redston, B. Mosadegh, A. Glavan, T.J. Martin, G.M. Whitesides, Paper-Based Electrical Respiration Sensor, *Angewandte Chemie* 128 (2016) 5821–5826. <https://doi.org/10.1002/ange.201511805>.
- [271] M. Manas, A. Sinha, S. Sharma, M.R. Mahboob, A novel approach for IoT based wearable health monitoring and messaging system, *J Ambient Intell Humaniz Comput* 10 (2019) 2817–2828. <https://doi.org/10.1007/s12652-018-1101-z>.
- [272] G. Liu, C. Ho, N. Slappey, Z. Zhou, S.E. Snelgrove, M. Brown, A. Grabinski, X. Guo, Y. Chen, K. Miller, J. Edwards, T. Kaya, A wearable conductivity sensor for wireless real-time sweat monitoring, *Sens Actuators B Chem* 227 (2016) 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.12.034>.
- [273] H.Y.Y. Nyein, L.C. Tai, Q.P. Ngo, M. Chao, G.B. Zhang, W. Gao, M. Bariya, J. Bullock, H. Kim, H.M. Fahad, A. Javey, A Wearable Microfluidic Sensing Patch for Dynamic Sweat Secretion Analysis, *ACS Sens* 3 (2018) 944–952. <https://doi.org/10.1021/acssensors.7b00961>.
- [274] A. Martín, J. Kim, J.F. Kurniawan, J.R. Sempionatto, J.R. Moreto, G. Tang, A.S. Campbell, A. Shin, M.Y. Lee, X. Liu, J. Wang, Epidermal Microfluidic Electrochemical Detection System: Enhanced Sweat Sampling and Metabolite Detection, *ACS Sens* 2 (2017) 1860–1868. <https://doi.org/10.1021/acssensors.7b00729>.
- [275] W. Gao, S. Emaminejad, H.Y.Y. Nyein, S. Challa, K. Chen, A. Peck, H.M. Fahad, H. Ota, H. Shiraki, D. Kiriya, D.H. Lien, G.A. Brooks, R.W. Davis, A. Javey, Fully integrated wearable sensor arrays for multiplexed in situ perspiration analysis, *Nature* 529 (2016) 509–514. <https://doi.org/10.1038/nature16521>.
- [276] M. Parrilla, T. Guinovart, J. Ferré, P. Blondeau, F.J. Andrade, A Wearable Paper-Based Sweat Sensor for Human Perspiration Monitoring, *Adv Healthc Mater* 8 (2019). <https://doi.org/10.1002/adhm.201900342>.
- [277] W. Gao, H. Ota, D. Kiriya, K. Takei, A. Javey, Flexible Electronics toward Wearable Sensing, *Acc Chem Res* 52 (2019) 523–533. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00500>.
- [278] G. Xu, C. Cheng, Z. Liu, W. Yuan, X. Wu, Y. Lu, S.S. Low, J. Liu, L. Zhu, D. Ji, S. Li, Z. Chen, L. Wang, Q. Yang, Z. Cui, Q. Liu, Battery-Free and Wireless Epidermal Electrochemical System with All-Printed Stretchable Electrode Array for

- Multiplexed In Situ Sweat Analysis, *Adv Mater Technol* 4 (2019). <https://doi.org/10.1002/admt.201800658>.
- [279] L. Ortega, A. Llorella, J.P. Esquivel, N. Sabaté, Self-powered smart patch for sweat conductivity monitoring, *Microsyst Nanoeng* 5 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41378-018-0043-0>.
- [280] J. Heikenfeld, A. Jajack, B. Feldman, S.W. Granger, S. Gaitonde, G. Begtrup, B.A. Katchman, Accessing analytes in biofluids for peripheral biochemical monitoring, *Nat Biotechnol* 37 (2019) 407–419. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0040-3>.
- [281] F.J. Zhao, M. Bonmarin, Z.C. Chen, M. Larson, D. Fay, D. Runnoe, J. Heikenfeld, Ultra-simple wearable local sweat volume monitoring patch based on swellable hydrogels, *Lab Chip* 20 (2020) 168–174. <https://doi.org/10.1039/c9lc00911f>.
- [282] M. Chung, G. Fortunato, N. Radacsi, Wearable flexible sweat sensors for healthcare monitoring: A review, *J R Soc Interface* 16 (2019). <https://doi.org/10.1098/rsif.2019.0217>.
- [283] J. Kim, J.R. Sempionatto, S. Imani, M.C. Hartel, A. Barfidokht, G. Tang, A.S. Campbell, P.P. Mercier, J. Wang, Simultaneous Monitoring of Sweat and Interstitial Fluid Using a Single Wearable Biosensor Platform, *Advanced Science* 5 (2018). <https://doi.org/10.1002/advs.201800880>.
- [284] T.S. Perry, Wearable sensor detects stress in sweat, 2018. <https://doi.org/https://doi.org/10.1109/MSPEC.2018.8449037>.
- [285] W. Nikolajek, H. Emrich, pH of sweat of patients with cystic fibrosis, 1976.
- [286] M.J. Patterson, S.D.R. Galloway, M.A. Nimmo, Effect of induced metabolic alkalosis on sweat composition in men, *Acta Physiol Scand* 174 (2002) 41–46. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.2002.00927.x>.
- [287] Sawka, Coyle. Influence of body water and blood volume on Thermoregulation and exercise performance in the heat, (n.d.).
- [288] V.F. Curto, C. Fay, S. Coyle, R. Byrne, C. O’Toole, C. Barry, S. Hughes, N. Moyna, D. Diamond, F. Benito-Lopez, Real-time sweat pH monitoring based on a wearable chemical barcode micro-fluidic platform incorporating ionic liquids, *Sens Actuators B Chem* 171–172 (2012) 1327–1334. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.06.048>.
- [289] T.D. Noakes, The hyponatremia of exercise, *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2 (1992) 205–228. <https://doi.org/https://doi.org/10.1123/ijns.2.3.205>.
- [290] T. Kaya, G. Liu, J. Ho, K. Yelamarthi, K. Miller, J. Edwards, A. Stannard, Wearable Sweat Sensors: Background and Current Trends, *Electroanalysis* 31 (2019) 411–421. <https://doi.org/10.1002/elan.201800677>.

