



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
ELÉCTRICA – SISTEMAS ELECTRÓNICOS

DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN SEPARADOR DE MICROGOTAS FLUORESCENTES
EN CHIP

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:
ERICK OMAR MORALES DOMÍNGUEZ

TUTOR PRINCIPAL
DRA. LAURA ADRIANA OROPEZA RAMOS
FACULTAD DE INGENIERÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX, ENERO 2018

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Pérez Alcázar Pablo Roberto
Secretario: Dr. De La Rosa Nieves Saúl
1er. Vocal: Dra. Oropeza Ramos Laura A.
2do. Vocal: Dr. Hautefeuille Mathieu Christian A.
3er. Vocal: Dr. Olgúin Contreras Luis Fernando

Lugar o lugares donde se realizó la tesis:

Laboratorio de Micro Sistemas Bio-MEMS y Lab on a Chip del Centro UNAMems, Facultad de Ingeniería, UNAM.

Laboratorio de Biofísicoquímica del Departamento de Físicoquímica, Facultad de Química, UNAM

TUTOR DE TESIS:

Dra. Laura Adriana Oropeza Ramos



FIRMA

Agradecimientos Institucionales

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IN115116, titulado Estudio de la interacción hidro-electrocinética en un dispositivo microfluídico: bases para la organización espacial de micro-entidades biológicas en chip. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) por el proyecto 153208.

A Diego Zamarrón Hernández, del Laboratorio de Micro y Nanotecnología del Laboratorio Nacional LaNSBioDyT por su apoyo en la perfilometría.

Agradecimientos

A Dios por ayudarme y sostenerme en este proceso y el porvenir.

A la Dra. Laura A. Oropeza Ramos y al Dr. Luis F. Olgún Contreras por invertir tiempo en mí, así como otorgarme su apoyo, paciencia y consejos.

A mis padres y hermana que en todo tiempo me ayudaron y soportaron.

A mis compañeros de laboratorio de quienes aprendí y con los cuales compartí éxitos, fracasos y conocimiento.

A cada persona que me ayudó y que está en el anonimato.

A la UNAM, mi segunda casa, por las pocas canas que me obsequió y las muchas satisfacciones que me añadió.

Contenido

Capítulo 1 Introducción.....	18
1.1. Estado del Arte	18
1.1.1 Sistemas Microfluídicos y Lab on a chip.....	19
1.1.2 Sistemas microfluídicos basados en micro-gotas.....	20
1.1.3 Sistemas de manipulación de micro-gotas (Actuador)	22
1.1.4 Plataformas para la separación de micro-gotas por DEP.....	24
1.1.5 Fluorescencia y métodos de detección en sistemas <i>Lab on a Chip</i>	27
1.1.6 Instrumentación para detección LIF.....	28
1.1.7 Chips microfluídicos para la separación de micro-gotas por medio de DEP con detección LIF	29
1.2 Objetivos	35
1.3 Justificación	35
Capítulo 2 Marco teórico	37
2.1 Cargas y fuerzas en cargas	37
2.2 Campo eléctrico y potencial eléctrico	37
2.3 Polarización y dieléctricos	38
2.3.1 Dipolos.....	38
2.3.2 Mecanismos de polarización	39
2.4 Dieléctricos en un campo eléctrico estático	40
2.4.1 Densidad superficial de carga y densidad volumétrica de carga	40
2.5 Densidad de flujo eléctrico y constante dieléctrica	41
2.6 Campos alternos y permitividades complejas.....	42
2.6.1 Permitividad compleja	42
2.6.2 Polarización de interfaz.....	43
2.6.3 Momento dipolar inducido efectivo de una partícula esférica.....	44
2.7 Dielectroforesis	46
2.7.1 Fuerza en un dipolo inducido: Dielectroforesis (DEP).....	46
2.7.2 Dielectroforesis en un campo alterno.....	49
2.8 Fluorescencia.....	51

2.8.1 Absorción y emisión	51
2.8.2 Fluoróforos	52
2.9 Modelado de microcanales usando circuitos eléctricos.	54
Capítulo 3 Diseño y Construcción del Microchip	56
3.1 Diseño del Microchip.....	56
3.1.1 Especificaciones de diseño	57
3.1.2 Chip para la generación de micro-gotas.....	60
3.1.3 Chip para la separación de micro-gotas	63
3.2 Fabricación del microchip	70
3.2.1 Proceso de Fotolitografía	70
3.2.2 Proceso de litografía suave	72
3.2.3 Fabricación de micro-electrodos.....	74
Capítulo 4 Diseño electrónico	75
4.1 Acondicionamiento de la señal de fluorescencia.....	76
4.1.1 Filtrado de la señal	77
4.1.2 Etapa de amplificación	80
4.1.3 Compensación por <i>offset</i>	81
4.1.4 Acoplamiento de impedancias.....	81
4.2.5 Resultado de la etapa de acondicionamiento.....	82
4.2 Circuito de control.....	83
4.2.1 Digitalización de la señal	84
4.2.2 Señal de polarización en los micro-electrodos.....	87
4.2.3 Resultado del circuito de control.	88
4.3 Construcción del circuito.....	89
Capítulo 5 Arreglo experimental y análisis de resultados.....	90
5.1 Arreglo experimental	90
5.2 Metodología experimental.....	94
5.3 Resultados de las pruebas.....	95
5.3.1 Pruebas con diferentes concentraciones de fluoresceína	95
5.3.2 Separación de micro-gotas de fluoresceína a diferentes concentraciones.....	112
5.3.3 Separación de micro-gotas de fluoresceína de micro-gotas con colorante vegetal.....	115
Capítulo 6 Conclusiones y trabajo a futuro	117
6.1 Conclusiones.....	117

6.2 Trabajo a futuro.....	118
Capítulo 7 Anexos.....	120
ANEXO 1. Determinación de bacterias dentro cada micro-gota.....	120
ANEXO 2. Calculo de resistencia hidráulica de canales microfluídicos.....	122
ANEXO 3. Simulación numérica del microchip mediante modelado de elemento finito.	124
Anexo 4. Fabricación usando la técnica de fotolitografía	140
Anexo 5 Pruebas de perfilometría en réplicas de PDMS Sylgard 184.....	143
Anexo 6. Limpieza de sustratos para fotolitografía	146
Anexo 7. Fabricación de réplicas por litografía suave.....	147
Anexo 8. Limpieza de sustratos para litografía suave	149
Anexo 9. Fabricación de electrodos	150
Anexo 10 Filtros Analógicos	151
Anexo11 Programa de Matlab para generar los diagramas de Bode	156
Anexo 12 Circuito de Amplificación	157
Anexo 13 Etapa de acondicionamiento	158
Anexo 14 Algoritmos del programa en el DSP	159
Anexo 15 Programas en <i>Code Composer Studio v7</i> para el DSP C2000 Piccolo MCU F28027	166
Anexo 16 Circuito Esquemático	175
Anexo 17. Programa en Matlab para adquirir señales.....	177
Anexo 18. Resultados: Datos para diferentes concentraciones de fluoresceína.....	178
Anexo 19. Resultados: Variación de potencia para una concentración de fluoresceína de 50[μ M]	180
Anexo 20 Separación gotas de diferentes concentraciones de fluoresceína	182
Bibliografía	183

Lista de figuras

Figura 1.1 a) Diagrama de las tres principales geometrías usadas para generar micro-gotas. b), d), e), g) muestran la generación de gotas en una geometría de enfoque de flujo. c) muestra la generación de gotas usando una geometría de flujo cruzado y f) muestra la generación de gotas usando la geometría de co-flujo [19].	21
Figura 1.2 Preparación de micro-gotas de hidrogel contenedoras de ADN. Escala de barra 100[μm] [20]	21
Figura 1.3. Dipolos producidos en una célula y fuerza inducida en ella dentro de un campo uniforme y no uniforme [30].	23
Figura 1.4. Representación en perspectiva de la zona de ordenamiento de micro-gotas.	24
Figura 1.5. Gráficos de la parte real del coeficiente f_{CM} contra la frecuencia aplicada cuando una célula HeLa es suspendida en medios con conductividades de 1.1 S/m (línea negra), 0.84 S/m (línea roja) y 0.5 S/m (línea azul) [46].	27
Figura 1.6. Separación por LIF	30
Figura 1.7. Flujo de trabajo del cribado con micro-gotas.	31
Figura 1.8. Micrografías mostrando la selección y extracción de gotas fluorescentes.	32
Figura 2.1 Líneas de campo eléctrico (líneas negras), dirección del campo (flechas) y líneas equipotenciales (círculos azules) para un punto de carga negativo [43].	38
Figura 2.2 líneas de campo eléctrico (líneas negras), dirección del campo eléctrico (flechas) y líneas equipotenciales (líneas azules) para un dipolo conformado por dos cargas iguales [43].	39
Figura 2.3. Corte transversal de un medio dieléctrico polarizado [59].	40
Figura 2.4 Representación esquemática de la polarización de un dipolo eléctrico sometido a un campo eléctrico uniforme.	44
Figura 2.5 Gráfica de la parte real (línea sólida) y parte imaginaria (línea punteada) del factor Clausius-Mossotti en función de la frecuencia para valores arbitrarios de permitividad y conductividad [43].	46
Figura 2.6 Diagrama esquemático de un campo eléctrico no uniforme generado por electrodos con geometrías de un punto y un plano [43].	46
Figura 2.7 Diagrama esquemático del dipolo inducido en una partícula esférica	48
Figura 2.8 Un dipolo arbitrario en un campo eléctrico arbitrario experimenta una diferencia de campo eléctrico (magnitud y dirección) en cada uno de sus polos.	49
Figura 2.9 Diagrama de Jablonski que muestra los estados de energía de una molécula [60].	51
Figura 2.10 Diagrama de Jablonski utilizado para describir el espectro de absorción y emisión de la fluoresceína FITC.	52
Figura 2.11 Símbolo para relacionar la diferencia de presión con el flujo para una tubería en estado estable.	54
Figura 3.1. Ilustración esquemática simplificada en donde se observan las tres regiones involucradas en el microchip.	56
Figura 3.2 Mapa esquemático que muestra los factores involucrados para obtener los parámetros de diseño para la construcción del microchip.	57
Figura 3.3 Microchip propuesto para la generación de microgotas.	60
Figura 3.4 Filtros de entrada. Son utilizados para filtrar los fluidos de entrada al microchip.	62

Figura 3.5 Región de enfoque de flujo. En esta región es dónde se forman las microgotas debido a la fuerza de cizalladura que ejerce la fase oleosa sobre la fase acuosa.	62
Figura 3.6 Chip separador para la separación de microgotas.	64
Figura 3.7 Juntura T usada para separar las micro-gotas reinyectadas al microchip.	65
Figura 3.8 Resistor hidráulico utilizado para	65
Figura 3.9 Porción de chip microfluídico para separación de gotas.	66
Figura 3.10 Líneas de campo eléctrico en el chip.	67
Figura 3.11 Magnitud del vector de campo eléctrico dentro del chip.	67
Figura 3.12. Magnitud de la velocidad dentro del chip.	68
Figura 3.13 Trayectoria de una partícula	69
Figura 3.14 Proceso estándar de fotolitografía.	70
Figura 3.15 Resultado de la fabricación por la técnica de fotolitografía	71
Figura 3.16 Trayectorias del perfilómetro	72
Figura 3.17 Comparación de los perfiles tomados en el mismo sitio con fuerzas 2 mg (azul) y 5 mg (negro).	73
Figura 3.18 Dispositivo microfluídico usando litografía suave. a) Región de separación, b) Filtros, c) geometría de enfoque de flujo para generar gotas y d) geometría de flujo cruzado para reinyectar micro-gotas.	73
Figura 3.19 Chip microfluídico final. Barra de escala de 45 [μm]	74
Figura 4.1. Consideraciones de diseño electrónico.	76
Figura 4.2 Etapas del circuito de acondicionamiento	77
Figura 4.3 Diagrama de Bode de la función de transferencia teórica del filtro paso altas.	78
Figura 4.4 Diagrama de Bode de la función de transferencia teórica del filtro paso bajas.	79
Figura 4.5 señales de entrada a la etapa de filtrado (color azul) y de salida (naranja) para una concentración de fluoresceína de 10 [μM].	80
Figura 4.6 Diagrama de control lazo abierto.	83
Figura 4.7 Tiempo de encendido de electrodos. El tiempo de encendido de los electrodos será el tiempo que tarde la gota en pasar del punto a al punto b. Barra de escala de 45 [μm]	84
Figura 4.8 a) Ilustración de micro-gotas moviéndose a través del micro-canal con el láser enfocado. b) señal resultante de la ilustración a). c) Movimiento de las gotas en donde se muestran las cuatro partes de la señal en b).	86
Figura 4.9 Señal de entrada (amarilla) y señal de disparo de los electrodos (azul).	88
Figura 4.10 Señal de entrada (amarilla) y señal de polarización de los electrodos (azul)	89
Figura 4.11 Circuito final en placa fenólica	89
Figura 5.1 Diagrama general del sistema óptico utilizado [58].	90
Figura 5.2. Diagrama de conexión del arreglo experimental.	92
Figura 5.3 Fotografía del arreglo experimental.	93
Figura 5.4 Señal de fluorescencia y espectro en frecuencias de la misma para una concentración de 1 [μM].	96
Figura 5.5 Señal de fluorescencia y espectro en frecuencias de la misma para una concentración de 5 [μM].	97
Figura 5.6 Señal de fluorescencia y espectro en frecuencias de la misma para una concentración de 10 [μM].	98

