

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA  
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN  
DIRECCIÓN DE PROYECTOS**

Proyecto de Investigación  
**Circuito Integrado para la Espectroscopia Eléctrica de  
Células Humanas – Fase 2**

**INFORME FINAL**

**(DOCUMENTO 1)**

Renato Rímolo Donadio, Ingeniería Electrónica

Ronny García Ramírez  
Jose Miguel Barboza Retana  
Roberto Carlos Molina Robles  
Alfonso Chacón Rodríguez

**Cartago, Julio 2020**

## 1. Tabla de Contenido

1. Tabla de Contenido .....	2
2. Código y Título del Proyecto .....	3
3. Autores y Direcciones .....	3
4. Resumen.....	3
5. Introducción .....	4
6. Marco Teórico .....	5
7. Metodología .....	7
8. Resultados .....	9
9. Discusión y Conclusiones.....	15
Apéndices:.....	21
A.1 Publicaciones Asociadas al Proyecto .....	21

## 2. Código y Título del Proyecto

Código 1360015

**Circuito Integrado para la Espectroscopia Eléctrica de Células Humanas –  
Fase 2**

## 3. Autores y Direcciones

Renato Rimolo Donadio, Ingeniería Electrónica, [rrimolo@tec.ac.cr](mailto:rrimolo@tec.ac.cr)

Ronny García Ramírez, Ingeniería Electrónica, [rgarcia@tec.ac.cr](mailto:rgarcia@tec.ac.cr)

Alfonso Chacón Rodríguez, Ingeniería Electrónica, [alcahcon@tec.ac.cr](mailto:alcahcon@tec.ac.cr)

Jose Miguel Barboza Retana, Ingeniería Electrónica, [jmbarboza@tec.ac.cr](mailto:jmbarboza@tec.ac.cr)

Roberto Carlos Molina Robles, Ingeniería Electrónica, [rcmolina@tec.ac.cr](mailto:rcmolina@tec.ac.cr)

## 4. Resumen

El objetivo de este proyecto fue el diseñar un circuito integrado para la espectroscopia eléctrica de células humanas; el presente documento describe la fase 2, en la cual se logró, a través de metodologías de diseño en ingeniería, la fabricación del primer prototipo a nivel de circuito integrado, el diseño del circuito impreso para medición del circuito integrado y las mediciones del circuito integrado diseñado.

En comparación con sistemas disponibles comercialmente, el diseño propuesto podrá expandir a futuro el rango de frecuencias de medición, además de reemplazar equipos costosos y de gran tamaño. El reducido tamaño del circuito posibilitará su incorporación en un sistema de medición para automatizar la caracterización de gran cantidad de muestras bajo las mismas condiciones, facilitando a biólogos y médicos la validación estadística de sus estudios.

El proyecto se desarrolló en colaboración con la Universidad Técnica de Hamburgo, en el marco del proyecto ZellCharm, un proyecto de mayor envergadura liderado por esta universidad.

## Palabras Clave

microelectrónica, espectroscopia de impedancia eléctrica, circuitos integrados, dispositivos médicos, circuitos en alta frecuencia.

## 5. Introducción

El método más común de caracterización de células en la biología y la medicina es el uso de marcadores de fluorescencia (etiquetas). Sin embargo, este es un proceso lento y que además puede degradar las células, dificultando o impidiendo su uso en pruebas posteriores.

El comportamiento eléctrico de una muestra de cualquier tipo (célula, líquido, componente electrónico, etc.) con respecto a la frecuencia se conoce como el espectro de impedancia. La técnica de medición de esta característica se conoce como espectroscopía de impedancia eléctrica (EIS: Electrical Impedance Spectroscopy). Esta técnica encuentra múltiples usos en la biotecnología y la medicina: pruebas toxicológicas [1]-[2], diagnóstico médico [3]-[6], investigación básica de propiedades celulares, viabilidad y concentración celular, caracterización de tejidos [7], caracterización de biomasa en procesos biotecnológicos [8]-[9], estudio de células madre, pruebas de medicamentos [10] y terapias químicas personalizadas [11], entre otros. Por sus aplicaciones, también reduce la necesidad de utilizar animales para pruebas de medicamentos. Como alternativa a los métodos de marcadores de fluorescencia, la espectroscopía de impedancia constituye un método de bajo costo, no invasivo y que proporciona datos en tiempo real y sin dañar a las células, constituyendo una herramienta valiosa y versátil para la mejora de la salud humana. [12].

Para aprovechar todo el potencial de esta técnica, se requiere automatizar la medición de muchas muestras y ampliar el rango de frecuencias para la medición. Para resolver esta necesidad, se propone aquí el diseño de un circuito integrado para la medición de impedancia en un amplio rango de frecuencias de medición (1kHz – 10 GHz), basándose en la hipótesis de que la reducción del tamaño del circuito de medición, así como de la longitud de sus conexiones con la muestra, permite disminuir significativamente los efectos indeseables que afectan las mediciones a alta frecuencia. Este circuito integrado, en fases posteriores, puede ser de gran ventaja para biólogos y médicos por las siguientes razones:

1. Pone a disposición de los investigadores una mayor cantidad de valores de frecuencia para elegir según las necesidades de sus experimentos. Así, pueden elegir entre valores específicos de frecuencia baja, intermedia o alta, además de un barrido de frecuencias.
2. A frecuencias altas se facilita el estudio de propiedades celulares que no pueden observarse a bajas frecuencias, puesto que se disminuye el efecto de la membrana celular en la medición y así se posibilita estudiar las características de las sustancias y organelas en el interior de las células.
3. Hace posible la creación de sistemas de medición de varias muestras y a alta frecuencia, puesto que el tamaño del circuito permite que el sistema de medición se ubique en la cercanía inmediata de las muestras, con lo que se reducen mucho los efectos eléctricos parásitos que afectarían la medición. Los sistemas comerciales para medición de impedancia de células realizan mediciones en varias muestras, pero tanto en el caso de una única muestra como en el caso de varias, la frecuencia máxima está usualmente por debajo de 100kHz.

4. La medición de varias muestras con pocos minutos de diferencia de medición entre ellas es necesaria para obtener datos estadísticamente significativos para entender el comportamiento de las células, puesto que garantiza las mismas condiciones de edad celular, así como las mismas condiciones eléctricas y ambientales en la medición.
5. Se reduce el tiempo de medición, acelerando estudios de diagnóstico de enfermedades, toxicidad y efectividad de medicamentos.
6. Dado que las células no sufren daño alguno, pueden continuar utilizándose en experimentos posteriores.

Este proyecto se presenta en el marco de la colaboración académica entre el Instituto de Nano y Biomedicina de la Universidad Técnica de Hamburg (TUHH) y la Escuela de Ingeniería Electrónica del ITCR. En esta fase del proyecto se trabajó en la conclusión del diseño, la fabricación a nivel de circuito microelectrónico y la validación de un prototipo físico. Se consideró un sistema para generación de espectros de impedancia a partir de señales eléctricas provenientes de sensores por el método de mezcla de frecuencias en el rango de 1kHz a 10 GHz. A diferencia de las soluciones disponibles en el mercado, el ancho de banda del diseño propuesto es mucho más amplio y se concibió para ser adaptado a sistemas de muestras en paralelo que faciliten el proceso de toma de datos.