- [291] D. Morris, S. Coyle, Y. Wu, K.T. Lau, G. Wallace, D. Diamond, Bio-sensing textile based patch with integrated optical detection system for sweat monitoring, *Sens Actuators B Chem* 139 (2009) 231–236. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2009.02.032>.
- [292] N. Lopez-Ruiz, V.F. Curto, M.M. Erenas, F. Benito-Lopez, D. Diamond, A.J. Palma, L.F. Capitan-Vallvey, Smartphone-based simultaneous pH and nitrite colorimetric determination for paper microfluidic devices, *Anal Chem* 86 (2014) 9554–9562. <https://doi.org/10.1021/ac5019205>.
- [293] X. He, T. Xu, Z. Gu, W. Gao, L.P. Xu, T. Pan, X. Zhang, Flexible and Superwetable Bands as a Platform toward Sweat Sampling and Sensing, *Anal Chem* 91 (2019) 4296–4300. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05875>.
- [294] A.J. Bandodkar, P. Gutruf, J. Choi, K. Lee, Y. Sekine, J.T. Reeder, W.J. Jeang, A.J. Aranyosi, S.P. Lee, J.B. Model, R. Ghaffari, C.-J. Su, J.P. Leshock, T. Ray, A. Verrillo, K. Thomas, V. Krishnamurthi, S. Han, J. Kim, S. Krishnan, T. Hang, J. Rogers, Battery-free, skin-interfaced microfluidic electronic systems for simultaneous electrochemical, colorimetric, and volumetric analysis of sweat, *Sci Adv* 5 (2019) 1–15. <https://doi.org/https://doi.org/10.1126/sciadv.aav3294>.
- [295] A. Koh, D. Kang, Y. Xue, S. Lee, R.M. Pielak, J. Kim, T. Hwang, S. Min, A. Banks, P. Bastien, M.C. Manco, L. Wang, K.R. Ammann, K.-I. Jang, P. Won, S. Han, R. Ghaffari, U. Paik, M.J. Slepian, G. Balooch, Y. Huang, J.A. Rogers, A soft, wearable microfluidic device for the capture, storage, and colorimetric sensing of sweat, *Sci Transl Med* 8 (2016). <https://doi.org/https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf2593>.
- [296] W. Dang, L. Manjakkal, W.T. Navaraj, L. Lorenzelli, V. Vinciguerra, R. Dahiya, Stretchable wireless system for sweat pH monitoring, *Biosens Bioelectron* 107 (2018) 192–202. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.02.025>.
- [297] S. Anastasova, B. Crewther, P. Bembnowicz, V. Curto, H.M. Ip, B. Rosa, G.Z. Yang, A wearable multisensing patch for continuous sweat monitoring, *Biosens Bioelectron* 93 (2017) 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.038>.
- [298] J. Choi, R. Ghaffari, L.B. Baker, J.A. Rogers, Skin-interfaced systems for sweat collection and analytics (2018), *Sci Adv* 4 (2018) 1–9.
- [299] A. Olanrewaju, M. Beaugrand, M. Yafia, D. Juncker, Capillary microfluidics in microchannels: From microfluidic networks to capillary circuits, *Lab Chip* 18 (2018) 2323–2347. <https://doi.org/10.1039/c8lc00458g>.
- [300] M. Boada, A. Lazaro, R. Villarino, D. Girbau, Battery-Less NFC Sensor for pH Monitoring, *IEEE Access* 7 (2019) 33226–33239. <https://doi.org/10.1109/ACCESS.2019.2904109>.

- [301] Y. Lu, K. Jiang, D. Chen, G. Shen, Wearable sweat monitoring system with integrated micro-supercapacitors, *Nano Energy* 58 (2019) 624–632. <https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2019.01.084>.
- [302] R. Kansara, P. Bhojani, J. Chauhan, Designing Smart Wearable to measure Health Parameters; Designing Smart Wearable to measure Health Parameters, 2018.
- [303] A. Alizadeh, A. Burns, R. Lenigk, R. Gettings, J. Ashe, A. Porter, M. McCaul, R. Barrett, D. Diamond, P. White, P. Skeath, M. Tomczak, A wearable patch for continuous monitoring of sweat electrolytes during exertion, *Lab Chip* 18 (2018) 2632–2641. <https://doi.org/10.1039/c8lc00510a>.
- [304] S. Fowkes Godek, A.R. Bartolozzi, R. Burkholder, E. Sugarman, C. Peduzzi, Sweat Rates and Fluid Turnover in Professional Football Players: A Comparison of National Football League Linemen and Backs, n.d. http://meridian.allenpress.com/jat/article-pdf/43/2/184/1608954/1062-6050-43_2_184.pdf.
- [305] G.J. Mohr, H. Müller, B. Bussemer, A. Stark, T. Carofiglio, S. Trupp, R. Heuermann, T. Henkel, D. Escudero, L. González, Design of acidochromic dyes for facile preparation of pH sensor layers, *Anal Bioanal Chem* 392 (2008) 1411–1418. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2428-7>.
- [306] J. Morales-Sanfrutos, J. Lopez-Jaramillo, M. Ortega-Muñoz, A. Megia-Fernandez, F. Perez-Balderas, F. Hernandez-Mateo, F. Santoyo-Gonzalez, Vinyl sulfone: A versatile function for simple bioconjugation and immobilization, *Org Biomol Chem* 8 (2010) 667–675. <https://doi.org/10.1039/b920576d>.
- [307] F.J. Lopez-Jaramillo, F. Hernandez-Mateo, F. Santoyo-Gonzalez, Vinyl Sulfone: A Multi-Purpose Function in Proteomics, Granada, n.d. www.intechopen.com.
- [308] G.J. Mohr, Synthesis of naphthalimide-based indicator dyes with a 2-hydroxyethylsulfonyl function for covalent immobilisation to cellulose, *Sens Actuators B Chem* 275 (2018) 439–445. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.07.095>.
- [309] T. Werner, O.S. Wolfbeis, Optical sensor for the pH 10-13 range using a new support material *, Springer-Verlag, 1993.
- [310] P. Chauhan, C. Hadad, A.H. López, S. Silvestrini, V. La Parola, E. Frison, M. Maggini, M. Prato, T. Carofiglio, A nanocellulose–dye conjugate for multi-format optical pH-sensing, *Chemical Communications* 50 (2014) 9493–9496. <https://doi.org/10.1039/c4cc02983f>.
- [311] W.T. Suarez, M.O.K. Franco, L.F. Capitán-Vallvey, M.M. Erenas, Chitosan-modified cotton thread for the preconcentration and colorimetric trace determination of Co(II), *Microchemical Journal* 158 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105137>.