Figura 5.7 Señal de fluorescencia y espectro en frecuencias de la misma para una concentración de 15[μM]	99
Figura 5.8 Señal de fluorescencia y espectro en frecuencias de la misma para una concentración de 20[μM]	100
Figura 5.9 Valores de voltaje medidos diferentes concentraciones molares con su respectivo modelo lineal y barras de desviación estándar.	101
Figura 5.10 Señal de polarización (naranja) y señal del fotodetector (azul) para una concentración de 15[μM]	102
Figura 5.11 Señal de polarización (naranja) y señal del fotodetector (azul) para una concentración de 20[μM]	103
Figura 5.12 Separación de micro-gotas.	104
Figura 5.13 Gráfica de error contra la frecuencia a la que se separan las gotas con sus respectivas barras de desviación estándar.	105
Figura 5.14 Gráfica de gotas coalescidas respecto a la frecuencia con la que son separadas con sus respectivas barras de desviación estándar	106
Figura 5.15 Señal de fluorescencia y espectro en frecuencia para una concentración de 50 [μM] y una potencia de 4 [mW]	107
Figura 5.16 Señal de fluorescencia y espectro en frecuencia para una concentración de 50 [μM] y una potencia de 10[mW]	108
Figura 5.17 Gráfica de voltaje contra Potencia del láser con sus respectivas barras de desviación estándar para una concentración de fluoresceína de 50 [nM] a un pH 8	109
Figura 5.18 Señal de fluorescencia y de disparo para encender los electrodos para una concentración de 50 [μM] y una potencia de 4W.	110
Figura 5.19 Coalescencia de micro-gotas. Barra de escala de 45 [μm]	111
Figura 5.20 Señal de fluorescencia para concentraciones de 15 [μM] y 5 [μM]	113
Figura 5.21 Espaciamiento irregular en la reinyección de las micro-gotas. Barra de escala de 45 [μm]	113
Figura 5.22 Señal de disparo para la separación de concentraciones de 15 [μM] y 5 [μM]	114
Figura 5.23 Tres tipos de gotas diferentes, diferenciadas por el oscurecimiento de su interior. Barra de 30 [μm]	115
Figura 5.24 Separación de gotas de fluoresceína (blancas) y gotas con colorante azul. Barra de escala 45 [μm]	116
Figura 5.25 a) Gotas azules coalesciendo con gotas de fluoresceína y b) espaciamiento irregular entre gotas. Barra de escala 45 [μm]	116
Figura A 1 Mediciones del chip microfluídico	122
Figura A 2 Medidas del serpentín	122
Figura A 3 Microchip de separación	124
Figura A 4 Porción del chip a simular	124
Figura A 5 Inserción de archivo CAD	127
Figura A 6 Dominio PDMS	128
Figura A 7 Dominio micro-canal	128
Figura A 8 Dominio conservación de corriente.	129
Figura A 9 Electrodo señal.	130

Figura A 10 Electrodo tierra	130
Figura A 11 Dominio Creeping flow.....	131
Figura A 12 Dominio de entrada	132
Figura A 13 Dominio de salida.....	133
Figura A 14 Mallado del modelo	136
Figura A 15 Potencial Eléctrico.....	137
Figura A 16 Campo eléctrico	138
Figura A 17 Campo de velocidades.	138
Figura A 18 Norma de campo eléctrico.....	139
Figura A 19 Trayectoria de las partículas. A), B) y C) con los electrones no polarizados y D con los electrodos polarizados	139
Figura A 20. Diagrama a bloques del sistema de fotolitografía SF-100	141
Figura A 21 Circuito Sallen and Key.....	151
Figura A 22 Filtro paso bajas no inversor.	152
Figura A 23. Localización de polos	153
Figura A 24 Filtro paso altas no inversor.....	154
Figura A 25 Gráfica pico máximo de voltaje vs frecuencia del amplificador tl084	155
Figura A 26. Circuito esquemático hecho en Proteus 7	175
Figura A 27 Circuito esquemático de la placa fenólica	176

Lista de tablas

Tabla 1.1 Aportaciones importantes de algunos trabajos que involucren separación de micro-gotas por DEP con detección LIF.....	33
Tabla 2.1. Constantes dieléctricas de algunos materiales comunes [59].	42
Tabla 3.1 Reducción de costos en depósitos fluidicos de diferentes dimensiones. ¹ https://www.sciencecompany.com ² http://www.sigmaldrich.com	58
Tabla 3.2 Tabla comparativa de electrodos planares y electrodos tridimensionales.....	63
Tabla 3.3 Mediciones de perfiles con fuerzas 2 mg (Medición 1) y 5 mg (Medición 2).....	72
Tabla 4.1 Amplificación de salida del amplificador.....	82
Tabla 4.2 Tabla comparativa de las posibles opciones a usar.....	86
Tabla 5.1 Valores promedio para las diferentes concentraciones de fluoresceína.	101
Tabla 5.2 Valores del logaritmo base diez del factor de ruido F para los diferentes valores de potencia del láser.....	111
Tabla A 1 Parámetros de simulación.....	125
Tabla A 2 Parámetros 1	126
Tabla A 3 Parámetros 2	127
Tabla A 4 Parámetros 3	128
Tabla A 5 Parámetros 4	129
Tabla A 6 Parámetros 5	130
Tabla A 7 Parámetros 6	131
Tabla A 8 Parámetros 7	131
Tabla A 9 Parámetros 8	132
Tabla A 10 Parámetros 9	132
Tabla A 11 Parámetros 10	132
Tabla A 12 Parámetros 11	133
Tabla A 13 Parámetros 12.	134
Tabla A 14 Parámetros 13	134
Tabla A 15 Parámetros 14	134
Tabla A 16.....	134
Tabla A 17 Parámetros 16	135
Tabla A 18.....	135
Tabla A 19.....	136
Tabla A 20.....	137
Tabla A 21 Orden del filtro y los polos relacionados.....	152
Tabla A 22 Valor de capacitores 1	153
Tabla A 23 valor de resistencias 1	154
Tabla A 24 Etapa de acondicionamiento.....	158
Tabla A 25 Datos para diferentes concentraciones de fluoresceína 1.....	178
Tabla A 26 Desviación estándar de la tabla A 25	178
Tabla A 27 Datos para diferentes concentraciones de fluoresceína 2.....	179

Tabla A 28 Valores promedio de la tabla A27	179
Tabla A 29 Desviación estándar de la tabla A28	179
Tabla A 30 Datos para la variación de potencia del diodo láser	180
Tabla A 31 Valores promedio de la tabla A30	181
Tabla A 32 Desviación estándar de la tabla A31	181
Tabla A 33 Separación gotas de diferentes concentraciones de fluoresceína duración 1 [s].....	182
Tabla A 34 Separación gotas de diferentes concentraciones de fluoresceína duración 13.1 [s]....	182

Resumen

El constante desarrollo de nuevas técnicas de análisis para ensayos biológicos, químicos y médicos, y la necesidad de mejorar las técnicas ya existentes, han dado origen a una amplia gama de proyectos de investigación y desarrollo relacionados con el diseño y la construcción de micro-dispositivos que realicen tareas de análisis clínico, farmacéutico y de estudios de ciencia básica, cada vez más especializados. Estos dispositivos integran los conocimientos de distintas disciplinas tales como la física, química, biología, etc. Los dispositivos microfluídicos y los conocidos como Lab on a Chip han sido usados como una alternativa muy recurrida para realizar ensayos de forma metódica y controlada. En particular, la generación y operaciones con micro-gotas han generado un gran interés dentro de la comunidad que desarrolla microtecnología, ya que estas presentan la posibilidad de compartimentar ensayos, portar células o biopartículas, reducir en varios órdenes de magnitud el volumen de insumos empleados en los experimentos y la posibilidad de realizar procesos de análisis a tasas muy altas.

En este trabajo se presenta la metodología para diseñar y construir un microchip para la generación, detección y separación de micro-gotas fluorescentes usando las técnicas de fabricación por fotolitografía y litografía suave en polidimetilsiloxano (PDMS).

Para generar las micro-gotas, se inyectaron dos fluidos inmiscibles (una fase acuosa y una oleosa) a diferentes velocidades. Los ensayos se realizaron con gotas contenedoras de fluoresceína en aceite fluorinado.

La fluorescencia inducida por láser (LIF) fue la técnica empleada para inducir y detectar la fluorescencia de cada gota. La fluorescencia emitida por las gotas es captada por un fotodiodo de avalancha y posteriormente la señal de voltaje obtenida es acondicionada. Esta señal es utilizada para discriminar las micro-gotas para su posterior separación.

Para separar las micro-gotas se utilizó la fuerza de dielectroforesis (DEP) generada por la aplicación de un alto voltaje a un par de electrodos tridimensionales embebidos en el chip. Estos electrodos fueron controlados por la señal de un circuito de control de lazo abierto.

Se validó el microchip generando y separando micro-gotas, variando la intensidad del láser utilizado, así como usando diferentes concentraciones de fluoresceína. Además, se utilizó una cámara rápida para monitorear el comportamiento del dispositivo. Estos resultados permiten evaluar la eficacia del chip microfluídico, confirmando la capacidad de este para hacer ensayos automatizados de separación de gotas fluorescentes.

Abstract

The constant development of new analysis techniques for biological, chemical and medical assays, and the necessity to improve the existing techniques, have given rise to a broad branch of research and development related to design and fabrication of micro-devices that are able to accomplish clinical, pharmaceutical and basic science analysis, which its level of specialization is increasing. These devices bring together the knowledge of different disciplines such as physics, chemistry, biology, etc. The microfluidic and the well known Lab on a Chip devices have been used as a recurrent alternative to perform assays in a methodical and controlled form. In particular, the generation and the manipulation of micro-droplets have been of great interest in the community that develops microtechnology, since they present the possibility of compartmentalizing assays, carrying cells and bioparticles, reducing the volume of inputs used in the experiments by several orders of magnitude and offer possibility of performing analysis processes at very high rates.

In this thesis, a methodology to design and fabricate a microchip for generation, detection and sorting of fluorescent micro-droplets is presented, using photolithography and soft lithography fabrication techniques in polydimethylsiloxane (PDMS).

Two immiscible fluids (an aqueous and an oil phase) were pumped with different velocities into the chip, in order to generate the droplets. The tests were carried out with fluorescein droplets in fluorinated oil.

Laser induced fluorescence (LIF) technique was used to detect the fluorescence of each droplet. The emitted fluorescence is captured using an avalanche photodiode and then the voltage signal is conditioned. This signal is used to discriminate droplets for their later sorting.

The dielectrophoresis force (DEP) is used to separate the fluorescent droplets. This DEP is generated by the application of a high voltage through a tridimensional micro-electrodes integrated in the chip. These electrodes were controlled using an open loop circuit control.

A validation of microchip was performed by generating and sorting droplets under different laser intensities and using different fluorescein concentrations. In addition, a

phantom camera was used to monitoring the device behaviour. These results allow us to evaluate the chip throughput, confirming the capability to perform fluorescent droplet automated sorting tests.

Capítulo 1 Introducción

1.1. Estado del Arte

El establecimiento de las técnicas de fabricación para los primeros transistores abrió una vasta área de investigación tecnológica enfocada en la disminución de su consumo de energía y el aumento de sus velocidades de operación. Con esto, el desarrollo de tecnologías para la miniaturización de dispositivos se vio fuertemente inclinado a buscar procesos de fabricación altamente eficientes, tendencia que llevó al escalamiento y a la integración de sistemas electrónicos más complejos que dieron como resultado tiempos de respuesta más rápidos con consumos de energía y recursos cada vez menores. Al mismo tiempo, la investigación sobre la composición física y química de los materiales [1][2] fue de gran importancia para el progreso de nuevas técnicas de fabricación más complejas que marcaron la pauta para el surgimiento de dispositivos con aplicaciones más específicas [3]. Un ejemplo de esto son los micro sistemas electromecánicos (MEMS, por sus siglas en inglés). Los MEMS son fabricados usando los mismos estándares y procedimientos que se utilizan para la manufactura de los circuitos integrados, como lo son la fotolitografía, grabado húmedo y seco, oxidación, difusión, deposición química de vapor a baja presión (LPCVD, por sus siglas en inglés) y deposición catódica, entre otros [4][5]. Sin embargo, hay procesos de fabricación propios de los MEMS como lo son el enchapado (*plating*), el micromoldeo y la unión de sustratos [4]. Ya que el perfeccionamiento de los circuitos integrados permitió producir dispositivos electrónicos cada vez más avanzados, el desarrollo tecnológico en áreas como la microfluídica, micro-magnetismo, micro-óptica, micro-mecánica y micro-química también se vio grandemente impulsado, permitiendo que los dispositivos MEMS pudieran enfocar su desempeño en transformar la escala de sistemas completos, optimizando los costos y recursos disponibles para su elaboración.