## **6. Marco Teórico**

Una manera de probar medicamentos es realizando pruebas con células. Tradicionalmente, estas pruebas requieren el uso de marcadores de fluorescencia que pueden causar interacciones indeseadas e incluso imprevisibles que pueden conducir al investigador a conclusiones falsas. Además de esto, el uso de etiquetas puede requerir modificación genética de las células que se van a utilizar en los ensayos. Esta modificación genética puede alterar el comportamiento celular de manera que los estudios se ven alterados.

La espectroscopia de impedancia eléctrica se presenta entonces como una alternativa para realizar pruebas de medicamentos, midiendo la resistencia de las células a la corriente alterna (impedancia eléctrica) y evitando el uso de marcadores, tintes, reactivos especializados o células modificadas. Esto permite reducir los costos de prueba, simplifica los ensayos, reduce los tiempos de preparación de muestras y permite el uso de células no alteradas en los ensayos. Así, los investigadores pueden concentrarse en el uso de los tipos de células relevantes para la enfermedad a estudiar y no en las células que pueden resistir el uso de etiquetas, logrando datos de mayor relevancia biológica y médica para enfermedades tan importantes como diabetes, obesidad, cáncer, inflamaciones, desórdenes neuromusculares, dolores patológicos o desórdenes psiquiátricos.

Las características eléctricas de una célula dependen del flujo de corriente eléctrica fuera de la célula (a baja frecuencia) y dentro de la célula (a alta frecuencia). Las células cancerosas muestran una impedancia más baja que la de las células sanas debido a que presentan un mayor contenido de agua y sales [13], cambios en su densidad y en la permeabilidad de la membrana [14]. Además de detectar la enfermedad [3]-[6] puede determinarse su grado de avance al observar cambios en la membrana celular, que se traducen en una “firma eléctrica” de las células enfermas [15]. En el caso de la toxicología, a baja frecuencia pueden detectarse

los cambios en la morfología celular (pequeños daños a la célula), mientras que a mayores frecuencias se detecta la muerte celular [1].

El espectro de impedancia de células se divide en rangos de frecuencia, cada uno de los cuales se relaciona con características de ésta. En la región  $\alpha$  (10Hz-1kHz) pueden estudiarse los ácidos nucleicos, las vesículas, y la membrana. En la región  $\delta$  (entre 1kHz y 10MHz) pueden estudiarse además proteínas, aminoácidos, fluidos celulares libres de proteína, la membrana y organelas. En la región  $\gamma$  (entre 10MHz y 1GHz) pueden observarse el comportamiento del agua y los electrolitos, aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y organelas con más detalle. En la región  $\delta$  el agua y los electrolitos dejan de observarse y pueden observarse aún más detalladamente los fenómenos estudiados en la región  $\gamma$ . [16]. Es evidente entonces que al aumentar las frecuencias de medición pueden realizarse estudios celulares más completos. Además, al aumentar la frecuencia se reducen los efectos parásitos en la interfaz entre el líquido (medio de cultivo para las células) y el contacto eléctrico para la medición.

Por otra parte, cabe destacar que la máxima sensibilidad en mediciones eléctricas para la detección de concentración de células en una muestra se obtiene alrededor de los 3GHz [17], logrando niveles de sensibilidad con los que puede llegar a detectarse incluso la presencia de una única célula en una muestra, así como monitorizar de manera muy precisa la multiplicación celular.

Actualmente, la espectroscopia de impedancia es también conocida como ECIS (Electric Cell-Substrate Impedance Spectroscopy, por sus siglas en inglés) [18]-[22],[2]. En esta técnica se cultivan células sobre contactos eléctricos de oro de una geometría particular conocida como “interdigitada”, y se mide el cambio en la impedancia de los contactos ante el crecimiento de las células, como una medida indirecta de la reproducción celular y principalmente se ha utilizado para mediciones a baja frecuencia, aunque también se han utilizado contactos interdigitados para diferenciar células vivas de células muertas a alta frecuencia [24].

Existen diversas configuraciones y técnicas para implementar un circuito de medición de impedancia. Para su aplicación en biología y medicina, existen en el mercado el circuito AD5933 y AD5934 de Analog Devices (hasta 100kHz) y AFE4300 de Texas Instruments (1MHz). Entre los proveedores de equipo para espectroscopia de impedancia o equipo basado en esta técnica están Bionas, Cellasys (10kHz), Ibidi/Applied Biophysics (ECIS, hasta 100kHz), Molecular Devices (CellKey, 1kHz-10MHz) [25], nanoAnalytics (CellZscope, hasta 100kHz) [26] y Roche Diagnostics (xCELLigence, 50kHz) [27].

En la primera parte de esta investigación se realizó una revisión del estado del arte [28], la cual arrojó, que no se habían implementado a la fecha sistemas de espectroscopia por impedancia eléctrica en un ancho de banda tan amplio como el propuesto. A nivel académico se reconocen trabajos en los que se desarrollan circuitos integrados que buscan ampliar el rango de frecuencia máximo de medición de la espectroscopia por impedancia eléctrica en canales sencillos hasta varias decenas de GHz [29] –[34], [11] – [12]. Para frecuencias altas, muchas veces se recurre al uso de analizadores vectoriales de redes [12],[34], lo cual hace imposible ir alternando de forma rápida la medición de varias muestras de células, dado que

cada vez que se quiere medir otra muestra debe quitarse la muestra actual, conectar la siguiente y volver a calibrar. Este es un proceso manual, tedioso y lento. Para la medición de varias muestras, ya sea en forma simultánea o con corto tiempo de diferencia entre mediciones de diferentes muestras, se necesitaría contar con varios analizadores vectoriales de redes. Además, estos analizadores son aparatos de gran tamaño y alto costo. Existen también a nivel académico algunos esfuerzos para la implementación de sistemas multicanal para la aplicación de EIS, sin embargo, estos sistemas están propuestos para trabajar en rangos de frecuencia bajos menores a 10MHz [35] y en otros casos además de plantear frecuencias de operación bajas no proponen soluciones a nivel de circuito integrado [36], lo cual requiere también el uso de equipo de laboratorio costoso.

## 7. Metodología

Se aplicó la metodología de diseño en ingeniería tanto para el cierre del diseño del circuito integrado, como para el diseño de la plataforma de interconexión y pruebas. Para el diseño del circuito integrado se utilizó la herramienta de diseño para circuitos integrados de Mentor Graphics, con el kit de diseño del proceso CMOS de 0.13  $\mu\text{m}$  de Global Foundries (IBM) 8RF. Este kit es provisto por el servicio de fabricación académica estadounidense MOSIS, del cual el ITCR es miembro.

Para el desarrollo del circuito microelectrónico se aplicó la metodología del flujo de diseño analógico “top-bottom”. Este consiste en una representación de los bloques que conforman el diseño, pasando por diferentes niveles de abstracción, desde el nivel de transistores hasta la representación y simulación del diseño completo, incorporando luego la representación geométrica (diseño físico) del sistema. La primera fase del proyecto consistió en el acondicionamiento del diseño para que pasara las pruebas necesarias que pide el fabricante. El diseño elaborado se exportó para su fabricación a un formato GDSII (Graphic Data Stream 2), el cual contiene las especificaciones físicas del diseño que se envió a fabricación en agosto del año 2017. El envío se realizó a través del servicio MOSIS, quienes consolidan la oblea multiproyecto para ser enviado a la fábrica, actividad que tarda aproximadamente tres meses en la fabricación. El proyecto se logró materializar bajo una solicitud MEP-Research, financiada por MOSIS, y luego de diversos problemas con el envío, el prototipo físico se recibió en mayo del año 2018.