- [312] M. Caldara, C. Colleoni, E. Guido, V. Re, G. Rosace, Optical monitoring of sweat pH by a textile fabric wearable sensor based on covalently bonded litmus-3-glycidoxypropyltrimethoxysilane coating, *Sens Actuators B Chem* 222 (2016) 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.08.073>.
- [313] E. Basker, Change at the Checkout: Tracing the Impact of a Process Innovation, *J Ind Econ* 63 (2015) 339–370. <https://doi.org/10.1111/joie.12073>.
- [314] G. Goggin, R. Wilken, QR codes and automated decision-making in the COVID-19 pandemic, *New Media Soc* 26 (2024) 1268–1289. <https://doi.org/10.1177/14614448231201649>.
- [315] M. Vazquez-Briseno, F.I. Hirata, J. De Dios Sanchez-Lopez, E. Jimenez-Garcia, C. Navarro-Cota, J.I. Nieto-Hipolito, 2 Using RFID/NFC and QR-Code in Mobile Phones to Link the Physical and the Digital World, n.d. www.intechopen.com.
- [316] C. Aktaş, *The Evolution and Emergence of QR Codes.*, Cambridge Scholars Publishing, 2017.
- [317] C. Law, S. So, QR Codes in Education, *JETDE* 3 (2017). <https://doi.org/https://doi.org/10.18785/jetde.0301.07>.
- [318] N. Min-Allah, B.A. Alahmed, E.M. Albreek, L.S. Alghamdi, D.A. Alawad, A.S. Alharbi, N. Al-Akkas, D. Musleh, S. Alrashed, A survey of COVID-19 contact-tracing apps, *Comput Biol Med* 137 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2021.104787>.
- [319] A.W. Colman, J.F.K. Sellick, J.U. Weaver, Use of Quick Response (QR) coded bracelets and cards for the improvement of cortisol deficiency/Addison’s disease management: an audit of quality of care of the management of steroid deficiency in acute illness, *BMJ Innov* 4 (2018) 115. <https://doi.org/10.1136/bmjinnov-2017-000226>.
- [320] M. Vázquez-Briseño, J.I. Nieto-Hipólito, E. Jiménez-García, Using QR codes to improve mobile wellness applications, *Int J Comput Sci Netw Secur* 10 (2010) 50–53.
- [321] J. Sanz-Valero, L.M. Álvarez Sabucedo, C. Wanden-Berghe, J.M. Santos Gago, QR Codes Outlook for Food Science and Nutrition, *Crit Rev Food Sci Nutr* (2016) 973–978.
- [322] R. Barthel, A. Hudson-Smith, M. De Jode, B. Blundell, *Tales of Things The Internet of ‘Old’ Things Collecting Stories of Objects, Places and Spaces*, 2010.
- [323] A. Hudson-Smith, S. Gray, C. Ross, R. Barthel, M. de Jode, C. Warwick, M. Terras, Experiments with the Internet of Things in Museum Space: QRator, in: *AM Conference on Ubiquitous Computing (UbiComp ’12)*, 2012: pp. 1183–1184.
- [324] J.Z. Gao, L. Prakash, R. Jagatesan, Understanding 2D-BarCode technology and applications in M-commerce-design and implementation of a 2D barcode