Debido a que la tecnología MEMS permite la fabricación de muchos tipos de sistemas y dispositivos, incluyendo sensores y actuadores que no necesariamente son electromecánicos, el acrónimo MEMS podría verse insuficiente para describir con exactitud esta vasta área de desarrollo. Algunos nombres que se usan para describir el campo de la miniaturización en general son tecnología de microsistemas (MST, por sus siglas en inglés), micro-máquinas y micro-ingeniería. Sin embargo, el acrónimo de MEMS es aceptado como un acrónimo universal que describe satisfactoriamente el campo completo de la miniaturización [6][7].

El nacimiento de los MEMS se apoyó en las propiedades características de los materiales utilizados en la manufactura de los circuitos integrados, siendo de especial interés el silicio mono cristalino que no solo presenta buenas características eléctricas (ancho de banda prohibida grande, alta resistividad intrínseca, resistencia a altas temperaturas de operación y alta capacidad de ser dopado), sino también propiedades mecánicas superiores a otros materiales (policristalino, Modulo de Young de aproximadamente 130 [GPa], entre otras) [6].

En 1954, el primer estudio sobre las propiedades piezoresistivas del silicio y el germanio llevadas a cabo por Charles Smith en los laboratorios Bell, motivó a empresas e investigadores a incursionar en el desarrollo de nuevas técnicas para la fabricación de sensores orientados a la medición de esfuerzo, deformación y presión [6]. De esta forma, los materiales que ya se utilizaban para la fabricación de circuitos integrados comenzaron a utilizarse en aplicaciones en las que se aprovechaban sus propiedades de una manera totalmente diferente.

Actualmente los MEMS han logrado miniaturizar sistemas por medio del micro-maquinado de componentes o estructuras, que permiten integrar una gran variedad de aplicaciones en un espacio muy pequeño, logrando funciones específicas de alto nivel, por ejemplo la integración de sistemas de acelerómetros como sensores para el control de bolsas de aire en los automóviles. Algunas de las aplicaciones comerciales y militares más importantes son sensores biomédicos no invasivos, componentes e interruptores para fibra óptica, sistemas de administración de fármacos, entre otros [8].

1.1.1 Sistemas Microfluídicos y Lab on a chip

Durante la última década, las aplicaciones biológicas, bio médicas y bio químicas de los MEMS (Bio-MEMS) han sido de gran importancia para el análisis de muestras, generalmente en estado líquido. Por esto, los sistemas Bio-MEMS y la microfluídica que contiene y que transporta dichas muestras de interés, están íntimamente ligados. Esta tecnología multidisciplinaria envuelve conceptos fundamentales de diferentes disciplinas científicas que van desde el área biológica hasta la ingeniería eléctrica, por lo que ya no solo se involucran componentes o estructuras electromecánicas. Las principales ventajas de implementar la microfluídica en dispositivos Bio-MEMS son la reducción de costos debido a los bajos volúmenes de reactivos empleados en los chips y el incremento de la velocidad de operación y análisis por medio de la automatización y control de variables [9], como la velocidad del fluido, campos eléctricos, etc.

Con la implementación de materiales como los polímeros en los procesos de manufactura de los Bio-MEMS, los métodos de fabricación basados en MEMS de silicio cambian por tecnologías nuevas, más accesibles y sencillas que las convencionales como el prototipado por medio de fotoablación [10], o técnicas de litografía suave como son la impresión molecular de estructuras [11], moldeo por inyección [12], y micromoldeo molde-réplica con Polidimetilsiloxano (PDMS) [13], entre otros.

Con esta amplia disponibilidad de técnicas se ha impulsado una oleada de posibles aplicaciones, ya que de la misma manera que los circuitos integrados permitieron la miniaturización de las computadoras del tamaño de una habitación hasta el tamaño de un equipo portátil actual, la miniaturización tiene el potencial de reducir un cuarto lleno de instrumentos a un laboratorio en un chip (en inglés Lab on a Chip, LOC) [14]. Un término paralelo a LOC es micro sistemas de análisis total (en inglés micro total analysis systems, μ TAS). Uno de los retos más significativos para el desarrollo de los sistemas de análisis microfluídicos es el perfeccionamiento de las técnicas de manipulación microfluídica, ya que los analitos se pueden presentar en varias formas físicas como corrientes de fluidos, gotas líquidas y gases [15]. El tipo de análisis en el que nos enfocaremos será la utilización de micro-gotas para poder encapsular bacterias dentro de ellas y así analizarlas como sistemas individuales.

1.1.2 Sistemas microfluídicos basados en micro-gotas

La utilidad de los sistemas microfluídicos depende en gran parte de las tecnologías disponibles en la manipulación de fluido como las bombas peristálticas de microfluidos, bombas electrocinéticas y bombas de dielectroforesis. Este tipo de tecnologías permiten construir bloques de estructuras esenciales, los cuales podrían tener un gran número de aplicaciones, por ejemplo el cribado (*screening*) de alto rendimiento, exploración de diagramas de fase químicos, la posibilidad de realizar ensayos de moléculas biológicas y realizar análisis de una sola célula [16].

Debido al creciente interés en desarrollar herramientas que pudieran aprovechar el manejo de fluidos a micro-escala, la tecnología basada en la generación de micro-gotas provee un incremento en el rendimiento y reducción de volúmenes de muestra [17]. Una de las ventajas clave de la microfluídica de gotas es la habilidad de generar gotas únicas que se pueden transportar y analizar de forma individual. La separación de micro-gotas facilita un arreglo de funciones como el aislamiento de aquellas que son de interés, la purificación de muestras sintetizadas y el control de una sola gota proveniente incluso de una gran

población [18].

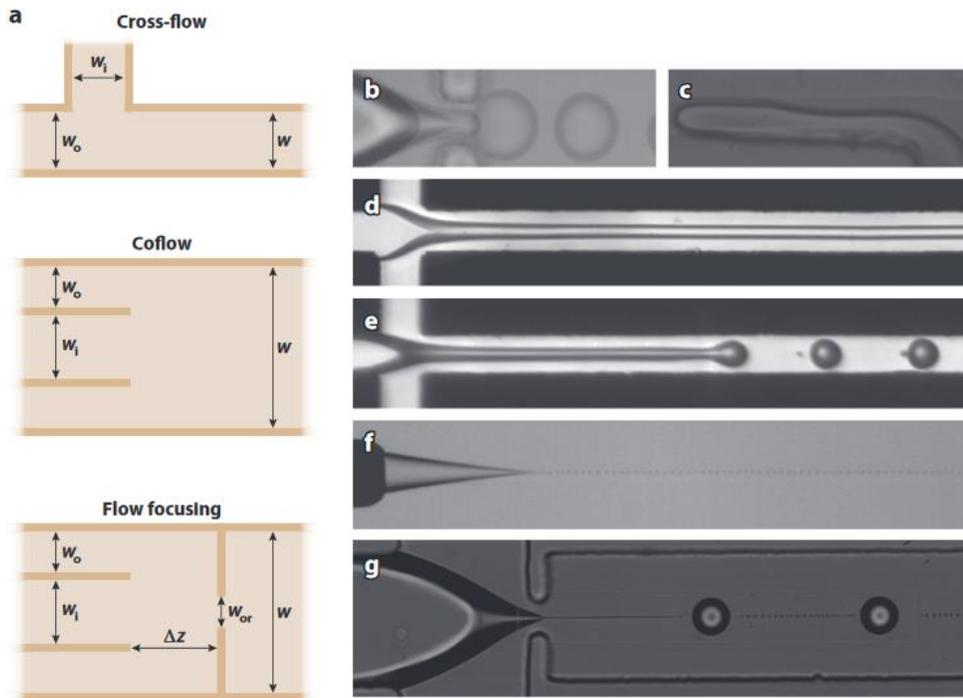


Figura 1.1 a) Diagrama de las tres principales geometrías usadas para generar micro-gotas. b), d), e), g) muestran la generación de gotas en una geometría de enfoque de flujo. c) muestra la generación de gotas usando una geometría de flujo cruzado y f) muestra la generación de gotas usando la geometría de co-flujo [19].

La generación de gotas se lleva a cabo poniendo en contacto dos o más fluidos inmiscibles y se utilizan tres principales geometrías clasificadas como: geometría de co-flujo en las cuales fluidos inmiscibles se encuentran mediante flujos paralelos; geometría de flujo cruzado en donde los flujos de fluidos inmiscibles se encuentran formando un ángulo entre ellos; y geometrías de enfoque de flujo en donde se emplean elementos geométricos que causan que los flujos se aceleren, adelgazando el fluido interno [19]. Estas tres geometrías se muestran en la figura 1.1.

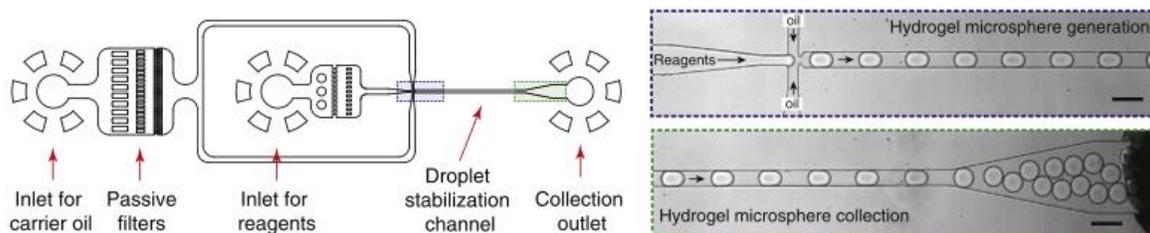


Figura 1.2 Preparación de micro-gotas de hidrogel contenedoras de ADN. Escala de barra 100[μm] [20]

El uso de dos fases inmiscibles, como una fase acuosa y una oleosa, empleando

geometrías de enfoque de flujo, ha predominado en los sistemas de separación de gotas como una forma de generar gotas [20]. En este caso, cuando la fuerza de cizallamiento que ejerce la fase oleosa sobre la fase acuosa supera la tensión interfacial que mantiene las gotas adheridas al volumen de la fase acuosa, se forma una gota como se muestra en la figura 1.2. Por otro lado, el tamaño de las micro-gotas generadas en un chip microfluídico dependerá de factores como la diferencia de viscosidades entre las dos fases inmiscibles y la razón con la que se inyectan estos a la entrada, permitiendo generar volúmenes por gota desde 10 [nL] hasta 20 [fL] [18][21]. Además, se han implementado sistemas de producción de micro-gotas que utilizan la aplicación de campos eléctricos formados a través de la polarización de micro electrodos para controlar el tamaño de estas [16]

Debido a que los sistemas microfluídicos son caracterizados por tener canales del orden de los micrómetros, estos tienen un bajo número de Reynolds, y la forma en que un fluido fluye en éstos es de forma laminar, por lo que el flujo en el dispositivo es estable y predecible, y por consiguiente, el movimiento de las micro-gotas también. Un ejemplo es el uso de sistemas microfluídicos de micro-gotas para realizar funciones lógicas Booleanas que posteriormente pueda dar paso a una computadora microfluídica en un chip [18].

1.1.3 Sistemas de manipulación de micro-gotas (Actuador)

Ya que el objetivo principal de utilizar la tecnología de micro-gotas es poder manipular las gotas que sean de interés para el estudio y análisis de su contenido, se han implementado diferentes tecnologías de separación de micro-gotas para obtener solamente aquellas que sean de utilidad. Estas tecnologías se basan en mecanismos establecidos en electrocinética como la electroforesis [22], dielectroforesis [23] y flujo electroosmótico [24]; mecanismos de acustoforesis como las ondas acústicas de volumen [25] y ondas acústicas superficiales [26]; mecanismos de manipulación óptica [27]; magnetoforesis [28]; y sistemas mecánicos [29].

Las técnicas anteriormente mencionadas buscan solucionar los problemas y las limitaciones en costos y eficiencia para la separación de micro-gotas, y en su mayoría, las plataformas microfluídicas que las integran aún están en desarrollo. Los factores más importantes que se consideran para la innovación de estos chips microfluídicos es el aumento de la velocidad de separación de las micro-gotas, la simplicidad de operación y la reducción del costo de fabricación del chip. Bajo estos tres principales criterios, una de las técnicas más convenientes y utilizadas para la separación de micro-gotas es la técnica basada en mecanismos de electrocinética, más específicamente por medio del efecto de

dielectroforesis.