Para proceder con la fase de pruebas, se procedió a diseñar la plataforma de pruebas eléctricas, que incluye tarjetas de circuito impreso, empaquetado del circuito integrado, conectores, componentes pasivos, entre otros. La plataforma de pruebas es la interfaz entre el circuito integrado fabricado y los equipos de medición de laboratorio. Este diseño no es trivial dado que tiene que cubrir un rango de hasta 10 GHz, lo cual implica el diseño cuidadoso para preservar la integridad de las señales y referencias de alimentación. Este proceso requirió software especializado de simulación electromagnética (Ansys HFSS) y un software de diseño de placas de circuito impreso multicapa (Altium Designer).

El diseño de la geometría de interconexiones se acompaña de las simulaciones electromagnéticas con el fin de asegurarse que el diseño vaya a funcionar en alta frecuencia, principalmente mediante extracción de parámetros S y simulación del enlace en el dominio

del tiempo. Previo al diseño se debe definir qué interfaces se utilizarán para interconectar el circuito integrado y los equipos de medición. El diseño contempló el enrutamiento desde los accesos (conectores) para el equipo de medición hasta las entradas del chip (pads) para todas las señales de datos y control, así como el diseño de la red de distribución de poder para alimentar el circuito integrado y proveer una adecuada referencia y otros voltajes/corrientes de control necesarios.

El diseño de las placas de PCB se envió a fabricación con un proveedor externo (PCB Way), quien recibe los archivos de diseño en formato “gerber” con el trazado físico de las placas y hace la fabricación. Para este paso también se requieren algunos meses y se le dio seguimiento al proceso con el proveedor. Es necesario utilizar un proveedor externo dado que no se cuenta con el equipo en el ITCR para crear tarjetas multicapas de alta resolución que puedan trabajar en el rango de GHz.

Una vez recibidos los circuitos impresos, el siguiente paso fue realizar el montaje de los componentes (conectores, elementos pasivos, etc.) y del circuito integrado, lo que conforma el subsistema que puede ser medido en el laboratorio y permitirá verificar el comportamiento del circuito integrado diseñado.

Finalmente, con el circuito integrado y la plataforma de pruebas implementados, se procedió a diseñar un banco de pruebas basado en la plataforma PXI y el software Labview, para la automatización de las mediciones. Las pruebas se dividen en pruebas funcionales y pruebas de desempeño, las cuales se utilizan para concluir si la fabricación y el diseño fueron exitosos. Otro equipo de laboratorio fue necesario en la caracterización, como fuentes de corriente y tensión, osciloscopios y un analizador vectorial de redes (VNA). Las pruebas involucraron las siguientes actividades:

- a. Verificación de punto de operación del circuito integrado: se aplicará la alimentación de corriente directa y se medirá la corriente consumida y se comparará con los valores obtenidos en las simulaciones, para verificar que sean los adecuados para el circuito
- b. Verificación del oscilador controlado por voltaje: para esto se utilizará un analizador de espectros. Se medirá la frecuencia de oscilación máxima y mínima del oscilador. Se modificará la tensión de control, aumentándola desde su valor mínimo hasta el máximo previsto en la simulación y se medirá la frecuencia obtenida para cada valor de tensión para reconstruir la curva tensión-frecuencia y compararla con la obtenida en la simulación.
- c. Verificación de vacío: se dejarán las salidas al aire (sin conectar ningún circuito a la salida) y se medirán los valores de tensión de salida del circuito integrado y se compararán con los obtenidos en la simulación
- d. Calibración del sistema de medición, para establecer los rangos de operación y respuesta en frecuencia del circuito.
- e. Verificación con valores de impedancia de referencia: Se conectarán diferentes impedancias de carga conocidas a la entrada del circuito integrado, procurando variaciones de magnitud y ángulo.

Cabe destacar que debido a los costos implicados en la fabricación del circuito integrado y la plataforma de pruebas no sería posible aún realizar una validación estadística con una gran cantidad de ejemplares del circuito; el objetivo de las pruebas fue solamente mostrar que el



circuito cumple o no con los requerimientos de diseño planteado para una o pocas muestras fabricadas.

## 8. Resultados

Este proyecto surgió como una iniciativa colaborativa con la Universidad Técnica de Hamburgo, en Alemania, que inició el trabajo en el tema con una propuesta general [37] y trabajos preliminares [38]-[39], coordinada inicialmente por la Dra. Paola Vega. Se identificó luego de esas etapas iniciales la necesidad de explorar un diseño con mayor ancho de banda y capacidad para extenderse a múltiples canales, lo que constituye el objetivo de esta iniciativa.

Como parte de las actividades del proyecto, se realizó primero una investigación sobre arquitecturas para EIS, con el fin de definir la mejor solución para el diseño a desarrollar [40]. Aunque se consideró que una arquitectura basada en adquisición y conversión analógica digital puede ser una solución más eficiente y precisa, las dificultades para su implementación dirigieron la atención a una estructura analógica basada en el principio de mezcla en frecuencia y amplificación del tipo “lock-in”.

En la figura 1 se muestra el diagrama general del diseño propuesto a nivel de circuito integrado para un canal sencillo, donde una implementación compacta se utiliza para reducir los requerimientos de espacio. En la Figura 2 se visualiza su correspondiente diseño físico. La estructura consiste en un “front-end” analógico con un amplificador de bajo ruido, un mezclador diferencial y un filtro paso bajo Gm-C. Para alcanzar el ancho de banda de 10 GHz el amplificador de bajo ruido utiliza inductores, identificados como los cuatro elementos más grandes en la vista del diseño físico. Los detalles de la implementación pueden ser consultados en [41]-[42] (Ver apéndice A.1).

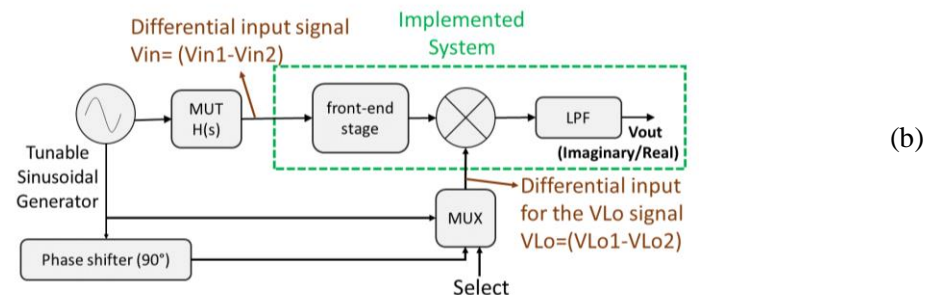
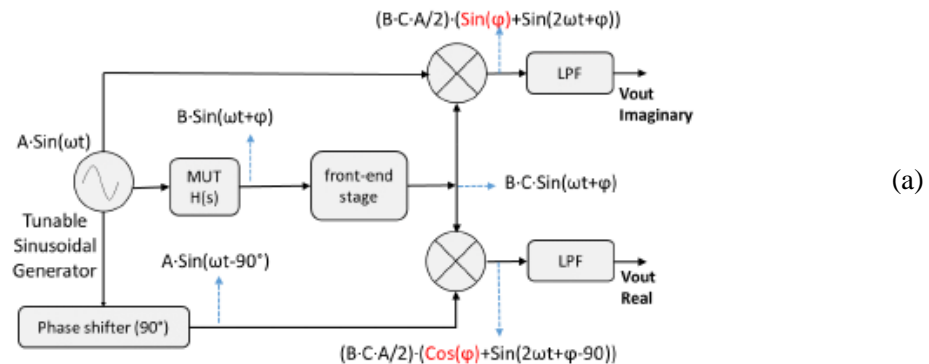


Figura 1. Estructura de la arquitectura implementada para un canal de adquisición (a) y su versión compacta para ahorro de área (b).