- processing solution, in: 31st Annual International Computer Software and Applications Conference, Beijing, 2017: pp. 49–56. <https://doi.org/10.1109/COMPSAC.2007.229>.
- [325] I. Tkachenko, W. Puech, C. Destruel, O. Strauss, J.M. Gaudin, C. Guichard, Two-Level QR code for private message sharing and document authentication, *IEEE Transactions on Information Forensics and Security* 11 (2016) 571–583. <https://doi.org/10.1109/TIFS.2015.2506546>.
- [326] H. Li, T. Chen, Y. Peng, H. Li, An intelligent vehicle-tracking system solution for indoor parking, (n.d.). <https://doi.org/10.1007/s12518-020-00321-8/Published>.
- [327] A. Luvisi, Electronic identification technology for agriculture, plant, and food. A review, *Agron Sustain Dev* 36 (2016) 1–14. <https://doi.org/10.1007/s13593-016-0352-3>.
- [328] C.T. Karia, A. Hughes, S. Carr, Uses of quick response codes in healthcare education: A scoping review, *BMC Med Educ* 19 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12909-019-1876-4>.
- [329] T.M. Fernandez-Carames, P. Fraga-Lamas, A Review on Human-Centered IoT-Connected Smart Labels for the Industry 4.0, *IEEE Access* 6 (2018) 25939–25957. <https://doi.org/10.1109/ACCESS.2018.2833501>.
- [330] H. El Matbouly, P. Escobedo, R. Dahiya, Flexible Metasurface QR Code for Simultaneous Identification and Sensing, in: *FLEPS 2021 - IEEE International Conference on Flexible and Printable Sensors and Systems*, Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc., 2021. <https://doi.org/10.1109/FLEPS51544.2021.9469817>.
- [331] N. Tang, C. Zhou, L. Xu, Y. Jiang, H. Qu, X. Duan, A Fully Integrated Wireless Flexible Ammonia Sensor Fabricated by Soft Nano-Lithography, *ACS Sens* 4 (2019) 726–732. <https://doi.org/10.1021/acssensors.8b01690>.
- [332] S. Matindoust, A. Farzi, M. Baghaei Nejad, M.H. Shahrokh Abadi, Z. Zou, L.R. Zheng, Ammonia gas sensor based on flexible polyaniline films for rapid detection of spoilage in protein-rich foods, *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* 28 (2017) 7760–7768. <https://doi.org/10.1007/s10854-017-6471-z>.
- [333] X. Zhai, Z. Li, J. Shi, X. Huang, Z. Sun, D. Zhang, X. Zou, Y. Sun, J. Zhang, M. Holmes, Y. Gong, M. Povey, S. Wang, A colorimetric hydrogen sulfide sensor based on gellan gum-silver nanoparticles bionanocomposite for monitoring of meat spoilage in intelligent packaging, *Food Chem* 290 (2019) 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.138>.
- [334] J. Koskela, J. Sarfraz, P. Ihalainen, A. Määttänen, P. Pulkkinen, H. Tenhu, T. Nieminen, A. Kilpelä, J. Peltonen, Monitoring the quality of raw poultry by detecting hydrogen sulfide with printed sensors, *Sens Actuators B Chem* 218 (2015) 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.04.093>.

- [335] P. Puligundla, J. Jung, S. Ko, Carbon dioxide sensors for intelligent food packaging applications, *Food Control* 25 (2012) 328–333. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.043>.
- [336] P. Escobedo, M.M. Erenas, N. López-Ruiz, M.A. Carvajal, S. Gonzalez-Chocano, I. De Orbe-Payá, L.F. Capitán-Valley, A.J. Palma, A. Martínez-Olmos, Flexible Passive near Field Communication Tag for Multigas Sensing, *Anal Chem* 89 (2017) 1697–1703. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03901>.
- [337] K. Azuma, N. Kagi, U. Yanagi, H. Osawa, Effects of low-level inhalation exposure to carbon dioxide in indoor environments: A short review on human health and psychomotor performance, *Environ Int* 121 (2018) 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.08.059>.
- [338] P. Escobedo, M.D. Fernández-Ramos, N. López-Ruiz, O. Moyano-Rodríguez, A. Martínez-Olmos, I.M. Pérez de Vargas-Sansalvador, M.A. Carvajal, L.F. Capitán-Vallvey, A.J. Palma, Smart facemask for wireless CO₂ monitoring, *Nat Commun* 13 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27733-3>.
- [339] M. Frankel, G. Bekö, M. Timm, S. Gustavsen, E.W. Hansen, A.M. Madsen, Seasonal variations of indoor microbial exposures and their relation to temperature, relative humidity, and air exchange rate, *Appl Environ Microbiol* 78 (2012) 8289–8297. <https://doi.org/10.1128/AEM.02069-12>.
- [340] A. Aganovic, Y. Bi, G. Cao, F. Drangsholt, J. Kurnitski, P. Wargocki, Estimating the impact of indoor relative humidity on SARS-CoV-2 airborne transmission risk using a new modification of the Wells-Riley model, *Build Environ* 205 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2021.108278>.
- [341] Z. Peng, J.L. Jimenez, Exhaled CO₂ as a COVID-19 infection risk proxy for different indoor environments and activities, *Environ Sci Technol Lett* 8 (2021) 392–397. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.1c00183>.
- [342] M.M. Hassan, M.E. El Zowalaty, S.A. Khan, A. Islam, M.R.K. Nayem, J.D. Järhult, Role of Environmental Temperature on the Attack rate and Case fatality rate of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pandemic, *Infect Ecol Epidemiol* 10 (2020). <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/20008686.2020.1792620>.
- [343] C. Rolfe, H. Daryaei, Intrinsic and Extrinsic Factors Affecting Microbial Growth in Food Systems, in: *Food Safety Engineering*, Springer, Cham, 2020: pp. 3–24. https://doi.org/10.1007/978-3-030-42660-6_1.
- [344] J. Lelieveld, J.S. Evans, M. Fnais, D. Giannadaki, A. Pozzer, The contribution of outdoor air pollution sources to premature mortality on a global scale, *Nature* 525 (2015) 367–371. <https://doi.org/10.1038/nature15371>.
- [345] Safety and Health Topics. Hydrogen Sulfide - Hazards. Occupational Safety and Health Administration, (2020). <https://www.osha.gov/hydrogen-sulfide> (accessed May 9, 2023).