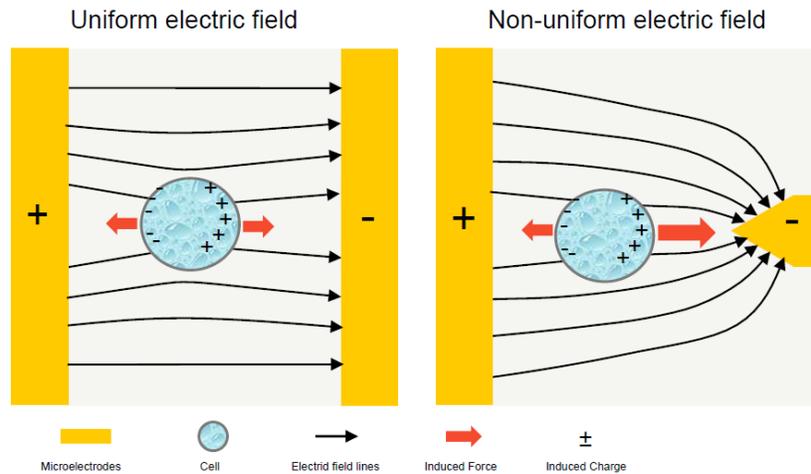


Figura 1.3. Dipolos producidos en una célula y fuerza inducida en ella dentro de un campo uniforme y no uniforme [30].

Los sistemas microfluídicos para la separación de micro-gotas basados en la fuerza de dielectroforesis (DEP, por sus siglas en inglés) como mecanismo de actuación, son ampliamente utilizados en sistemas donde se trabaja con flujo laminar dentro de un micro-canal para la manipulación de fluidos y partículas biológicas [31]. A pesar de que tanto la electroforesis como la DEP son fenómenos electrocinéticos que permiten el movimiento y manipulación de partículas, la DEP suele ser más conveniente de utilizar. La diferencia principal entre ambos fenómenos es la naturaleza del campo eléctrico generado; el efecto DEP usa voltajes de corriente alterna (AC) y corriente directa (DC) [32] mientras que el efecto de electroforesis solo utiliza voltajes de DC [33]. Además, es común que la aplicación de campos de DC provoque un fenómeno llamado electroósmosis que representa un factor adicional a considerar para la manipulación de gotas. Con la implementación de campos eléctricos de AC, a diferencia que con los de DC, se tiene la ventaja de obtener campos eléctricos de mayor magnitud que no provocan la electrólisis del agua y evita las corrientes electro-osmóticas [34]. Además, el fenómeno de electroforesis se genera a partir de una distribución de campo eléctrico uniforme y la DEP solo se genera a partir de una distribución de campo eléctrico no uniforme (figura 1.3). Este campo eléctrico se ha generado haciendo uso de diferentes geometrías de micro-electrodos, tanto planares [35][36] como volumétricos [21]. El movimiento de partículas por medio del efecto DEP depende de las propiedades de la partícula y del medio que la rodea, del tamaño de la partícula que se desea manipular, así como del cuadrado del gradiente de la magnitud de campo eléctrico, que a su vez depende del voltaje aplicado y de la geometría de los electrodos [37].

La fabricación de micro-electrodos es de especial interés en el desarrollo de plataformas LOC que incluyen la separación de micro-gotas como módulo esencial en un flujo de análisis de sustancias, ya que la miniaturización y la optimización del espacio dentro del chip es una característica importante en estos dispositivos. Unos de los tipos de electrodos más utilizados son los electrodos interdigitados, ya que proveen una geometría simple para determinar el campo que producen por las variaciones en el ancho y la separación entre los micro-electrodos, y el voltaje aplicado a los mismos [36]. Además, se ha optado por determinar estos efectos por medio de simulaciones en algunos softwares de análisis de elemento finito como COMSOL (figura 1.4) [21][38]. Las técnicas más comunes reportadas para la fabricación de micro-electrodos para generar la fuerza DEP, son *lift-off* [22], estampado en sustratos de óxido de indio y estaño (ITO, por sus siglas en inglés) [33] e inyección de soldadura en micro-canales fabricados por medio de fotolitografía suave en PDMS [21].

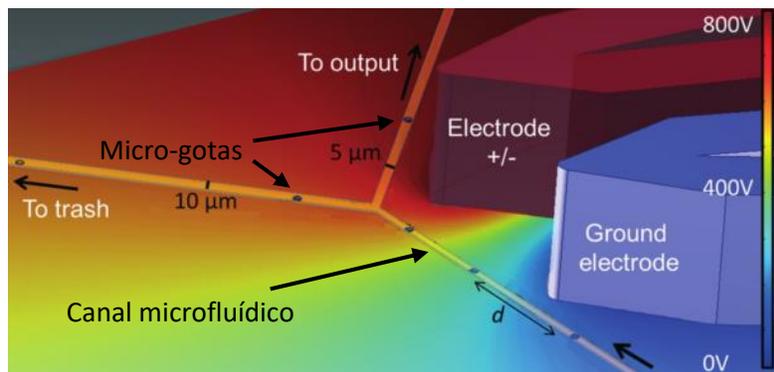


Figura 1.4. Representación en perspectiva de la zona de ordenamiento de micro-gotas.

Los potenciales eléctricos simulados en COMSOL son indicados [21].

1.1.4 Plataformas para la separación de micro-gotas por DEP.

La implementación de los sistemas de separación por dielectroforesis en microchips ha sido muy útil en muchas aplicaciones biotecnológicas; por ejemplo, en la separación de células como los leucocitos de la sangre humana [39] y manipulación y separación de partículas submicrométricas como partículas de látex [40], bacterias [41] y virus [42].

Como ya se mencionó, el término dielectroforesis es usado para describir el movimiento inducido de partículas polarizables dentro de un campo eléctrico no uniforme. La intensidad de la fuerza de DEP que es ejercida sobre una partícula esférica, es modelada con la siguiente ecuación:

$$|F_{DEP}| = 2\pi\epsilon_m a^3 \text{Re}\{f_{CM}\} \nabla |E|^2 \dots (1.1)$$

Donde F_{DEP} es la fuerza DEP ejercida sobre la partícula, $Re\{f_{CM}\}$ es la parte real del factor Claussius-Mossoti complejo, ϵ_m es la permitividad del medio, a es el radio de la partícula esférica y E es la amplitud del campo eléctrico [43].

De la ecuación 1.1 observamos que la magnitud de la fuerza DEP depende del campo eléctrico y que como anteriormente se mencionó, guarda una estrecha relación con la geometría de los micro-electrodos, debido a que la no uniformidad del campo eléctrico es generada por esta geometría, y del voltaje aplicado a estos. Una de las grandes ventajas de trabajar con micro-electrodos para la generación de la fuerza DEP es que la reducción en escala de los electrodos conlleva a una reducción del voltaje aplicado utilizado para generar la fuerza DEP [44]. La magnitud del voltaje aplicado necesario para que la fuerza DEP sea suficiente para separar una micro-gota dependerá de la constitución del chip. En su mayoría, los micro-electrodos fabricados por inyección de soldadura en micro-canales requieren un voltaje que va desde los 200 [Vpp] a 1.8[KVpp] [22] [32], que es mayor al de los electrodos que se fabrican con otras técnicas como *lift-off* que van desde 1[Vpp] a 18[Vpp] [9][36][37][45]. Esto es porque los primeros requieren de la construcción previa de micro-canales que son fabricados mediante litografía suave usando el polímero Polidimetilsiloxano (PDMS, por sus siglas en inglés), lo que aumenta la distancia entre los electrodos y la micro-gota, además de que el PDMS es un material aislante con una constante dieléctrica alrededor de 2.3 a 2.8, a diferencia de los micro-electrodos planares que están en contacto directo con el medio que fluye en el micro-canal, disminuyendo la distancia entre los electrodos y la micro-gota y evitando el uso de paredes aislantes como las de PDMS.

El tamaño de las micro-gotas también juega un papel importante en la fuerza DEP. Como se muestra en la ecuación (1.1), entre mayor sea el radio de la micro-gota mayor será a fuerza DEP, por lo que para una producción de micro-gotas con volúmenes del orden de los nano litros o femtolitros, el control mediante DEP se vuelve más complicado. Por ejemplo, en un experimento realizado con micro-gotas contenedoras de agua desionizada, con 1% de Pluronic y volúmenes de 20 [fL], es necesario aplicar un voltaje entre 400 y 1000 [V] a electrodos de platino, a una frecuencia de 1.5 [kHz], para alcanzar una tasa máxima de separación de 3 [kHz] (3 000 micro-gotas por segundo) [21], mostrando así que para el control adecuado a grandes velocidades de ordenamiento con volúmenes pequeños se debe incrementar la intensidad del campo eléctrico incrementando la magnitud del voltaje aplicado.

Ya que se pueden utilizar campos eléctricos de AC para que el fenómeno de DEP se presente, las micro-gotas pueden ser controladas eficientemente ajustando parámetros del campo eléctrico como la magnitud, la frecuencia, la forma de onda, la simetría de la onda y la fase [34]. Además, el signo y la magnitud de los polos inducidos en la micro-gota están dados por la parte real de la función Clausius-Mossoti que involucra las permitividades complejas del medio y de la micro-gota:

$$f_{CM} = \frac{\widetilde{\varepsilon}_p - \widetilde{\varepsilon}_m}{\widetilde{\varepsilon}_p + 2\widetilde{\varepsilon}_m} \dots (1.2)$$

Donde $\widetilde{\varepsilon}_p$ y $\widetilde{\varepsilon}_m$ son las permitividades complejas de la partícula y del medio respectivamente. Estas permitividades complejas se pueden calcular de la siguiente manera:

$$\varepsilon^* = \varepsilon - i \left(\frac{\sigma}{2\pi\omega} \right) \dots (1.3)$$

Donde σ es la conductividad, ω es la frecuencia de la corriente alterna aplicada e $i = \sqrt{-1}$. Como ejemplo, en la figura 1.5 se muestra como varía el factor de f_{CM} entre -0.5 y 2.5 para una célula HeLa suspendida en tres diferentes medios con tres diferentes conductividades de 1.1 [S/m] (línea negra), 0.84 [S/m] (línea roja) y 0.5 [S/m] (línea azul) [46]. Considerando estos valores, la micro-gota experimenta una fuerza DEP positiva (pDEP) y se mueve hacia la región con mayor campo eléctrico cuando $\text{Re}\{f_{CM}\}$ es mayor que cero. Pero cuando $\text{Re}\{f_{CM}\}$ es menor a cero, la micro-gota experimenta una fuerza DEP negativa (nDEP) y se mueve hacia la región con menor campo eléctrico [47]. Un trabajo de investigación de Xiaoliang Guo y Rong Zhu de la Universidad de Tsinghua [46], muestra la factibilidad de fabricar trampas basadas en el efecto DEP, que es dependiente de la frecuencia del voltaje aplicado, para posicionar y manipular una suspensión de células HeLa dentro de un microchip, demostrando que las fuerzas nDEP y pDEP se pueden usar como técnicas no dañinas para este tipo de células. Para constatar lo anterior, se utilizaron Calcein-AM y yoduro de propidio, para marcar las células vivas y muertas, y así determinar la viabilidad celular midiendo la fluorescencia emitida.

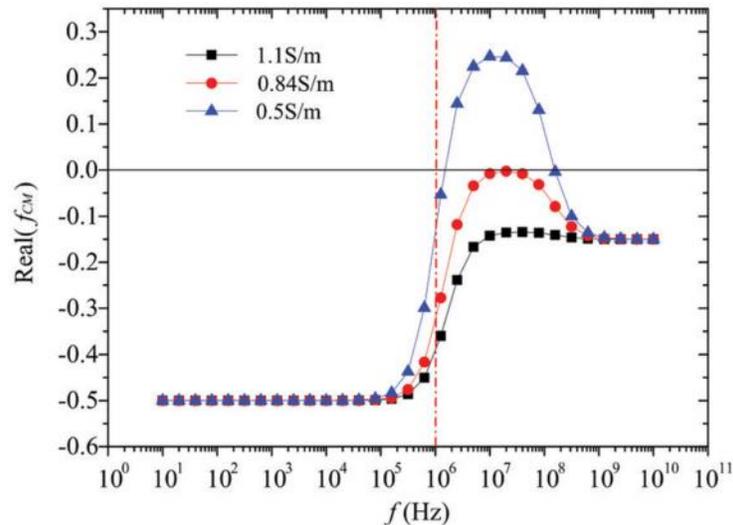


Figura 1.5. Gráficos de la parte real del coeficiente f_{CM} contra la frecuencia aplicada cuando una célula HeLa es suspendida en medios con conductividades de 1.1 S/m (línea negra), 0.84 S/m (línea roja) y 0.5 S/m (línea azul) [46].