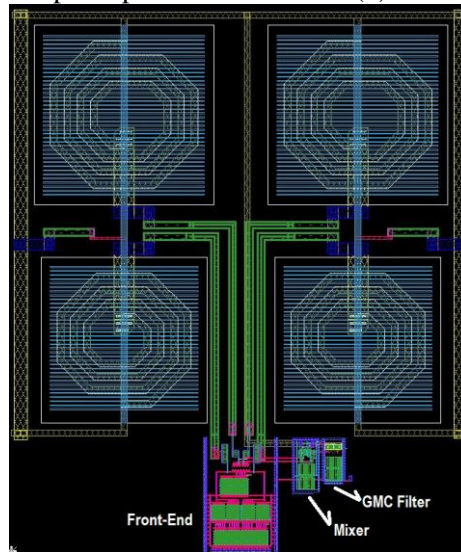
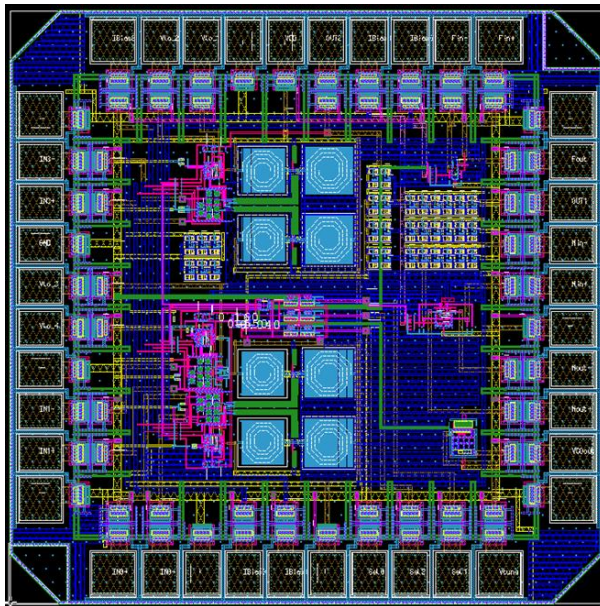
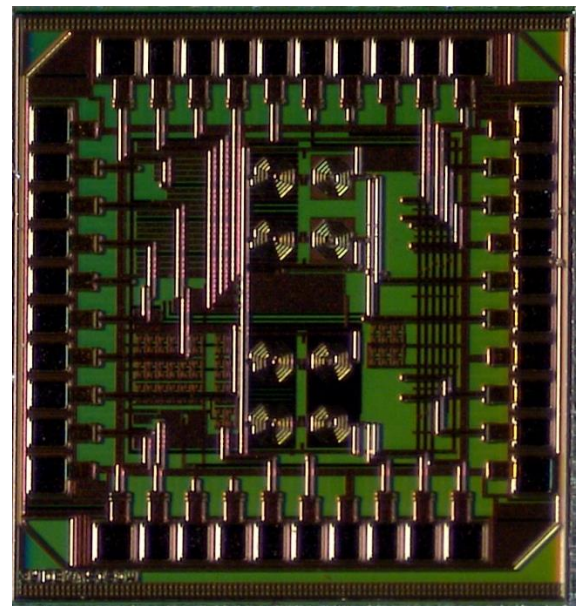


Figura 2. Diseño físico del diseño implementado para un canal de adquisición.

Este diseño se incorporó a un proyecto para fabricación MPW (de oblea multiproyecto) en un área de 1.5x1.5 mm, como se muestra en la Figura 3(a). El diseño fue fabricado a través del servicio de fabricación de MOSIS (<https://www.mosis.com/what-is-mosis>) en el proceso CMOS de 180nm 8RF de Global Foundries (anteriormente IBM). La Figura 3(b) muestra el prototipo fabricado.



(a)



(b)

Figura 3. Diseño enviado a fabricación: (a) vista general del diseño físico y (b) fotografía del prototipo fabricado.

El diseño consolidado consiste en cuatro canales de espectroscopia por impedancia eléctrica, como los de la Figura 1, que son seleccionados a través de un multiplexador analógico y bancos de transistores que habilitan o deshabilitan las etapas. Se comparten la salida y señal de referencia de control debido al número disponible de pads. Además, se incorporan sitios de prueba incluyen las etapas individuales de canal de espectroscopia: un oscilador de anillo ajustable, un amplificador de transconductancia (utilizado en el filtro) y un mezclador. El diseño y el número de sitios que se pudo incorporar estuvo limitado a los 40 pads disponibles en el área máxima de 1.5x1.5 mm.

Los diseños fueron validados previamente a la fabricación con simulaciones funcionales y analógica a nivel *postlayout*, incluyendo la revisión de reglas del proceso, esquemático contra diseño físico y extracción. El diseño fue aprobado por el servicio MOSIS, que también ejecuta las pruebas de manufactura antes de aceptar el diseño para fabricación.

Seis de las 80 muestras disponibles fueron empaquetadas en un formato QFP-40 para pruebas en baja frecuencia. La figura 4 muestra el circuito colocado en uno de los empaquetados. Para realizar las pruebas se procedió a diseñar la plataforma de interconexión para el circuito integrado, con dos versiones para pruebas en baja y alta frecuencia, que utilizan la versión del chip empaquetado y el “*die*” directamente conectado a la tarjeta a través de *wire bonding*. Las vistas de diseño y PCBs fabricados se detallan en la Figura 5, mientras que el diseño con componentes de muestra en la Figura 6. Los detalles del diseño y las pruebas para la plataforma de interconexión se pueden consultar en [43].

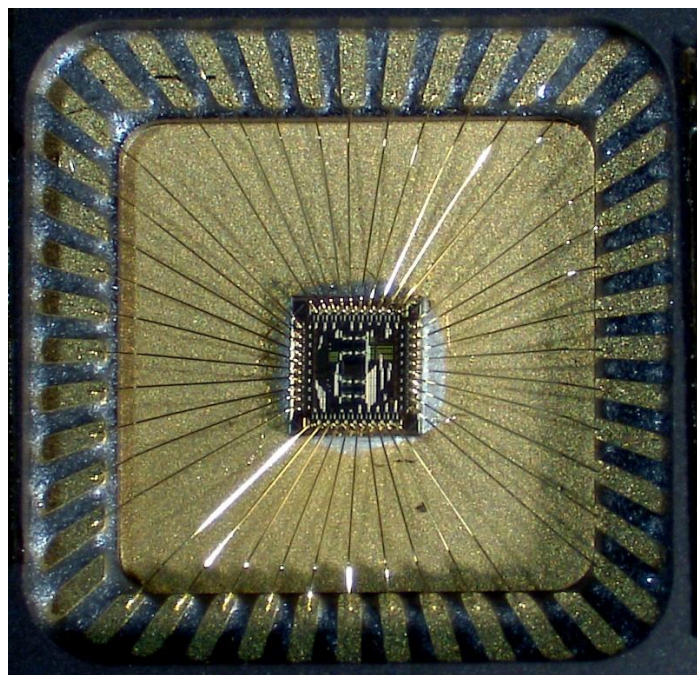


Figura 4. Prototipo empaquetado, que utiliza la técnica de *wire bonding*.