- [346] M. Ariza-Avidad, M. Agudo-Acemel, A. Salinas-Castillo, L.F. Capitán-Vallvey, Inkjet-printed disposable metal complexing indicator-displacement assay for sulphide determination in water, *Anal Chim Acta* 872 (2015) 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.045>.
- [347] G.R. Bradski, Adrian. Kaehler, *Learning OpenCV: computer vision with the OpenCV library*, O'Reilly, 2008.
- [348] S.C. Kim, U.M. Jalal, S.B. Im, S. Ko, J.S. Shim, A smartphone-based optical platform for colorimetric analysis of microfluidic device, *Sens Actuators B Chem* 239 (2017) 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.07.159>.
- [349] V. Oncescu, D. O'Dell, D. Erickson, Smartphone based health accessory for colorimetric detection of biomarkers in sweat and saliva, *Lab Chip* 13 (2013) 3232–3238. <https://doi.org/10.1039/c3lc50431j>.
- [350] P. Escobedo, A.J. Palma, M.M. Erenas, A. Martinez Olmos, M.A. Carvajal, M. Tabraue Chavez, M.A. Luque Gonzalez, J.J. Diaz-Mochon, S. Pernagallo, L.F. Capitan-Vallvey, Smartphone-based diagnosis of parasitic infections with colorimetric assays in centrifuge tubes, *IEEE Access* 7 (2019) 185677–185686. <https://doi.org/10.1109/ACCESS.2019.2961230>.
- [351] T. Alawsi, G.P. Mattia, Z. Al-Bawi, R. Beraldi, Smartphone-based colorimetric sensor application for measuring biochemical material concentration, *Sens Biosensing Res* 32 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2021.100404>.
- [352] A.K. Yetisen, J.L. Martinez-Hurtado, A. Garcia-Melendrez, F. Da Cruz Vasconcellos, C.R. Lowe, A smartphone algorithm with inter-phone repeatability for the analysis of colorimetric tests, *Sens Actuators B Chem* 196 (2014) 156–160. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.01.077>.
- [353] M.E. Ferreira, J. Tirapu-Azpiroz, D.V.L.M. Marçal, A.F. da Silva, R.L. Ohta, M.B. Steiner, Illumination compensation algorithm for colorimetric detection of microfluidic paper based devices with a smartphone, *Optical Diagnostics and Sensing XXI: Toward Point-of-Care Diagnostics* 11651 (2021) 15–25. <https://doi.org/https://doi.org/10.1117/12.2578441>.
- [354] H. Karlsen, T. Dong, Smartphone-Based Rapid Screening of Urinary Biomarkers, *IEEE Trans Biomed Circuits Syst* 11 (2017) 455–463. <https://doi.org/10.1109/TBCAS.2016.2633508>.
- [355] J. Il Hong, B.Y. Chang, Development of the smartphone-based colorimetry for multi-analyte sensing arrays, *Lab Chip* 14 (2014) 1725–1732. <https://doi.org/10.1039/c3lc51451j>.
- [356] M.Y. Jia, Q.S. Wu, H. Li, Y. Zhang, Y.F. Guan, L. Feng, The calibration of cellphone camera-based colorimetric sensor array and its application in the determination of glucose in urine, *Biosens Bioelectron* 74 (2015) 1029–1037. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.07.072>.

- [357] T. Kong, J.B. You, B. Zhang, B. Nguyen, F. Tarlan, K. Jarvi, D. Sinton, Accessory-free quantitative smartphone imaging of colorimetric paper-based assays, *Lab Chip* 19 (2019) 1991–1999. <https://doi.org/10.1039/c9lc00165d>.
- [358] M. Nixon, F. Outlaw, T.S. Leung, Accurate device-independent colorimetric measurements using smartphones, *PLoS One* 15 (2020). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230561>.
- [359] X. Bao, S. Jiang, Y. Wang, M. Yu, J. Han, A remote computing based point-of-care colorimetric detection system with a smartphone under complex ambient light conditions, *Analyst* 143 (2018) 1387–1395. <https://doi.org/10.1039/c7an01685a>.
- [360] M. Karlen, C. Spangler, J.R. Benya, *Lighting design basics*, 2017.
- [361] G. Mistlberger, G.A. Crespo, E. Bakker, Ionophore-based optical sensors, *Annual Review of Analytical Chemistry* 7 (2014) 483–512. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071213-020307>.
- [362] J.F.C.B. Ramalho, S.F.H. Correia, L. Fu, L.L.F. António, C.D.S. Brites, P.S. André, R.A.S. Ferreira, L.D. Carlos, Luminescence Thermometry on the Route of the Mobile-Based Internet of Things (IoT): How Smart QR Codes Make It Real, *Advanced Science* 6 (2019). <https://doi.org/10.1002/advs.201900950>.
- [363] J.A. Josiele, R. Sequinel, B.C. Dias, M. Silvestre, A.D. Batista, J.F. da S. Petrucci, Chemical QR Code: A simple and disposable paper-based optoelectronic nose for the identification of olive oil odor, *Food Chem* 350 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129243>.
- [364] I. Benito-Altamirano, P. Pfeiffer, O. Cusola, J. Daniel Prades, Machine-Readable Pattern for Colorimetric Sensor Interrogation, in: *MDPI AG*, 2018: p. 906. <https://doi.org/10.3390/proceedings2130906>.
- [365] L. Engel, I. Benito-Altamirano, K.R. Tarantik, C. Pannek, M. Dold, J.D. Prades, J. Wöllenstein, Printed sensor labels for colorimetric detection of ammonia, formaldehyde and hydrogen sulfide from the ambient air, *Sens Actuators B Chem* 330 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.129281>.
- [366] I.N. Katis, J.A. Holloway, J. Madsen, S.N. Faust, S.D. Garbis, P.J.S. Smith, D. Voegeli, D.L. Bader, R.W. Eason, C.L. Sones, Paper-based colorimetric enzyme linked immunosorbent assay fabricated by laser induced forward transfer, *Biomicrofluidics* 8 (2014). <https://doi.org/10.1063/1.4878696>.
- [367] A. Katoh, K. Maejima, Y. Hiruta, D. Citterio, All-printed semiquantitative paper-based analytical devices relying on QR code array readout, *Analyst* 145 (2020) 6071–6078. <https://doi.org/10.1039/d0an00955e>.
- [368] A. Burklund, H.K. Saturley-Hall, F.A. Franchina, J.E. Hill, J.X.J. Zhang, Printable QR code paper microfluidic colorimetric assay for screening volatile biomarkers,