Con todo lo anterior, la DEP es un método atractivo para la separación y manipulación de micro-gotas y partículas ya que es una técnica rápida, no destructiva y aplicable a micro-escala.

1.1.5 Fluorescencia y métodos de detección en sistemas *Lab on a Chip*

Dentro de los sistemas LOC es indispensable contar con métodos de manipulación y detección altamente eficientes. En el caso de la detección de micro-gotas, existen varios métodos de detección que permiten analizar el contenido de cada micro-gota. Entre ellos están la detección de micro-gotas por fluorescencia [32], detección por espectroscopía de masas [27], detección por espectroscopía de Raman [27][48], detección magnética [27], detección eléctrica [27] y detección electroquímica [48]. La técnica de espectroscopía de masas es un método invasivo, ya que requiere de un proceso ionizante, que lleva al deterioro y muerte de células y el cultivo posterior a la detección de éstas no es posible [27]. Se ha reportado que con la espectroscopía de Raman se han logrado interrogar un máximo de hasta 13 gotas por segundo, por lo que esta técnica no es recomendable para realizar ordenamientos de micro-gotas rápidos [27]. Por la facilidad de implementación y los requerimientos para la detección de micro-gotas, las técnicas más utilizadas son la detección por fluorescencia y la detección eléctrica. La detección por fluorescencia se basa en la detección óptica de intensidades de fluorescencia dentro de cada micro-gota y la detección eléctrica típicamente se caracteriza por el uso de electrodos y la detección de impedancias. La ventaja que tienen estos dos métodos es que son no invasivos.

Comparado con los métodos ópticos, la detección eléctrica es relativamente simple y fácil para contar micro-partículas; sin embargo, ésta no provee tanta información como la detección óptica, especialmente cuando la muestra es una combinación de diferentes partículas o compuestos [49].

Los métodos de detección basados en fluorescencia son muy usados en aplicaciones de bioanálisis debido a su excelente sensibilidad y selectividad. En particular, cada una de estas micro-gotas funciona como un micro-reactor independiente y es posible incluir dentro de ellas un sustrato fluorogénico específico para indicar cierta actividad enzimática o un fluoróforo celular que indique alguna propiedad o actividad de la célula a estudiar [50].

En un reporte publicado por el grupo de trabajo de la Dra. Laura Oropeza de la Facultad de Ingeniería en colaboración con el Dr. Luis Olguín de Facultad de Química, ambos de la UNAM [51], se desarrolló un sistema de detección de fluorescencia inducida por láser (LIF, por sus siglas en inglés) en el cual se demostró experimentalmente que la intensidad de fluorescencia emitida por las micro-gotas contenedoras de un fluoróforo llamado fluoresceína se veía afectado por la velocidad con que pasaban por la focalización de un láser de longitud de onda de 488 [nm] y por la potencia de este, es decir, la intensidad de fluorescencia incrementaba cuando la velocidad de la gota o la potencia del láser aumentaban. Esto indica que para sistemas basados en fluorescencia es necesario que la velocidad de la micro-gota y la potencia del láser utilizado se tomen en cuenta para diseñar un chip para micro-gotas que utilice la técnica LIF. A pesar de existir métodos de análisis de fluorescencia como la Transformada de Fourier de espectroscopía infrarroja y la Transformada de Fourier de espectroscopía de Ramman, que son más exactos y brindan información amplia de los compuestos en cuestión, la detección de fluorescencia por LIF es muy utilizada ya que la complejidad del equipo involucrado para su manejo es menor que los mencionados y que la preparación de la muestra es menos laboriosa que en otros métodos ópticos para la utilización en chips microfluídicos [52]. Este sistema de detección de micro-gotas fluorescentes en conjunto con un módulo de separación por DEP, tiene un uso muy recurrido en plataformas microfluídicas debido a su gran versatilidad.

1.1.6 Instrumentación para detección LIF

La instrumentación disponible en cada laboratorio y la aplicación final del dispositivo ha sido un importante factor para determinar qué tipo de sistema se utilizará para la detección de fluorescencia. La técnica LIF se ha caracterizado por requerir equipo

relativamente fácil de usar. Las principales consideraciones para la elección de estos instrumentos, serán las longitudes de onda de absorción y emisión involucradas en el fenómeno de fluorescencia, por lo que dentro de los principales instrumentos para montar un sistema de detección LIF están un láser semiconductor para estimular la fluorescencia en la micro-gota [52]; filtros dicróicos y filtros ópticos paso banda [49]; lentes plano-convexas [51] o fibra óptica [53] para marcar la trayectoria óptica del láser; detectores ópticos como fotodiodos de avalancha [51], tubos fotomultiplicadores [54], dispositivos de carga acoplada (CCD por sus siglas en inglés) [50] o espectrógrafos [52]; y dispositivos de adquisición de datos como tarjetas de adquisición [17] o FPGAs [55] para el análisis y procesamiento de señales.

1.1.7 Chips microfluídicos para la separación de micro-gotas por medio de DEP con detección LIF

Como ya se comentó, el mejoramiento de dispositivos enfocados en el ordenamiento selectivo de micro-gotas es elemental para la manipulación y separación de bio-partículas, (partículas micro métricas que contengan material biológico), por lo que durante la última década se han presentado numerosos trabajos en el desarrollo de chips que buscan automatizar dichos procesos enfocados a tareas específicas. Por ejemplo, un trabajo realizado por R. Díaz y S. Payen de la Universidad de California, demuestra la gran versatilidad de utilizar la fuerza DEP para separar células de mamíferos vivas de células de mamíferos muertas en un chip microfluídico usando la diferencia en las permeabilidades de sus membranas celulares bajo la influencia del mismo campo eléctrico [44]. En este caso, la implementación de un sistema para detección de propiedades en las micro-gotas no fue necesario, pero cuando las aplicaciones requieren de una selectividad basada en propiedades más específicas, es indispensable contar con este módulo de detección. Así, se han fabricado diferentes microchips que combinan la detección de micro-gotas fluorescentes por medio de LIF y la separación de las mismas por DEP (figura 1.6) [21] [32][54-56].

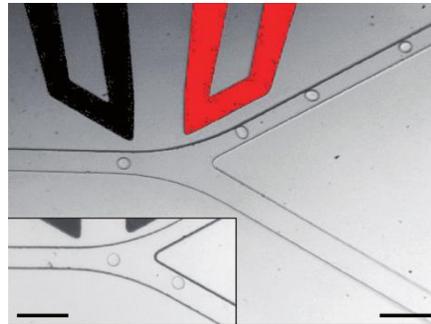
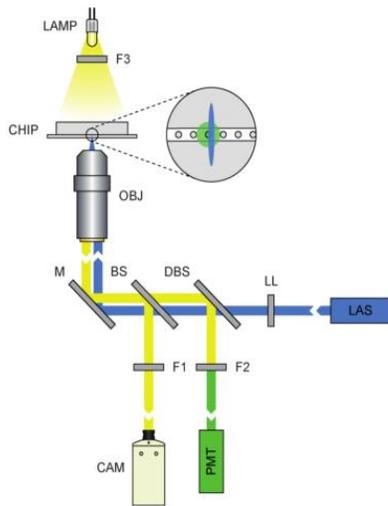


Figura 1.6. Separación por LIF

Del lado izquierdo la representación esquemática de la configuración óptica para la detección de fluorescencia. En la parte superior trayectoria de un flujo de micro-gotas a través de la junta de separación de un microchip para la separación de gotas fluorescentes [32].

Se ha reportado la viabilidad de desarrollar un micro-chip especializado en automatizar un flujo de trabajo basado en el manejo de micro-gotas para realizar cribados de alto rendimiento [17] que comprende cuatro pasos esenciales (figura 1.7): (A) generación de micro-gotas con una etiqueta óptica capaces de conformar una librería de gotas, (B) fusión de las micro-gotas provenientes de la biblioteca con células en gotas generando una nueva micro-gota, (C) incubación y (D) reinyección de las micro-gotas en un chip de ensayo para identificar y estudiar el efecto de los diferentes compuestos sobre las células. Con lo anterior, la manipulación de micro-gotas en un chip resulta factible para el manejo e incubación de células.

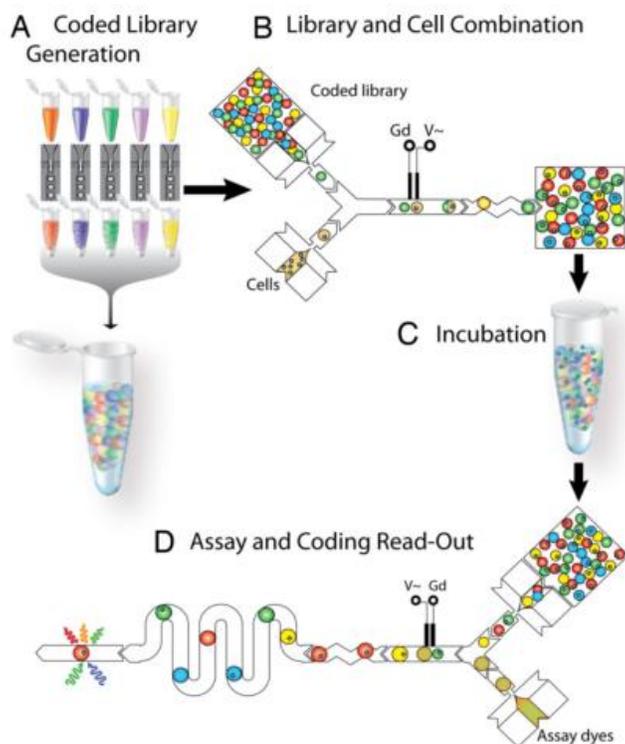


Figura 1.7 .Flujo de trabajo del cribado con micro-gotas.

Este flujo consiste de cuatro pasos: (A) generación de micro-gotas con una etiqueta óptica capaces de conformar una librería de gotas, (B) la fusión de las micro-gotas provenientes de la biblioteca con células en gotas generando así una composición específica para cada micro-gota, (C) incubación y (D) reinyección de las micro-gotas en un chip de ensayo para identificar y estudiar el efecto de los diferentes compuestos sobre las células [17].

Además, algunos microchips incluyen módulos de coalescencia de micro-gotas para poder recuperar o acceder al contenido de ellas. El propósito de esto es preparar un flujo continuo en el microchip para poder implementar alguna técnica analítica como lo son la espectrografía de masas, electroforesis capilar y cromatografía líquida [9][18][57]. La fusión de micro-gotas se puede realizar de dos formas: de forma pasiva, usando la geometría de los canales del microchip para controlar la localización de la fusión de las micro-gotas [35]; y de forma activa, utilizando la aplicación de campos eléctricos o alguna técnica de centrifugado [32]. En un trabajo del Laboratorio para la Síntesis de Polímeros de la Universidad de Cambridge [57] se desarrolló una técnica para extraer el contenido existente dentro de micro-gotas acuosas contenedoras de fluoresceína rodeadas de aceite incorporándolas a un flujo continuo acuoso dentro de un microchip (figura 1.8). Esto se logró mediante la aplicación de un pulso de alto voltaje a unos micro-electrodos, generando así un campo eléctrico que produce el efecto de electrocoalescencia ente la micro-gota y el flujo continuo acuoso.

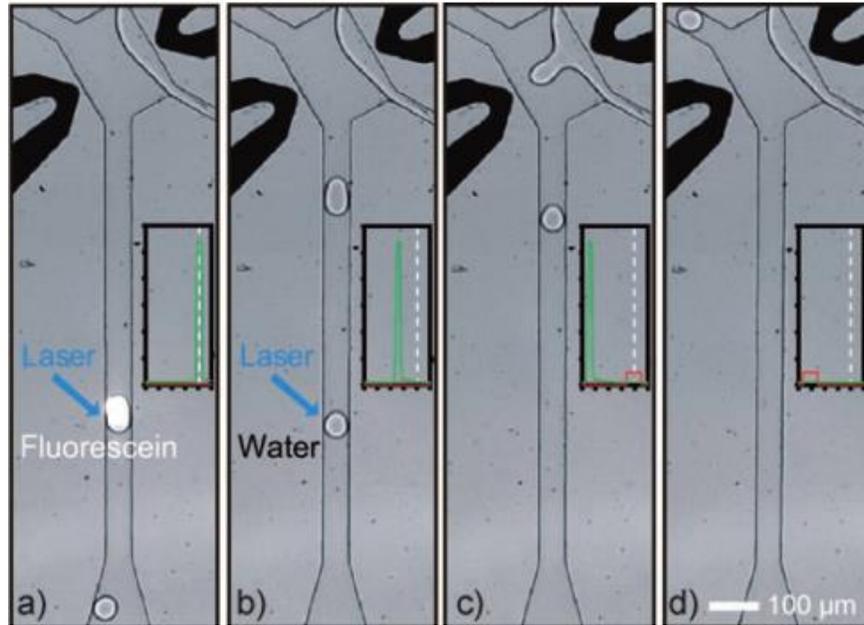


Figura 1.8. Micrografías mostrando la selección y extracción de gotas fluorescentes.