Figura 6. Plataforma de interconexión con componentes, (a) versión empaquetada y (b) montaje en equipo de wirebonding para versión en alta frecuencia.

Para la validación, se desarrolló un banco de pruebas basado en la plataforma PXI de National Instruments, que es controlada con el software Labview para la ejecución de las pruebas automatizadas, la cual se muestra en la figura 7. Para la validación de las etapas individuales se realizaron diferentes pruebas que demuestran la funcionalidad del circuito fabricado (Figura 8) [42]-[43].

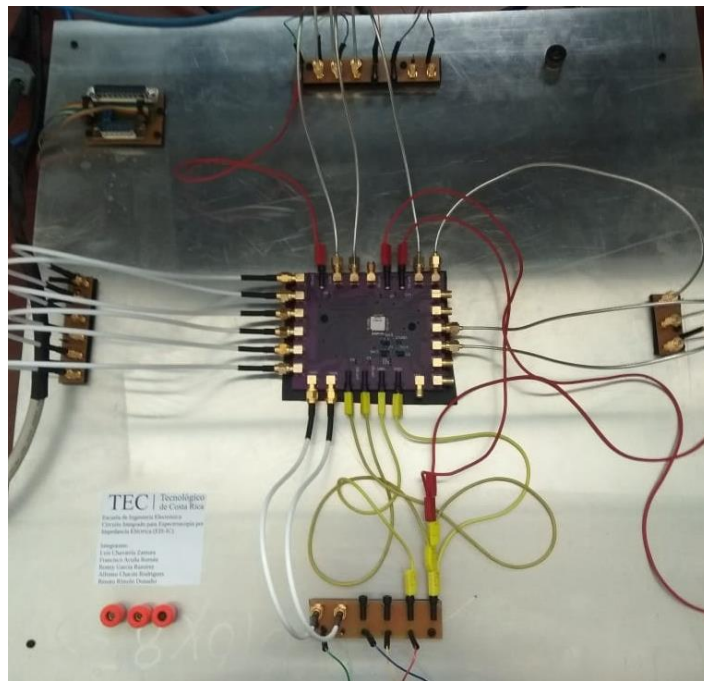
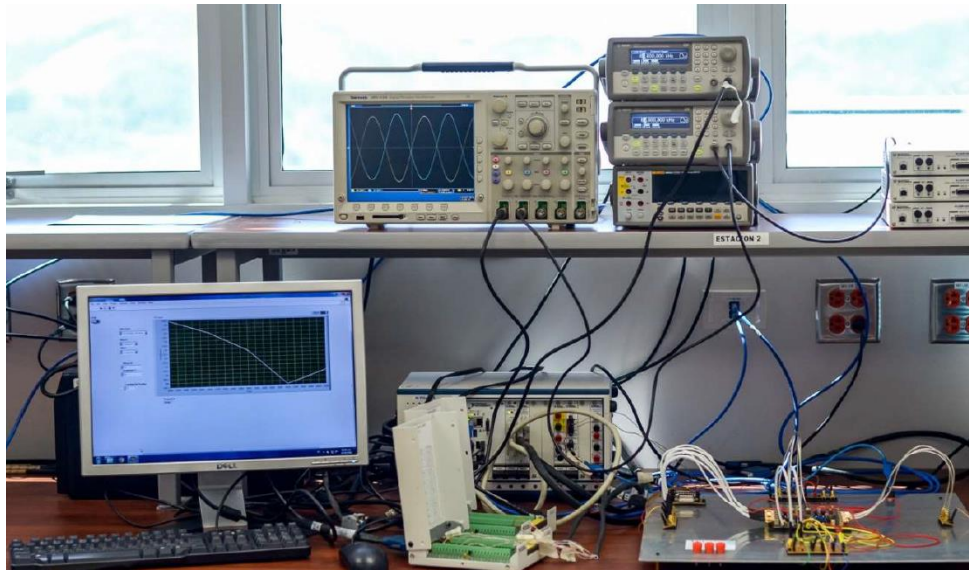


Figura 7. Sistema de pruebas desarrollado para la verificación del circuito integrado (a) equipos de medición y control, (b) vista de una de las tarjetas de prueba conectada.

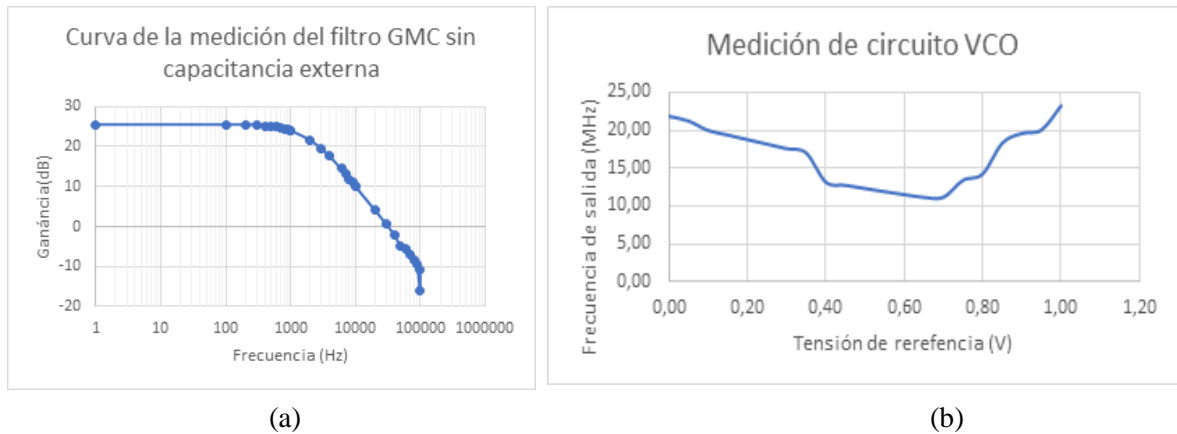


Figure 8. Algunos resultados de medición del circuito integrado: (a) respuesta del filtro GmC, (b) respuesta del oscilador de anillo ajustable.

Debido a un problema con la ubicación de los bloques de habilitación de las diferentes etapas, no fue posible medir el canal completo; sin embargo, los procedimientos y mediciones de referencia con un analizador vectorial (VNA), con un ancho de banda de hasta 20 GHz, sí se realizaron. Para esto se usaron resistencias de referencia y un sensor desarrollado en el proyecto afín “Diseño e Implementación de un Sistema de Espectroscopía de Impedancia Eléctrica para Aplicaciones en Bioingeniería”. La Figura 9 muestra la imagen del sensor y algunos resultados de muestra que son reportados en el informe de dicho proyecto, donde se logró diferenciar entre muestras de diferentes soluciones.