- Biosens Bioelectron 128 (2019) 97–103.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.12.026>.
- [369] B. Yoon, H. Shin, E.M. Kang, D.W. Cho, K. Shin, H. Chung, C.W. Lee, J.M. Kim, Inkjet-compatible single-component polydiacetylene precursors for thermochromic paper sensors, *ACS Appl Mater Interfaces* 5 (2013) 4527–4535. <https://doi.org/10.1021/am303300g>.
- [370] D. Kou, W. Ma, S. Zhang, J.L. Lutkenhaus, B. Tang, High-Performance and Multifunctional Colorimetric Humidity Sensors Based on Mesoporous Photonic Crystals and Nanogels, *ACS Appl Mater Interfaces* 10 (2018) 41645–41654. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b14223>.
- [371] H. Hall, A. Syed, J.X.J. Zhang, Two-dimensional, error-corrected barcode readout for point-of-care colorimetric assays, in: 2016 IEEE Healthcare Innovation Point-of-Care Technologies Conference, HI-POCT 2016, Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc., 2016: pp. 81–84. <https://doi.org/10.1109/HIC.2016.7797702>.
- [372] Y. Xu, Z. Liu, R. Liu, M. Luo, Q. Wang, L. Cao, S. Ye, Inkjet-printed pH-sensitive QR code labels for real-time food freshness monitoring, *J Mater Sci* 56 (2021) 18453–18462. <https://doi.org/10.1007/s10853-021-06477-x>.
- [373] T.F. Scherr, S. Gupta, D.W. Wright, F.R. Haselton, An embedded barcode for “connected” malaria rapid diagnostic tests, *Lab Chip* 17 (2017) 1314–1322. <https://doi.org/10.1039/c6lc01580h>.
- [374] T. Wang, G. Xu, W. Wu, X. Wang, X. Chen, S. Zhou, F. You, A novel combination of quick response code and microfluidic paper-based analytical devices for rapid and quantitative detection, *Biomed Microdevices* 20 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10544-018-0325-1>.
- [375] F. Zaroudi, B. Nasihatkon, R. Hosseinzadeh, A.R. Fakhari, S. Seidi, Miniaturized on-chip electromembrane extraction with QR code-based red-green-blue analysis using a customized Android application for copper determination in environmental and food samples, *Food Chem* 414 (2023) 135667. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135667>.
- [376] S.F. Berlanda, M. Breitfeld, C.L. Dietsche, P.S. Dittrich, Recent Advances in Microfluidic Technology for Bioanalysis and Diagnostics, *Anal Chem* 93 (2021) 311–331. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04366>.
- [377] E. Fu, S.A. Ramsey, P. Kauffman, B. Lutz, P. Yager, Transport in two-dimensional paper networks, *Microfluid Nanofluidics* 10 (2011) 29–35. <https://doi.org/10.1007/s10404-010-0643-y>.
- [378] G.E. Fridley, H. Le, P. Yager, Highly Sensitive Immunoassay Based on Controlled Rehydration of Patterned Reagents in a 2-Dimensional Paper Network, *Anal Chem* 86 (2014) 6447–6453. <https://doi.org/10.1021/ac500872j>.

- [379] J.H. Shin, J. Park, S.H. Kim, J.-K. Park, Programmed sample delivery on a pressurized paper, *Biomicrofluidics* 8 (2014). <https://doi.org/10.1063/1.4899773>.
- [380] B. Lutz, T. Liang, E. Fu, S. Ramachandran, P. Kauffman, P. Yager, Dissolvable fluidic time delays for programming multi-step assays in instrument-free paper diagnostics, *Lab Chip* 13 (2013) 2840. <https://doi.org/10.1039/c3lc50178g>.
- [381] H. Noh, S.T. Phillips, Fluidic Timers for Time-Dependent, Point-of-Care Assays on Paper, *Anal Chem* 82 (2010) 8071–8078. <https://doi.org/10.1021/ac1005537>.
- [382] H. Noh, S.T. Phillips, Metering the Capillary-Driven Flow of Fluids in Paper-Based Microfluidic Devices, *Anal Chem* 82 (2010) 4181–4187. <https://doi.org/10.1021/ac100431y>.
- [383] J. Songok, M. Toivakka, Controlling capillary-driven surface flow on a paper-based microfluidic channel, *Microfluid Nanofluidics* 20 (2016) 63. <https://doi.org/10.1007/s10404-016-1726-1>.
- [384] M. Fratzl, B.S. Chang, S. Oyola-Reynoso, G. Blaire, S. Delshadi, T. Devillers, T. Ward, N.M. Dempsey, J.-F. Bloch, M.M. Thuo, Magnetic Two-Way Valves for Paper-Based Capillary-Driven Microfluidic Devices, *ACS Omega* 3 (2018) 2049–2057. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01839>.
- [385] X. Li, P. Zwanenburg, X. Liu, Magnetic timing valves for fluid control in paper-based microfluidics, *Lab Chip* 13 (2013) 2609. <https://doi.org/10.1039/c3lc00006k>.
- [386] F. Liu, M.W. Urban, Recent advances and challenges in designing stimuli-responsive polymers, *Prog Polym Sci* 35 (2010) 3–23. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.10.002>.
- [387] D.W.P.M. Löwik, E.H.P. Leunissen, M. van den Heuvel, M.B. Hansen, J.C.M. van Hest, Stimulus responsive peptide based materials, *Chem Soc Rev* 39 (2010) 3394. <https://doi.org/10.1039/b914342b>.
- [388] J. Hu, G. Zhang, Z. Ge, S. Liu, Stimuli-responsive tertiary amine methacrylate-based block copolymers: Synthesis, supramolecular self-assembly and functional applications, *Prog Polym Sci* 39 (2014) 1096–1143. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.10.006>.
- [389] P. Theato, B.S. Sumerlin, R.K. O'Reilly, I.T.H. Epps, Stimuli responsive materials, *Chem Soc Rev* 42 (2013) 7055. <https://doi.org/10.1039/c3cs90057f>.
- [390] X. Yan, F. Wang, B. Zheng, F. Huang, Stimuli-responsive supramolecular polymeric materials, *Chem Soc Rev* 41 (2012) 6042. <https://doi.org/10.1039/c2cs35091b>.
- [391] C. Huang, S.J. Soenen, J. Rejman, B. Lucas, K. Braeckmans, J. Demeester, S.C. De Smedt, Stimuli-responsive electrospun fibers and their applications, *Chem Soc Rev* 40 (2011) 2417. <https://doi.org/10.1039/c0cs00181c>.