A) una gota con fluoresceína fluye a través del punto focalizado de un láser y emite fluorescencia detectada por un tubo fotomultiplicador. B) Una gota pasa a través del punto focalizado del láser sin emitir fluorescencia. C) Un pulso eléctrico hace que la gota contenedora de fluoresceína se fusione con el flujo lateral de líquido. D) El campo es removido antes de que la gota que no emitió fluorescencia pase entre los electrodos y así esta sigue fluyendo [57].

En la Tabla 1.1 se muestra un resumen de los trabajos que han presentado las aportaciones más relevantes en micro chips que involucran separación de micro-gotas por DEP y detección por LIF.

Tabla 1.1 Aportaciones importantes de algunos trabajos que involucren separación de micro-gotas por DEP con detección LIF.

Nombre del trabajo.	Año	Aporte más importante.
Fluorescence-activated droplet sorting (FADS): efficient microfluidic cell sorting based on enzymatic activity [32].	2009	Chip microfluídico para el ordenamiento de microgotas fluorescentes usando DEP con tasas de ordenamiento de 2000 gotas/s. Principales causas por las que hay errores en el ordenamiento del dispositivo es por el poco espacio entre gotas dentro del flujo del microchip y relación entre el voltaje aplicado a los micro-electrodos y el tiempo de aplicación a estos.
Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics [55].	2013	Se detalla la fabricación y prueba de un microchip microfluídico para el ordenamiento de micro-gotas fluorescentes basado en DEP. El sistema de separación muestra ser efectivo para tasas de ordenamiento de 200[Hz] para células hibridomas de ratón. Se propone un modelo para predecir el número de células dentro de cada gota.
Droplet-based microfluidics at the femtolitre scale [21].	2015	Se demuestra que el manejo de micro-gotas en la escala de los femtolitros puede tener ciertas ventajas como reacciones y tiempos de mezclado más rápidas; sin embargo, la reducción en el volumen de la gota modifica ciertos parámetros para que el sistema funcione eficientemente, como la intensidad del campo eléctrico requerido, el cual debe de estar por debajo del voltaje de ruptura de la micro-gota.
Accurate microfluidic sorting of droplets at 30 kHz [54].	2015	La modificación en la forma y geometría de los micro-electrodos, en conjunto con la geometría de los canales microfluídicos dentro del microchip, permiten mejorar la velocidad de ordenamiento del módulo de separación de micro-gotas basado en DEP. Se pueden alcanzar velocidades de hasta 30 [KHz] con micro-gotas del orden de los microlitros con una exactitud del 99%.

De lo anterior se puede resaltar que se han reportado dispositivos que utilizan las técnica de LIF y la fuerza de dielectroforesis para separar gotas fluorescentes con tasas de separación que van desde las centenas de gotas por segundo hasta 30 mil gotas por

segundo con exactitudes hasta del 99%, y que pueden detectar una concentración de moléculas fluorescentes en el orden de los 10^{-12} [M]. También se ha reportado que se utilizan FPGA con ayuda de Labview para el control de separación de las gotas. Además los volúmenes empleados varían desde las decenas de nano litros hasta los femtolitros.

Por todo lo anterior, podemos decir que hay un creciente interés en desarrollar plataformas microfluídicas que sean capaces de generar, detectar y separar micro-gotas de manera controlada y sistemática. Se considera que las micro-plataformas de separación de micro-gotas fluorescentes son un recurso tecnológico para el estudio y la manipulación selectiva de partículas biológicas y químicas (también denominadas bio-partículas), teniendo como principal enfoque el uso eficiente de tiempos de análisis y volúmenes de muestras asociados a su funcionamiento. Definiremos bio-partícula como partículas micrométricas que contengan material biológico [43]

Este trabajo tiene como finalidad construir un chip microfluídico que genere micro-gotas fluorescentes que posteriormente serán separadas ejerciendo una fuerza de dielectroforesis sobre cada micro-gota, siendo la intensidad de fluorescencia, obtenida por la técnica conocida como fluorescencia inducida por láser, el criterio de separación a utilizar para su discriminación. La fuerza de dielectroforesis es lograda mediante la aplicación de un alto voltaje a un par de micro-electrodos volumétricos integrados en el chip. El sistema será vigilado con el uso de un control de lazo abierto mediante la señal de la intensidad de fluorescencia de cada gota.

Dado que las micro-gotas sirven como micro-reactores independientes, las muestras obtenidas por la separación del chip, pueden ser transportadas, estudiadas y observadas por separado.

1.2 Objetivos

- General

Desarrollar un sistema que distinga y separe automáticamente micro-gotas fluorescentes en un chip, para en un futuro realizar ensayos biológicos y bioquímicos.

- Específicos

1. Diseñar y fabricar un chip microfluídico para separar micro-gotas de 30 [μm] de diámetro, las cuales en un futuro contendrán bacterias *E. coli* para realizar ensayos de viabilidad celular.
2. Emplear un arreglo óptico de fluorescencia inducida por láser, previamente implementado en la Facultad de Química [58], para la detección de la fluorescencia de las micro-gotas.
3. Emplear la fuerza de dielectroforesis por medio de electrodos tridimensionales para separar las micro-gotas.
4. Realizar la separación de micro-gotas fluorescentes de aquéllas no fluorescentes de forma automática.
5. Implementar un sistema electrónico que eventualmente pueda utilizarse para separar micro gotas a una tasa máxima de 10[kHz].

1.3 Justificación

El contar con una plataforma de separación de micro-gotas permitirá la realización de ensayos de viabilidad celular masivos, donde se reducirá en varios órdenes de magnitud el volumen de insumos, y se tendrá una separación altamente selectiva y eficiente para analizar y evaluar procesos como la efectividad de fármacos. Esta plataforma brindará la posibilidad de nuevas capacidades experimentales para una gran diversidad de aplicaciones como la realización de evolución dirigida de proteínas o la identificación de nuevos biocatalizadores. Además, el desarrollo de este sistema de separación de gotas es un paso para la implementación de otras operaciones estándar de manejo de gotas como la fusión, fisión, almacenamiento y re-inserción y que juntas plantean la habilidad de llevar a cabo experimentos con ADN, proteínas, células y diversos micro-organismos dentro de ellas.

La utilización de técnicas de manipulación por DEP y de detección basada en LIF en un chip microfluídico son de interés del grupo de trabajo del Laboratorio de Micro

Sistemas Bio-MEMS y Lab on a chip para incorporarlas a las plataformas ya existentes y así ampliar las capacidades experimentales. Como trabajo a futuro, se espera realizar la prueba de concepto de esta plataforma separando micro-gotas contenedoras de bacterias *Escherichia coli* fluorescentes para el eventual estudio y evaluación de fármacos.

Capítulo 2 Marco teórico

2.1 Cargas y fuerzas en cargas

Para el siguiente análisis, vamos a asumir que las cargas son estacionarias (caso electrostático) o que el orden de magnitud de velocidad y aceleración es mucho menor que el tamaño de las mismas. El movimiento de la carga no afecta el estado estacionario de la misma y el campo eléctrico y magnético son despreciables.

La fuerza ejercida por una carga puntual Q1 sobre otra carga puntual Q2 es descrita por la ley de Coulomb [43]

$$\hat{F}_{12} = \frac{Q_1 Q_2}{4\pi\epsilon_0 r^2} \hat{r}_{12} \dots (2.1)$$

La ecuación 2.1 establece que la fuerza entre dos cargas puntuales es proporcional al producto de las cargas e inversamente proporcional al cuadrado de la distancia que las separa, donde r es la separación de las cargas y \hat{r}_{12} el vector unitario de Q1 a Q2. La constante ϵ_0 es la permitividad dieléctrica del vacío con un valor de 8.854×10^{-12} [F/m]. La fuerza es atractiva cuando las dos cargas son de diferente signo y repulsiva cuando tienen el mismo signo [59].

2.2 Campo eléctrico y potencial eléctrico

Se puede definir la intensidad de campo eléctrico \vec{E} , sobre una carga puntual de prueba positiva, que produce la fuerza de Coulomb como [59]

$$\vec{E} = \frac{Q}{4\pi\epsilon_0 r^2} \hat{r}_{12} \dots (2.2)$$

La dirección y las líneas de campo de un campo eléctrico para una carga puntual negativa es mostrada en la figura 2.1.

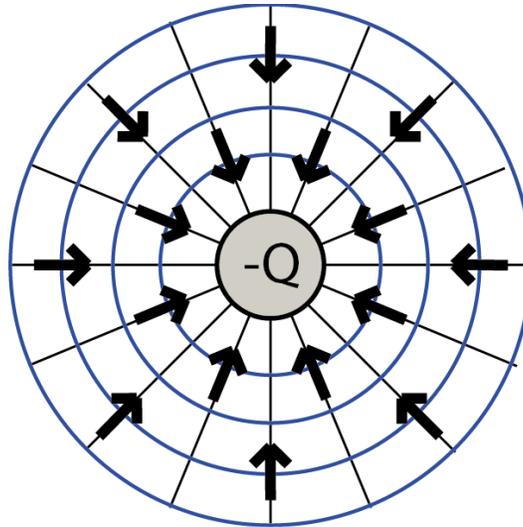


Figura 2.1 Líneas de campo eléctrico (líneas negras), dirección del campo (flechas) y líneas equipotenciales (círculos azules) para un punto de carga negativo [43].

El potencial eléctrico es definido escalar ϕ , por lo que el campo eléctrico está dado por $E = -\nabla\phi$. Las unidades del potencial eléctrico son Volts [V] y las unidades del campo eléctrico son por lo tanto [V/m] [43].

2.3 Polarización y dieléctricos

Un material dieléctrico es un material que contiene cargas que se polarizan bajo la influencia de un campo eléctrico [43]. Estas cargas están confinadas dentro del material y solo pueden moverse distancias cortas [43]. Ante la presencia de un campo eléctrico, las cargas positivas y negativas se mueven en direcciones opuestas para formar dipolos llamados dipolos inducidos, sin embargo, algunos materiales están constituidos con moléculas que forman dipolos permanentes que se reorientan con el campo eléctrico [43].

2.3.1 Dipolos

El dipolo dieléctrico está formado por una distribución de dos cargas con la misma magnitud Q pero de signo contrario, separadas por una distancia d como en la figura 2.2 [43]. Podemos definir el momento dipolar como el vector \vec{p} , donde

$$\vec{p} = Q\vec{d} \dots (2.3)$$

Y el vector \vec{d} es el vector de desplazamiento desde la carga negativa hacia la positiva.

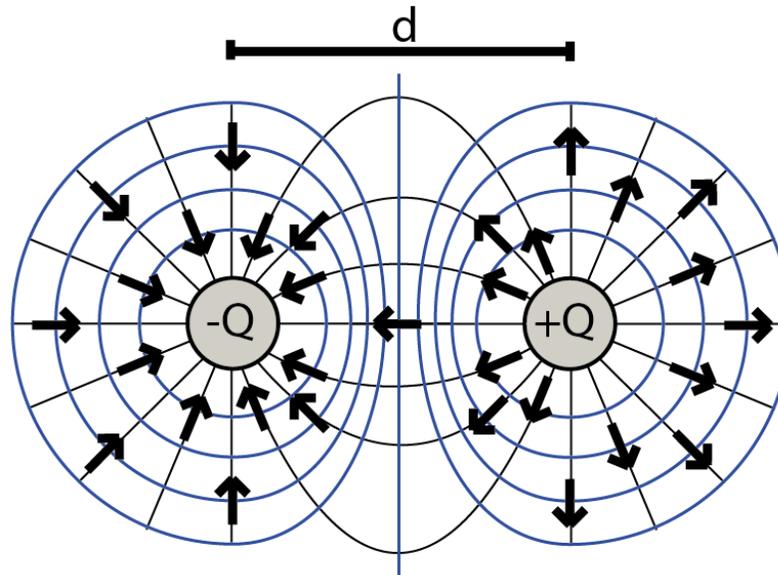


Figura 2.2 líneas de campo eléctrico (líneas negras), dirección del campo eléctrico (flechas) y líneas equipotenciales (líneas azules) para un dipolo conformado por dos cargas iguales [43].