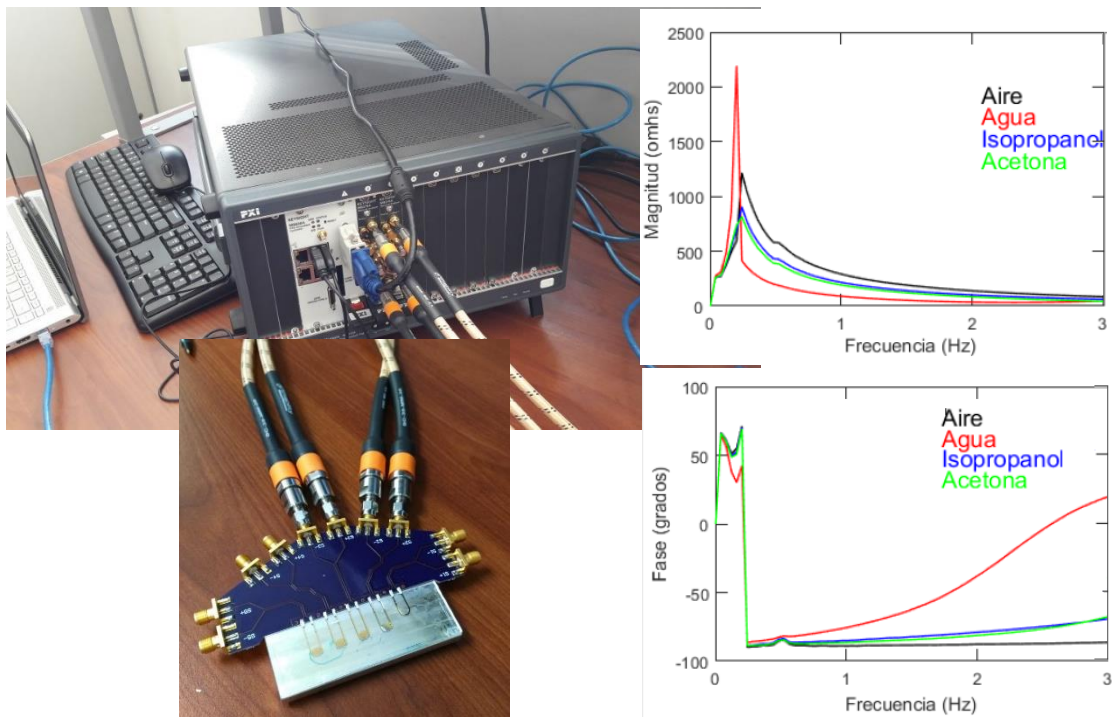


Figura 9. Mediciones de referencia con un VNA, tarjeta de adaptación y sensor en microfluídica.

A raíz del trabajo en este proyecto y esfuerzos del DCILab que están explorando diseño de circuitos microelectrónicos en alta frecuencia, se consolida un entorno de trabajo que consiste en la simulación de estímulos a nivel de comportamiento, la valoración de las etapas analógicas bajo el flujo de diseño de circuitos integrados y la posibilidad de insertar modelos de interconexión para describir componentes externos al circuito integrado. Este entorno se ilustra en la Figura 10 y se reporta en [44].

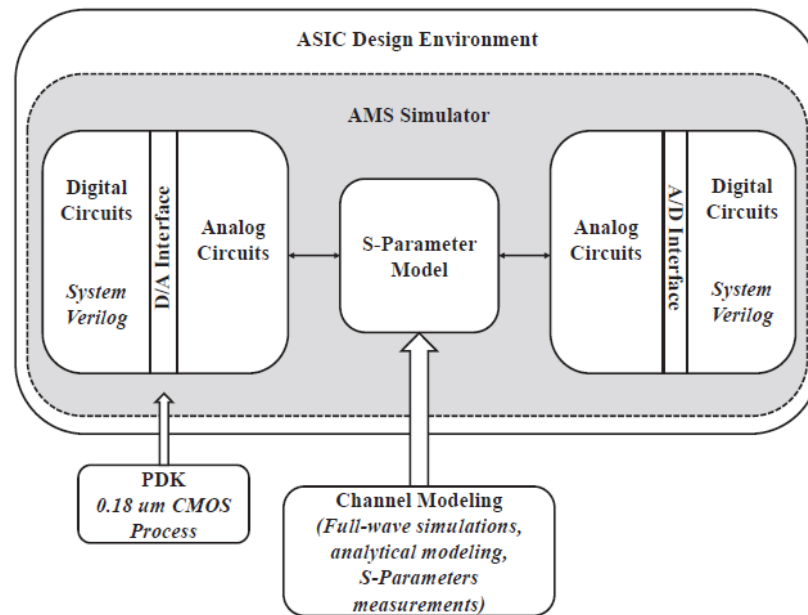


Figura 10. Entorno de diseño y validación presilicio de circuitos integrados en alta frecuencia [44].

## 9. Discusión y Conclusiones

En el presente proyecto se ha desarrollado un diseño de circuito integrado para la aplicación de Espectroscopia por Impedancia Eléctrica en el rango de frecuencia desde 1 kHz hasta 10 GHz. El circuito se desarrolló en una tecnología CMOS de 130 nm utilizando el principio de mezcla en frecuencia y amplificación selectiva.

En relación con el cumplimiento de los objetivos se concluye que:

1. Se logra concretar el prototipo físico a nivel circuito integrado y la plataforma de interconexión, lo que permite validar las metodologías de diseño utilizadas y que pueden ser utilizadas a futuro en otras iniciativas
2. Se comprueba el funcionamiento del circuito integrado a través de un banco de pruebas desarrollado para este diseño en específico. Esto permite determinar que el concepto de diseño es viable y que las metodologías de diseño y validación prefabricación y pruebas físicas son funcionales.

3. Se logró comprobar la funcionalidad de etapas por separado y se realizaron mediciones de referencia con un analizador vectorial de redes, como se detalla a continuación.

Se destaca como logro del proyecto el brindar una solución completa para la aplicación EIS a nivel de diseño, la cual puede ser extendida a múltiples canales. De la fase de diseño e implementación se han derivado tres publicaciones de conferencia IEEE (incorporadas a IEEE Xplore e indexadas en Scopus), una tesis doctoral, una tesis de maestría y múltiples proyectos de graduación de Licenciatura. El diseño ha sido sometido a protección del trazado ante el Registro Nacional, siendo la primera solicitud de este tipo en la historia de Costa Rica.

El trabajo se llevó hasta validación de prototipo funcional, logrando comprobarse el funcionamiento de etapas individuales. Sin embargo, el canal completo de espectroscopia no pudo ser validado debido a un problema con los interruptores para selección de las etapas que no permitió ajustar niveles de referencia y calibrar las etapas. Para validar el diseño se requeriría una fabricación adicional corrigiendo este problema, que es de fácil solución, pero a la fecha no se cuenta con el financiamiento para realizarlo.

Este proyecto involucró la puesta en marcha de las herramientas y flujos de diseño, el acondicionamiento de los circuitos para ser enviados a fabricación, el seguimiento a la fabricación y la fase de pruebas con el consecuente diseño eléctrico con tarjetas de circuitos impresos y equipos de medición avanzados. El circuito integrado diseñado fue el **tercer** circuito integrado fabricado por entes académicos en la historia de Costa Rica, precedido por el TUHCR en 2006 [45]-[46] y el diseño consolidado por el DCI Lab en 2008 [47]-[49]; el DCI Lab es actualmente el único laboratorio con capacidad de diseño y desarrollo de prototipos de circuitos microelectrónicos complejos a nivel centroamericano.

Una contribución importante del proyecto es el establecimiento de un ambiente de trabajo de diseño y desarrollo de circuitos integrados de aplicación específica (herramientas, kits de diseño, metodologías), la cual puede ser aplicada a otros proyectos. Actualmente se benefician de la experiencia y trabajo creado en esta iniciativa varios proyectos, entre los cuales se pueden mencionar: “Circuitos e Interconexiones Tolerantes a Fallas para Dispositivos Biomédicos Implantables”, “Procesador RISC-V en HV para aplicaciones médicas”, “Diseño e Implementación de Interfaces de Comunicación de Alta Velocidad para Dispositivos Médicos a la Medida”, y “Diseño de Arquitecturas Multinúcleo para Aplicaciones de Procesamiento Masivo de Datos”. Todos estos proyectos involucran colaboradores internacionales y la consecución de fondos para el desarrollo de un procesador de aplicación específica que actualmente está en fase de validación [50]-[53].