- [392] I. Tokarev, S. Minko, Stimuli-Responsive Porous Hydrogels at Interfaces for Molecular Filtration, Separation, Controlled Release, and Gating in Capsules and Membranes, *Advanced Materials* 22 (2010) 3446–3462. <https://doi.org/10.1002/adma.201000165>.
- [393] Y. Zhao, K. Thorkelsson, A.J. Mastroianni, T. Schilling, J.M. Luther, B.J. Rancatore, K. Matsunaga, H. Jinnai, Y. Wu, D. Poulsen, J.M.J. Fréchet, A. Paul Alivisatos, T. Xu, Small-molecule-directed nanoparticle assembly towards stimuli-responsive nanocomposites, *Nat Mater* 8 (2009) 979–985. <https://doi.org/10.1038/nmat2565>.
- [394] A. Nelson, Engineering interactions, *Nat Mater* 7 (2008) 523–525. <https://doi.org/10.1038/nmat2214>.
- [395] M.-K. Tsang, G. Bai, J. Hao, Stimuli responsive upconversion luminescence nanomaterials and films for various applications, *Chem Soc Rev* 44 (2015) 1585–1607. <https://doi.org/10.1039/C4CS00171K>.
- [396] K.R. Raghupathi, J. Guo, O. Munkhbat, P. Rangadurai, S. Thayumanavan, Supramolecular Disassembly of Facially Amphiphilic Dendrimer Assemblies in Response to Physical, Chemical, and Biological Stimuli, *Acc Chem Res* 47 (2014) 2200–2211. <https://doi.org/10.1021/ar500143u>.
- [397] S. Dai, P. Ravi, K.C. Tam, pH-Responsive polymers: synthesis, properties and applications, *Soft Matter* 4 (2008) 435. <https://doi.org/10.1039/b714741d>.
- [398] O. Bertrand, J.-F. Gohy, Photo-responsive polymers: synthesis and applications, *Polym Chem* 8 (2017) 52–73. <https://doi.org/10.1039/C6PY01082B>.
- [399] R. Hoogenboom, Temperature-Responsive Polymers: Properties, Synthesis, and Applications, in: *Smart Polymers and Their Applications*, Elsevier, 2019: pp. 13–44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102416-4.00002-8>.
- [400] M.C. García, Ionic-strength-responsive polymers for drug delivery applications, in: *Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications*, Elsevier, 2019: pp. 393–409. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101995-5.00014-3>.
- [401] J. Thévenot, H. Oliveira, O. Sandre, S. Lecommandoux, Magnetic responsive polymer composite materials, *Chem Soc Rev* 42 (2013) 7099. <https://doi.org/10.1039/c3cs60058k>.
- [402] L. Hu, Q. Zhang, X. Li, M.J. Serpe, Stimuli-responsive polymers for sensing and actuation, *Mater Horiz* 6 (2019) 1774–1793. <https://doi.org/10.1039/C9MH00490D>.
- [403] H.-J. Huang, Y.-L. Tsai, S.-H. Lin, S. Hsu, Smart polymers for cell therapy and precision medicine, *J Biomed Sci* 26 (2019) 73. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0571-4>.

- [404] S. CHATTERJEE, P. Chi-leung HUI, Review of Stimuli-Responsive Polymers in Drug Delivery and Textile Application, *Molecules* 24 (2019) 2547. <https://doi.org/10.3390/molecules24142547>.
- [405] L.P. Kreuzer, M.J. Männel, J. Schubert, R.P.M. Höller, M. Chanana, Enzymatic Catalysis at Nanoscale: Enzyme-Coated Nanoparticles as Colloidal Biocatalysts for Polymerization Reactions, *ACS Omega* 2 (2017) 7305–7312. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b00700>.
- [406] E. Nazarzadeh Zare, A. Mudhoo, M. Ali Khan, M. Otero, Z.M.A. Bundhoo, M. Patel, A. Srivastava, C. Navarathna, T. Mlsna, D. Mohan, C.U. Pittman, P. Makvandi, M. Sillanpää, Smart Adsorbents for Aquatic Environmental Remediation, *Small* 17 (2021) 2007840. <https://doi.org/10.1002/smll.202007840>.
- [407] L. Hu, Q. Zhang, X. Li, M.J. Serpe, Stimuli-responsive polymers for sensing and actuation, *Mater Horiz* 6 (2019) 1774–1793. <https://doi.org/10.1039/C9MH00490D>.
- [408] J. V. Alemán, A. V. Chadwick, J. He, M. Hess, K. Horie, R.G. Jones, P. Kratochvíl, I. Meisel, I. Mita, G. Moad, S. Penczek, R.F.T. Stepto, Definitions of terms relating to the structure and processing of sols, gels, networks, and inorganic-organic hybrid materials (IUPAC Recommendations 2007), *Pure and Applied Chemistry* 79 (2007) 1801–1829. <https://doi.org/10.1351/pac200779101801>.
- [409] C. Hopson, M.M. Villar-Chavero, J.C. Domínguez, M.V. Alonso, M. Oliet, F. Rodriguez, Cellulose ionogels, a perspective of the last decade: A review, *Carbohydr Polym* 274 (2021) 118663. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118663>.
- [410] Gels Handbook, Elsevier, 2001. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394690-4.X5073-7>.
- [411] Polymer Gels and Networks, *Chemistry International -- Newsmagazine for IUPAC* 26 (2004). <https://doi.org/10.1515/ci.2004.26.6.34a>.
- [412] K. Almdal, J. Dyre, S. Hvidt, O. Kramer, Towards a phenomenological definition of the term ‘gel,’ *Polymer Gels and Networks* 1 (1993) 5–17. [https://doi.org/10.1016/0966-7822\(93\)90020-I](https://doi.org/10.1016/0966-7822(93)90020-I).
- [413] J.R. Stokes, W.J. Frith, Rheology of gelling and yielding soft matter systems, *Soft Matter* 4 (2008) 1133. <https://doi.org/10.1039/b719677f>.
- [414] P.C. Marr, A.C. Marr, Ionic liquid gel materials: applications in green and sustainable chemistry, *Green Chemistry* 18 (2016) 105–128. <https://doi.org/10.1039/C5GC02277K>.
- [415] O. Wichterle, D. Lím, Hydrophilic Gels for Biological Use, *Nature* 185 (1960) 117–118. <https://doi.org/10.1038/185117a0>.