2.3.2 Mecanismos de polarización

Existen varios mecanismos de polarización que pueden presentarse cuando un campo eléctrico es aplicado a un dieléctrico:

- Polarización electrónica. Ante un campo eléctrico, el centro de carga de la nube de electrones de cada átomo se mueve ligeramente con respecto al centro de carga del núcleo [43].
- Polarización atómica. En un sólido cristalino, los iones con diferente signo se mueven en diferentes direcciones bajo la influencia de un campo eléctrico. El pequeño desplazamiento de las cargas en la red atómica causa la polarizabilidad atómica [43].
- Polarización por orientación. Es la polarización debida al alineamiento de los dipolos permanentes de dieléctricos polares [43].
- Polarización de interfaz. En las interfaces de distintos materiales o locaciones donde el dieléctrico es inhomogéneo o en su superficie donde se causa una distorsión macroscópica del campo eléctrico se acumulan cargas en donde también se efectúa el intercambio de iones a lo largo de toda la superficie [43].

Asumiendo que los mecanismos de polarizabilidad actúan independientemente, entonces la polarizabilidad total de un dieléctrico es la suma de todas las anteriores.

2.4 Dieléctricos en un campo eléctrico estático

La unión de átomos es la constitución más elemental de todos los materiales. Estos átomos están formados por un núcleo con carga positiva rodeado por electrones con carga negativa [59]. Debido a las cargas ligadas presentes en los materiales dieléctricos, cuando se presenta un campo eléctrico existe un desplazamiento de cargas positivas y negativas en direcciones opuestas sin modificar la carga neutra neta a nivel macroscópico del material [59]. Estos desplazamientos, aunque suelen ser pequeños en comparación con las dimensiones atómicas, polarizan el material dieléctrico creando dipolos inducidos como se ilustra en la figura 2.3 [59].

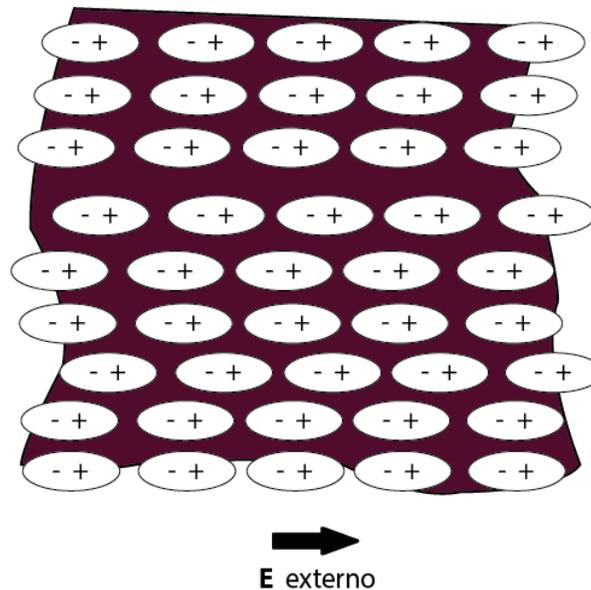


Figura 2.3. Corte transversal de un medio dieléctrico polarizado [59].

2.4.1 Densidad superficial de carga y densidad volumétrica de carga

Podemos separar los efectos físicos del vector de polarización \vec{P} en efectos de superficie y en efectos de volumen [59].

La densidad superficial de carga está formada por la densidad de dipolos eléctricos que se forman en la frontera de una superficie que delimita el volumen de un material [59].

$$\rho_{ps} = \vec{P} \cdot \vec{a}_n \dots (2.7)$$

Donde ρ_{ps} es la densidad superficial de carga de polarización equivalente y \vec{a}_n es un vector unitario normal a la superficie [59].

La densidad volumétrica de carga queda definida como [59]

$$\rho_{pv} = -\nabla \cdot \vec{P} \dots (2.8)$$

2.5 Densidad de flujo eléctrico y constante dieléctrica

Ya que un dieléctrico polarizado presenta una densidad volumétrica de carga ρ_{pv} , entonces la intensidad de campo eléctrico dentro del dieléctrico es diferente a la intensidad de campo eléctrico en el espacio libre, por lo que la divergencia de campo eléctrico dentro del dieléctrico será [59]

$$\nabla \cdot \vec{E} = \frac{1}{\epsilon_0} (\rho_v + \rho_{pv}) \dots (2.9)$$

Usando la ecuación (2.8) entonces

$$\nabla \cdot (\epsilon_0 \vec{E} + \vec{P}) = \rho_v \dots (2.10)$$

De la ecuación (2.10) se define la densidad de flujo eléctrico o desplazamiento eléctrico D como

$$\vec{D} = \epsilon_0 \vec{E} + \vec{P} \dots (2.11)$$

Entonces, podemos utilizar las ecuaciones (2.10) y (2.11) para obtener la ecuación

$$\nabla \cdot \vec{D} = \rho_v \dots (2.12)$$

Donde ρ_v es la densidad volumétrica de las cargas libres. La ecuación (2.12) también es conocida como la Ley de Gauss en medios dieléctricos [59].

Cuando consideramos que las propiedades dieléctricas del medio son lineales e isotropas, la polarización es directamente proporcional a la intensidad de campo eléctrico y la constante de proporcionalidad es independiente de la dirección del campo [59]. Entonces se puede relacionar

$$\vec{P} = \epsilon_0 \chi_e \vec{E} \dots (2.13)$$

Donde χ_e es la susceptibilidad eléctrica. Si sustituimos la ecuación (2.13) en la ecuación (2.11)

$$\vec{D} = \epsilon_0 (1 + \chi_e) \vec{E} \dots (2.14)$$

$$\vec{D} = \epsilon_0 \epsilon_r \vec{E} \dots (2.15)$$

$$\vec{D} = \varepsilon \vec{E} \dots (2.16)$$

Donde ε es conocida como la permitividad absoluta del medio y ε_r es la permitividad relativa o constante dieléctrica definida como

$$\varepsilon_r = 1 + \chi_e = \frac{\varepsilon}{\varepsilon_0} \dots (2.17)$$

Las constantes dieléctricas para diferentes materiales están enlistadas en la tabla (2.1) en donde observamos que la constante dieléctrica del aire se considera 1, por ser muy cercana a la constante dieléctrica del espacio libre [59].

Tabla 2.1. Constantes dieléctricas de algunos materiales comunes [59].

MATERIAL	CONSTANTE DIELÉCTRICA
Aire (presión atmosférica)	1.0
Aceite Mineral	2.3
Papel	2 – 4
Poliestireno	2.6
Caucho	2.3 – 4.0
Vidrio	4 - 10
Mica	6.0

2.6 Campos alternos y permitividades complejas

2.6.1 Permitividad compleja

Si examinamos la polarización de un dieléctrico con permitividad ε y conductividad σ en respuesta a un campo eléctrico alterno, de frecuencia f y frecuencia angular $\omega = 2\pi f$, se puede introducir el concepto de permitividad compleja, que describe la dependencia de esta de la frecuencia del campo eléctrico aplicado [43].

Definimos el campo eléctrico armónico tomando la parte real de la forma fasorial

$$\vec{E} = \text{Re}[\tilde{E}e^{i\omega t}]$$

que está relacionado a un potencial complejo por la expresión $\vec{E} = -\nabla\tilde{\phi}$ donde el potencial es definido como

$$\vec{\phi} = \text{Re}[\tilde{\phi}e^{i\omega t}]$$

La Ley de Gauss puede ser expandida para describir materiales dieléctricos utilizando la ecuación de conservación de la carga para las cargas libres ρ_v [43]. Cuando consideramos que el campo eléctrico es un campo armónico, de frecuencia angular ω , entonces el operador $\partial/\partial t = i\omega$ [43] y la ecuación de la conservación de la carga es

$$\nabla \cdot \vec{J}_v = -\frac{\partial \rho_v}{\partial t} = -i\omega \rho_v \dots (2.18)$$

Si asumimos que solo las cargas libres contribuyen a la conductividad del material [43] entonces usamos la ley de Ohm

$$\nabla \cdot \sigma \vec{E} = -i\omega \rho_v \dots (2.19)$$

Podemos sustituir la ecuación (2.19) en la ley de Gauss haciendo uso de la ecuación (2.16)

$$\nabla \cdot (\vec{D}) = \rho_v$$

$$\nabla \cdot (\epsilon \vec{E}) = -\nabla \cdot \left(\frac{\sigma}{i\omega} \vec{E} \right) \rightarrow \nabla \cdot \left(\epsilon + \frac{\sigma}{i\omega} \vec{E} \right) = 0$$

Lo que podemos escribir como

$$\nabla \cdot (\tilde{\epsilon} \vec{E}) = 0$$

Con lo anterior, podemos definir la permitividad dieléctrica compleja $\tilde{\epsilon}$ como

$$\tilde{\epsilon} = \epsilon_0 \epsilon_r - i \frac{\sigma}{\omega} \dots (2.20)$$

2.6.2 Polarización de interfaz

Los sistemas reales en donde se presenta la polarización, casi siempre consisten en un determinado número de dieléctricos con características eléctricas diferentes [43]. En dielectroforesis, por ejemplo, el sistema consiste en una suspensión de partículas dieléctricas en un fluido dieléctrico [43]. Cuando un campo eléctrico es aplicado, las cargas superficiales se acumulan en las discontinuidades (o interfaces) entre los dieléctricos debido a sus diferentes características eléctricas [59]. Ya que la polarización de cada dieléctrico es dependiente de la frecuencia del campo presente, la magnitud de la carga superficial también es dependiente de la frecuencia [43]. Si el sistema consiste en una sola partícula dieléctrica y un fluido que la rodea, la distribución de la densidad de carga

superficial alrededor de la superficie cerrada de la partícula da como resultado un momento dipolar inducido [43]. La influencia de un campo eléctrico sobre este dipolo da como resultado fuerzas y torques que son fundamentales en la electrocinética.

2.6.3 Momento dipolar inducido efectivo de una partícula esférica.

Como ya se mencionó, la aplicación de un campo eléctrico hace que las cargas se concentren en la interfaz entre dos dieléctricos de diferente permitividad o conductividad [43].

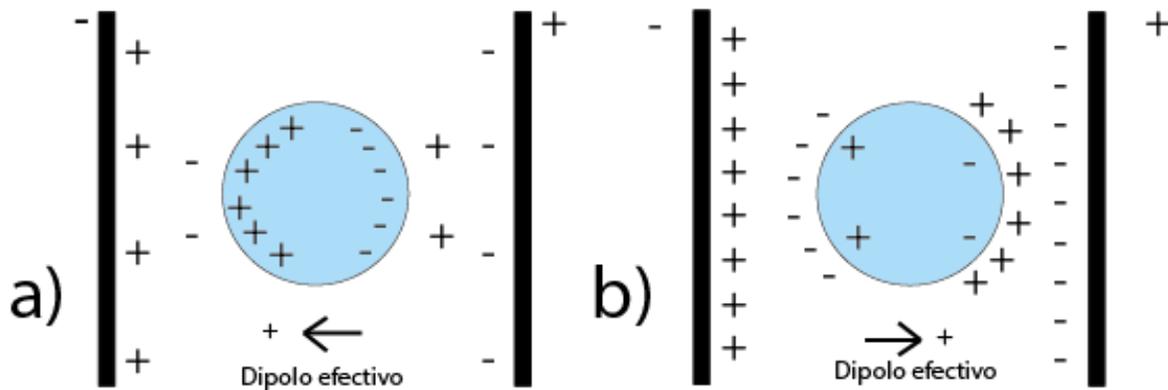


Figura 2.4 Representación esquemática de la polarización de un dipolo eléctrico sometido a un campo eléctrico uniforme.

a) La partícula es más polarizable que el medio y b) cuando la partícula es menos polarizable que el medio. El dipolo es paralelo al campo si la partícula es más polarizable y antiparalelo cuando la partícula es menos polarizable que el medio [43].

Cuando una partícula dieléctrica esférica, que está suspendida en un fluido dieléctrico, es sometida a un campo eléctrico aplicado, las cargas de signos opuestos se acumulan a cada lado de la partícula como se muestra en la figura 2.4 [43]. Cuando la polarizabilidad de los dos dieléctricos son diferentes, la carga neta en la interfaz es diferente de cero y el signo de la carga es opuesto en cada lado de la partícula [43]. El momento dipolar efectivo depende de las propiedades de la partícula y del medio en la que se encuentra suspendida [43].