## Referencias

[1] Meissner, R. Disertación: Impedance spectroscopy for in vitro toxicology. École Polytechnique Fédérale de Laussane, Suiza, 30 de agosto de 2013.



- [2] Curtis, T. et al. Improved cell sensitivity and longevity in a rapid impedance-based toxicity sensor. *Journal of Applied Toxicology*. 2009
- [3] Kim, H. et al. (2009) Whole cell impedance analysis of metastatic and non-metastatic cancer cells. *IEEE 22nd International Conference on Micro Electro Mechanical Systems*, 2009, pp 399-402.
- [4] Qiao, Y et al. (2012) Bioimpedance Analysis for the characterization of Breast Cancer Cells in Suspension (Vol. 59, No. 8, pp. 2332-2329). *IEEE Transactions on biomedical engineering*.
- [5] Aberg, P. et al. Skin Cancer Identification Using Multifrequency Electrical Impedance—A Potential Screening Tool, *IEEE Transactions on biomedical engineering*, Vol. 51, No. 12, December 2004, pp. 2097-2102.
- [6] O'Rourke, A. et al. Dielectric properties of human normal, malignant and cirrhotic liver tissue: in vivo and ex vivo measurements from 0.5 to 20 GHz using a precision open-ended coaxial probe. *Phys. Med. Biol.* 52 (2007) 4707–4719
- [7] Jäger, M. et al. Impedance Measurements in Cell Cultures on Polymer Slides. *IEEE 2006 Electronics System Integration Technology Conference*, pp. 1203-1208.
- [8] Nacke, T. et al. Anwendungsmöglichkeiten der Impedanzspektroskopie in der Biotechnologie. *Technisches Messen Plattform für Methoden, Systeme und Anwendungen der Messtechnik* Vol. 69, Iss. 1/2002, pp. 12–18.
- [9] Hautmann, S. y Müller, J. In-situ biomass characterization by impedance spectroscopy using a full-bridge circuit. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 24, 2001, pp. 137-141.
- [10] Asphahani, F. et al. Cellular Impedance Biosensors for Drug Screening and Toxin Detection. *Analyst*. 2007 September; 132(9): 835–841.
- [11] Grenier et al. Recent Advances in Microwave-Based Dielectric Spectroscopy at the Cellular Level for Cancer Investigations. *IEEE Transactions on Microwave theory and techniques*, Vol. 61, No. 5, May 2013, pp 2023-2030.
- [12] Grenier, K. et al. Microwave Dielectric Spectroscopy: an emerging analyzing technique for biological investigations at the cellular level. *2013 IEEE Topical Conference on Biomedical Wireless Technologies, Networks, and Sensing Systems (BioWireleSS)* , 2013, pp 40-42.
- [13] Sha, L. et al. A Review of Dielectric Properties of Normal and Malignant Breast Tissue. *Proceedings of the 2002 IEEE South East Conference*, pp. 457-462.
- [14] Zou, Y. e. (2003). A review of electrical impedance techniques for breast cancer detection (Vols. 25, 79-90). *Medical Engineering Physics*.
- [15] Han, A. E. (2007). Quantification of the heterogeneity in breast cancer cell lines using whole-cell impedance spectroscopy (Vols. 13:139–143). *Clinical Cancer Research*.
- [16] Gregory, W. et al. The Cole relaxation frequency as a parameter to identify cancer in breast tissue. *Medical Physics*, Vol. 39, No. 7, July 2012.

- [17] Chen, T. et al. Accurate nanoliter liquid characterization up to 40GHz for Biomedical Applications: toward noninvasive living cells monitoring. *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques*, Vol. 60, No. 12, Diciembre 2012.
- [18] Wegener, J. K. (2000). Electric Cell–Substrate Impedance Sensing (ECIS) as a Noninvasive Means to Monitor the Kinetics of Cell Spreading to Artificial Surfaces (Vols. 259, 158–166). *Experimental Cell Research*.
- [19] Abdur, A. e. (2009). A Detailed Model for High-Frequency Impedance Characterization of Ovarian Cancer Epithelial Cell Layer Using ECIS Electrodes (Vol. 56). *IEEE TRANSACTIONS ON BIOMEDICAL ENGINEERING*.
- [20] Rädler, U. e. (2009). Impedanzbasiertes Screening adhärenter Zellen (Vols. 5, 2009). *BIOspektrum*, 535-537.
- [21] Siddiquei, H. e. (2010). Electrical Cell-substrate Impedance Sensing (ECIS) based Biosensor for Characterization of DF-1 Cells. Kuala Lumpur, Malaysia: International Conference on Computer and Communication Engineering.
- [22] Yúfera, A. e. (2011). Cell Biometrics Based on Bio-Impedance Measurements. (G. e. Chetty, Ed.) *InTech*.
- [23] Price, D. e. (2012). Characterization of Cancer Cells Using Electrical Impedance Spectroscopy. *Biosensors and Molecular Technologies for Cancer Diagnostics*, 559–572, Taylor and Francis.
- [24] Dubuc, D. et al. Microwave-based biosensor for on-chip biological cell analysis. *Analog Integrated Circuits and Signal Processing* (2013) 77:135–142.
- [25] (Cellkey) [www.moleculardevices.com/Products/Instruments/Label-Free-Analysis/CellKey-384.html](http://www.moleculardevices.com/Products/Instruments/Label-Free-Analysis/CellKey-384.html)
- [26] (CellZScope) [www.nanoanalytics.de/de/hardwareprodukte/cellzscope/literatur/TN\\_cZs\\_How\\_it\\_Works.pdf](http://www.nanoanalytics.de/de/hardwareprodukte/cellzscope/literatur/TN_cZs_How_it_Works.pdf)
- [27] (xCELLigence) [www.biotech-europe.eu/files/pdf/RTCA\\_SP\\_MP\\_ACEA\\_LoRes.pdf](http://www.biotech-europe.eu/files/pdf/RTCA_SP_MP_ACEA_LoRes.pdf)
- [28] R. García-Ramírez, et al., “**Review on CMOS Circuit Architectures for Electrical Impedance Spectroscopy**”, in *Proc. IEEE Central America and Panama Covention (Concapan 2016)*, San José, Costa Rica, november 9-11, 2016.
- [29] Chien, J. C., Anwar, M., Yeh, E. C., Lee, L. P., & Niknejad, A. M. (2013). A 1-50 GHz dielectric spectroscopy biosensor with integrated receiver front-end in 65nm CMOS. *IEEE MTT-S International Microwave Symposium Digest*, 0-3. <http://doi.org/10.1109/MWSYM.2013.6697466>
- [30] Bajestan, M. M., Member, S., & Helmy, A. A. (2014). A 0.62 – 10 GHz Complex Dielectric Spectroscopy System in m CMOS, *62(12)*, 3522–3537.
- [31] Bakhshiani, M., Suster, M. a., & Mohseni, P. (2014). A broadband sensor interface IC for miniaturized dielectric spectroscopy from MHz to GHz. *IEEE Journal of Solid-State Circuits*, 49(8), 1669–1681. <http://doi.org/10.1109/JSSC.2014.2312415>
- [32] Elhadidy, O., Shakib, S., Krenek, K., Palermo, S., & Entesari, K. (2014). A 0.18-  $\mu$  m CMOS Fully Integrated 0.7-6 GHz PLL-Based Complex Dielectric Spectroscopy System, 3–6.