- [416] N. Peppas, Hydrogels in pharmaceutical formulations, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50 (2000) 27–46. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(00\)00090-4](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(00)00090-4).
- [417] N.A. Peppas, Physiologically Responsive Hydrogels, *J Bioact Compat Polym* 6 (1991) 241–246. <https://doi.org/10.1177/088391159100600303>.
- [418] X. Fan, S. Liu, Z. Jia, J.J. Koh, J.C.C. Yeo, C.-G. Wang, N.E. Surat'man, X.J. Loh, J. Le Bideau, C. He, Z. Li, T.-P. Loh, Ionogels: recent advances in design, material properties and emerging biomedical applications, *Chem Soc Rev* 52 (2023) 2497–2527. <https://doi.org/10.1039/D2CS00652A>.
- [419] N. Nasirpour, M. Mohammadpourfard, S. Zeinali Heris, Ionic liquids: Promising compounds for sustainable chemical processes and applications, *Chemical Engineering Research and Design* 160 (2020) 264–300. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2020.06.006>.
- [420] P.C. Marr, A.C. Marr, Ionic liquid gel materials: applications in green and sustainable chemistry, *Green Chemistry* 18 (2016) 105–128. <https://doi.org/10.1039/C5GC02277K>.
- [421] J. Le Bideau, L. Viau, A. Vioux, Ionogels, ionic liquid based hybrid materials, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 907–925. <https://doi.org/10.1039/C0CS00059K>.
- [422] P. Wasserscheid, T. Welton, eds., *Ionic Liquids in Synthesis*, Wiley, 2007. <https://doi.org/10.1002/9783527621194>.
- [423] A.J.R. Rennie, V.L. Martins, R.M. Torresi, P.J. Hall, Ionic Liquids Containing Sulfonium Cations as Electrolytes for Electrochemical Double Layer Capacitors, *The Journal of Physical Chemistry C* 119 (2015) 23865–23874. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b08241>.
- [424] J. Le Bideau, L. Viau, A. Vioux, Ionogels, ionic liquid based hybrid materials, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 907–925. <https://doi.org/10.1039/C0CS00059K>.
- [425] K. Mishra, N. Devi, S.S. Siwal, Q. Zhang, W.F. Alsanie, F. Scarpa, V.K. Thakur, Ionic Liquid-Based Polymer Nanocomposites for Sensors, Energy, Biomedicine, and Environmental Applications: Roadmap to the Future, *Advanced Science* 9 (2022). <https://doi.org/10.1002/advs.202202187>.
- [426] L.C. Tomé, L. Porcarelli, J.E. Bara, M. Forsyth, D. Mecerreyes, Emerging iongel materials towards applications in energy and bioelectronics, *Mater Horiz* 8 (2021) 3239–3265. <https://doi.org/10.1039/D1MH01263K>.
- [427] R. Tamate, T. Ueki, A.M. Akimoto, R. Yoshida, T. Oyama, H. Kokubo, M. Watanabe, Photocurable ABA triblock copolymer-based ion gels utilizing photodimerization of coumarin, *RSC Adv* 8 (2018) 3418–3422. <https://doi.org/10.1039/C7RA13181J>.
- [428] M. Sun, Z. Zeng, L. Peng, Z. Han, C. Yu, S. Cheng, J. Xie, Ultrathin polymer electrolyte film prepared by in situ polymerization for lithium metal batteries,

Mater Today Energy 21 (2021) 100785.
<https://doi.org/10.1016/j.mtener.2021.100785>.

- [429] P. Banerjee, M. Kar, P. Dinda, T.K. Mandal, Ionic liquid-based unconventional photoinitiators for aqueous polymerization, *Eur Polym J* 162 (2022) 110870. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110870>.
- [430] T. Akyazi, J. Saez, J. Elizalde, F. Benito-Lopez, Fluidic flow delay by ionogel passive pumps in microfluidic paper-based analytical devices, *Sens Actuators B Chem* 233 (2016) 402–408. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.04.116>.
- [431] F. Benito-Lopez, R. Byrne, A.M. Răduță, N.E. Vrana, G. McGuinness, D. Diamond, Ionogel-based light-actuated valves for controlling liquid flow in micro-fluidic manifolds, *Lab Chip* 10 (2010) 195–201. <https://doi.org/10.1039/B914709H>.
- [432] Y. Hong, Z. Lin, Y. Yang, T. Jiang, J. Shang, Z. Luo, Flexible Actuator Based on Conductive PAM Hydrogel Electrodes with Enhanced Water Retention Capacity and Conductivity, *Micromachines* (Basel) 13 (2022). <https://doi.org/10.3390/mi13111951>.
- [433] P. Escobedo, C.E. Ramos-Lorente, A. Martínez-Olmos, M.A. Carvajal, M. Ortega-Muñoz, I. de Orbe-Payá, F. Hernández-Mateo, F. Santoyo-González, L.F. Capitán-Vallvey, A.J. Palma, M.M. Erenas, Wireless wearable wristband for continuous sweat pH monitoring, *Sens Actuators B Chem* 327 (2021) 128948. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128948>.