- [33] Helmy, A. A., Member, S., & Entesari, K. (2012). A 1 – 8-GHz Miniaturized Spectroscopy System for Permittivity Detection and Mixture Characterization of Organic Chemicals, 60(12), 4157–4170.
- [34] Liu, C.. Design and fabrication of coplanar waveguide probes for single-cell impedance measurement using radio frequency. *Micro & Nano Letters*, 2011, Vol. 6, Iss. 7, pp. 503–509
- [35] Valente, V., Jiang, D., & Demosthenous, A. (2015). Design of a Wideband CMOS Impedance Spectroscopy ASIC Analog Front-End for Multichannel Biosensor Interfaces \*, 885–888.
- [36] Voitsekhivska, T., Suthau, E., & Wolter, K. (2014). CMOS Multiplexer for Portable Biosensing System with Integrated Microfluidic Interface, 173–178.
- [37] Krautschneider, W. et al. (2014) "Antrag zur Validierung des Innovationspotenzials wissenschaftlicher Forschung – VIP “Hochparallelisiertes Gigahertz-Mikrosystem zur Charakterisierung und Konditionierung von Zellen”.
- [38] Montero-Rodriguez J. J., Salazar-Flores E. E., Vega-Castillo P., Tomasik J. M., Wjatscheslaw G., Hafkemeyer K. M., and Krautschneider W., (2016) “An Impedance Spectroscopy ASIC for Low-Frequency Characterization of Biological Samples”. In: 9th International Conference on Biomedical Electronics and Devices, 222-228.
- [39] J. J. Montero-Rodriguez, A. J. Fernandez-Castro; D. Schroeder, W. Krautschneider, “Development of an impedance spectroscopy device fo in-line cell growth monitoring” *Electronics Letters*, vol. 53, issue 15, 2017.
- [40] R. García-Ramírez, et al., “**Review on CMOS Circuit Architectures for Electrical Impedance Spectroscopy**”, in *Proc. IEEE Central America and Panama Covention (Concapan 2016)*, San José, Costa Rica, november 9-11, 2016.
- [41] R. García-Ramírez, et al. (2017), “**A 0.13um CMOS Integrated Circuit for Electrical Impedance Spectroscopy from 1kHz to 10GHz**” in *Proc. IEEE 20th international System on Chip Conference*, September 5-8, 2017, Hotel Novotel, Munich, Germany.
- [42] Ronny García-Ramírez, “**Development of integrated electronics subsystems for low power and biomedical applications**”. Tesis Doctoral. Instituto Tecnológico de Costa Rica, junio, 2020. Chapter 5.
- [43] Luis Alberto Chavarría Zamora. “**Methodology for the Development of High-Speed Platforms using PWB Technologies**”, Tesis de Maestría en Electrónica. Instituto Tecnológico de Costa Rica, 2018.
- [44] Gabriel Madrigal-Boza, Marco Oviedo-Hernández, Allan Carmona-Cruz, Luis A. Chavarría-Zamora, Daniel Leon-Gamboa, Daniel Kohkemper, Ronny Garcia-Ramírez, Alfonso Chacon-Rodriguez, and Renato Rimolo-Donadio, “**An IC Mixed-Signal Framework for Design, Optimization, and Verification of High-Speed Links,**” 11th IEEE Latin American Symposium on Circuits & Systems 2020 (LASCAS), San José, Costa Rica, February 25-28, 2020.

[45] R. Pereira, A. Mora-Sánchez, P. Vega, and R. Rimolo-Donadio, “**The TUHCR Chip: Development of a multi-project integrated circuit,**” in Proc. XII Iberchip Conference, San José, Costa Rica, March 2006. [Best Poster Award]

[46] Ingenieros ticos crearon el primer chip 100% costarricense. Periódico La Nación, 23 de marzo de 2006: <https://www.nacion.com/ciencia/ingenieros-crearon-primer-chip-100-costarricense/ANF3JQHHRBRAF4K7XXCZEUGZI/story/>

[47] Pereira-Arroyo, Roberto, Frank Nicaragua-Guzmán, and Alfonso Chacón-Rodríguez. "**Design of an operational transconductance amplifier applying multiobjective optimization.**" In 2010 Argentine School of Micro-Nanoelectronics, Technology and Applications (EAMTA), pp. 12-17. IEEE, 2010.

[48] Pereira-Arroyo, Roberto, Roberto Molina-Robles, and Alfonso Chacón-Rodríguez. "**Diseño de un amplificador operacional de transconductancia aplicando técnicas de optimización multiobjetivo.**" Revista Tecnología en Marcha 27, no. 1 (2014): pág-3.

[49] Chacón-Rodríguez, Alfonso, Shuo Li, Milutin Stanačević, Leonardo Rivas, Esteban Baradin, and Pedro Julian. "Low power switched capacitor implementation of discrete Haar wavelet transform." In 2012 IEEE 3rd Latin American Symposium on Circuits and Systems (LASCAS), pp. 1-4. IEEE, 2012.

[50] Ronny Garcia-Ramirez, Alfonso Chacon-Rodriguez, Roberto Molina-Robles, Reinaldo Castro-Gonzalez, Egdar Solera-Bolanos, Gabriel Madrigal-Boza, Marco Oviedo-Hernandez, Diego Salazar-Sibaja, Dayhana Sanchez-Jimenez, Melissa Fonseca-Rodriguez, Johan Arrieta-Solorzano, Renato Rimolo-Donadio, Alfredo Arnaud, Matias Miguez, Joel Gak, “**Siwa: A custom RISC-V based system on chip (SOC) for low power medical applications,**” Microelectronics Journal, vol. 98, April 2020.

[51] R. Garcia-Ramirez, A. Chacon-Rodriguez, R. Castro-Gonzalez, A. Arnaud, M. Miguez, J. Gak, R. Molina-Robles, G. Madrigal-Boza, M. Oviedo-Hernandez, E. Solera-Bolanos, D. Salazar-Sibaja, D. Sanchez-Jimenez, M. Fonseca-Rodriguez, J. Arrieta-Solorzano, and R. Rimolo-Donadio “**SIWA: a RISC-V 32I based Micro-Controller for Implantable Medical Applications,**” 11th IEEE Latin American Symposium on Circuits & Systems 2020 (LASCAS), San Jose, Costa Rica, February 25-28, 2020.

[52] Arnaud, M. Miguez, J. Gak, R. Puyol, R. Garcia-Ramirez, E. Solera-Bolanos, R. Castro-González, R. Molina-Robles, A. Chacon-Rodriguez, R. Rimolo-Donadio “**A RISC-V based medical implantable SoC for high voltage and current tissue stimulus,**” 11th IEEE Latin American Symposium on Circuits & Systems 2020 (LASCAS), San Jose, Costa Rica, February 25-28, 2020.

[53] R. Molina-Robles, E. Solera-Bolaños, R. Garcia-Ramirez, A. Chacon-Rodriguez, A. Arnaud and R. Rimolo-Donadio “**A compact functional verification flow for a RISC-V 32I based core**” 3rd IEEE CAS Conference on Ph.D. Research on Microelectronics and Electronics in Latin America 2020 (PRIME-LA), San Jose, Costa Rica, February 25-28, 2020.

## **Apéndices:**

### **A.1 Publicaciones Asociadas al Proyecto**