El momento dipolar de una partícula esférica en función del campo eléctrico aplicado es

$$\vec{p} = 4\pi\epsilon_m \left(\frac{\tilde{\epsilon}_p - \tilde{\epsilon}_m}{\tilde{\epsilon}_p + 2\tilde{\epsilon}_m} \right) \alpha^3 \vec{E} \dots (2.21)$$

En donde $\tilde{\epsilon}_p$ y $\tilde{\epsilon}_m$ son las permitividades complejas de la partícula y el medio respectivamente y α es el radio de la partícula [43]. La expresión (2.21) es el momento

dipolar efectivo de la esfera y a veces es escrita en términos del volumen de la esfera v y su polarizabilidad efectiva $\tilde{\alpha}$

$$\vec{p} = v\tilde{\alpha}\vec{E} \dots (2.22)$$

De las ecuaciones (2.21) y (2.22), la polarizabilidad efectiva es

$$\tilde{\alpha} = 3\varepsilon_m \left(\frac{\tilde{\varepsilon}_p - \tilde{\varepsilon}_m}{\tilde{\varepsilon}_p + 2\tilde{\varepsilon}_m} \right) = 3\varepsilon_m \tilde{f}_{CM} \dots (2.23)$$

Como se ha mencionado, la magnitud de la polarizabilidad, y por tanto, el momento dipolar de la partícula es dependiente de la frecuencia del campo aplicado. Esta dependencia se atribuye al factor Clausius-Mossotti [43]

$$\tilde{f}_{CM} = \frac{\tilde{\varepsilon}_p - \tilde{\varepsilon}_m}{\tilde{\varepsilon}_p + 2\tilde{\varepsilon}_m} \dots (2.24)$$

Ya que la acumulación de carga que se presenta en la interfaz de la partícula es dependiente de la frecuencia, se puede definir una frecuencia de relajación llamada de Maxwell-Wagner como $\omega_{MW} = 2\pi f_{MW} = 1/\tau_{MW}$ donde τ_{MW} es el tiempo de relajación de la polarización efectiva de la partícula definido como

$$\tau_{MW} = \frac{\varepsilon_p + 2\varepsilon_m}{\sigma_p + 2\sigma_m} \dots (2.25)$$

La parte real del factor Clausius-Mossotti en el límite de bajas frecuencias toma un valor de

$$\frac{\sigma_p - \sigma_m}{\sigma_p + 2\sigma_m}$$

que depende solamente de la conductividad de la partícula y del medio en el que está [43]. En el límite de las altas frecuencias toma un valor de

$$\frac{\varepsilon_p - \varepsilon_m}{\varepsilon_p + 2\varepsilon_m}$$

en donde la polarización es dominada por la permitividad de la partícula y del medio que la rodea [43]. La parte imaginaria es cero a altas y bajas frecuencias y en la frecuencia de relajación f_{MW} tiene un valor de [59]

$$\frac{1}{2} \left(\frac{\varepsilon_p - \varepsilon_m}{\varepsilon_p + 2\varepsilon_m} - \frac{\sigma_p - \sigma_m}{\sigma_p + 2\sigma_m} \right)$$

La variación de la parte real y la parte imaginaria del factor Clausius-Mossotti está representada en la figura 2.5

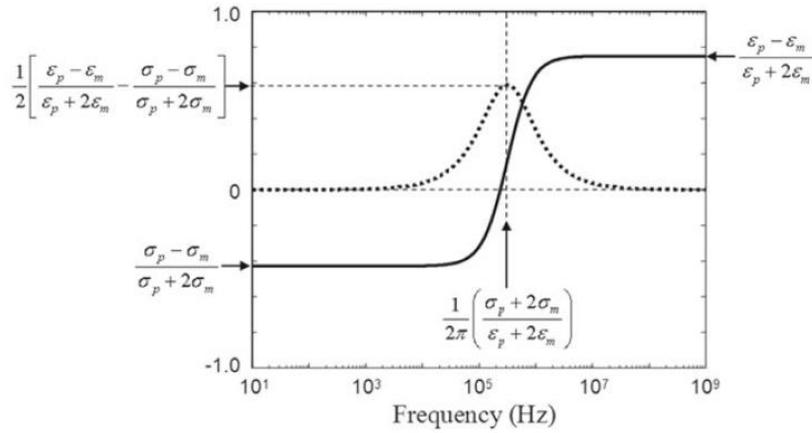


Figura 2.5 Gráfica de la parte real (línea sólida) y parte imaginaria (línea punteada) del factor Clausius-Mossotti en función de la frecuencia para valores arbitrarios de permitividad y conductividad [43].

2.7 Dielectroforesis

2.7.1 Fuerza en un dipolo inducido: Dielectroforesis (DEP)

Se le denomina dielectroforesis al movimiento de una partícula producido por la interacción de un campo eléctrico no uniforme con el momento dipolar inducido de una partícula [43]. Si el campo es espacialmente uniforme, la fuerza de cada uno de los polos inducidos del dipolo es igual y opuesta, por lo que la partícula no tiene movimiento [43]. Si el campo es no uniforme, las fuerzas en los polos no son iguales y la partícula se mueve. Este campo no uniforme se puede generar a partir de un arreglo geométrico de electrodos como se muestra en la figura 2.6 [43].

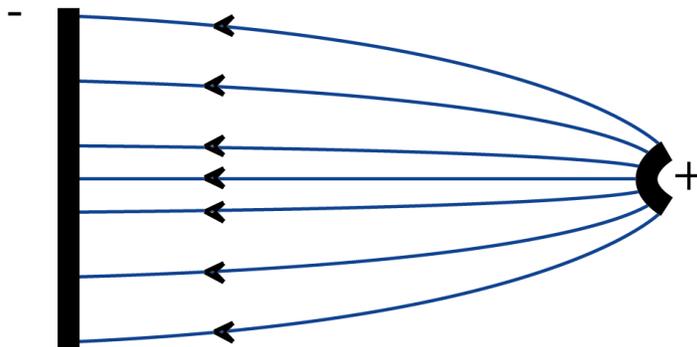


Figura 2.6 Diagrama esquemático de un campo eléctrico no uniforme generado por electrodos con geometrías de un punto y un plano [43]

Cuando la partícula es más polarizable que el medio que la rodea, como se muestra

en la figura 2.7a, se produce más carga dentro de la interfaz y el dipolo apunta en la misma dirección que el campo eléctrico aplicado. Ambos polos del dipolo son atraídos hacia el electrodo que corresponde a la carga opuesta de este, pero el polo que está frente al electrodo pequeño está en una región de campo más intenso, por lo que experimenta una mayor fuerza de atracción [43]. Como resultado, la partícula es movida en la dirección en la que aumenta la intensidad de campo, efecto que se conoce como dielectroforésis positiva [43].

Si la partícula es menos polarizable que el medio que la rodea como en la figura 2.7b, más carga es inducida en el medio que rodea a la partícula y el dipolo apunta en dirección opuesta al campo eléctrico [43]. Ambos polos experimentan fuerzas repulsivas desde los electrodos, pero el polo que está del lado del electrodo pequeño experimenta una mayor fuerza de repulsión por el incremento de la intensidad de campo eléctrico en la región. Esto es conocido como dielectroforesis negativa [43].

En la figura 2.7 también se presentan los dos medios ciclos de un campo alterno, demostrando cómo cambia el signo de las cargas y la dirección del dipolo efectivo en cada ciclo del campo alterno, manteniendo la dirección del movimiento debido a la fuerza de dielectroforesis en la misma dirección [43]. Esto denota que debido a que la carga es inducida por el campo eléctrico, la fuerza de Coulomb tiene una dependencia en segundo orden con el campo y que la fuerza de dielectroforesis promedio es diferente de cero [43].

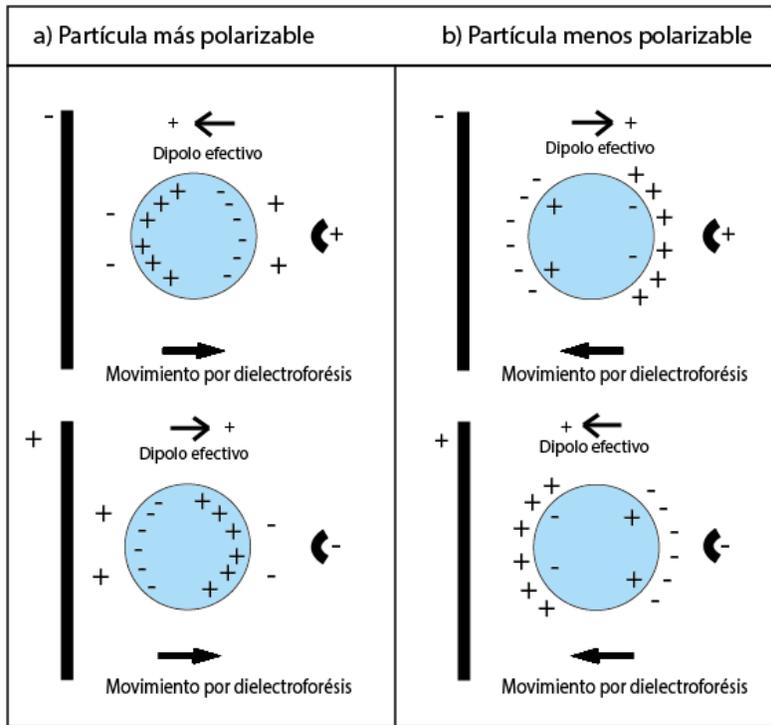


Figura 2.7 Diagrama esquemático del dipolo inducido en una partícula esférica

Se ilustran dos casos: a) una partícula más polarizable que el medio y b) una partícula menos polarizable que el medio [43].

Para derivar la fuerza de dielectroforesis, suponemos un dipolo $\vec{p} = Q\vec{d}$ dentro de un campo eléctrico no uniforme \vec{E} , como se muestra en la figura 2.8. Cada una de las cargas experimenta un valor de campo eléctrico diferente, por lo que el dipolo experimentará una fuerza de la forma

$$\vec{F} = Q\vec{E}(\vec{r} + \vec{d}) - Q\vec{E}(\vec{r}) \dots (2.26)$$

Donde el vector \vec{r} es la posición de la carga negativa [43]. Si el tamaño del vector \vec{d} es pequeño comparado con una dimensión típica de la no uniformidad del campo eléctrico, \vec{E} puede ser expandido usando la serie vectorial de Taylor para que la fuerza del dipolo sea [43]

$$\vec{F} = Q\vec{E}(\vec{r}) + Q(\vec{d} \cdot \nabla)\vec{E} + \text{términos de mayor orden} - Q\vec{E}(\vec{r})$$

$$\vec{F} = Q\vec{E}(\vec{r}) + Q \left(d_x \frac{\partial}{\partial x} + d_y \frac{\partial}{\partial y} + d_z \frac{\partial}{\partial z} \right) \vec{E} + \text{términos de mayor orden} - Q\vec{E}(\vec{r}) \dots (2.27)$$

Sustituyendo el momento dipolar y despreciando los efectos de los términos de mayor orden, obtenemos la expresión para la fuerza en un dipolo, o también conocida como

fuerza de dielectroforesis

$$\vec{F}_{DEP} = (\vec{p} \cdot \nabla) \vec{E} \dots (2.28)$$

Esta ecuación nos dice que cuando el campo eléctrico es uniforme, la fuerza de dielectroforesis es cero, por lo que la dielectroforesis solo puede ocurrir con la aplicación de un campo no uniforme [43].

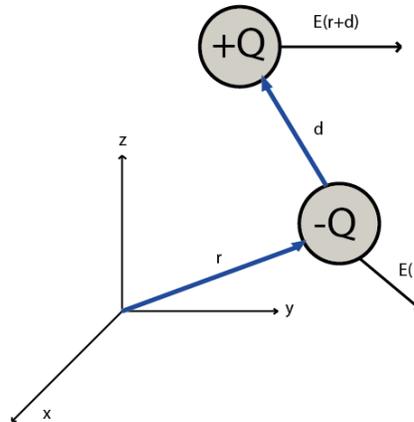


Figura 2.8 Un dipolo arbitrario en un campo eléctrico arbitrario experimenta una diferencia de campo eléctrico (magnitud y dirección) en cada uno de sus polos.

2.7.2 Dielectroforesis en un campo alterno

Asumiendo que el campo eléctrico aplicado a una partícula varía su magnitud en el espacio y que se encuentra en fase constante, entonces se puede derivar la fuerza de dielectroforesis sobre ella aplicando un potencial de frecuencia ω [43]. Como las variables del sistema son dependientes del tiempo y se pueden representar en fasores, entonces podemos definir un potencial armónico como $\vec{\phi}(\vec{x}, t) = \text{Re}[\tilde{\phi}e^{i\omega t}]$, por lo que el campo eléctrico es $\vec{E}(\vec{x}, t) = \text{Re}[\tilde{E}e^{i\omega t}]$, donde el vector $\tilde{E} = -\nabla\tilde{\phi} = -(\nabla\phi_R + i\nabla\phi_I)$ es el fasor correspondiente. Si la fase es constante a través de todo el sistema, entonces el fasor puede ser tomado como la parte real sin perder generalidad $\tilde{E} = \vec{E} = -\nabla\phi_R$ [43].

Con lo anterior y con la ecuación (2.22) del momento dipolar efectivo de una esfera, el momento dipolar de la partícula es

$$\tilde{p} = v\tilde{\alpha}\vec{E}e^{i\omega t} \dots (2.29)$$

Y de la ecuación (2.28), la fuerza promedio en la partícula es

$$\langle \vec{F}_{DEP} \rangle = \frac{1}{2} \text{Re}[(\tilde{p} \cdot \nabla) \vec{E}^*] \dots (2.30)$$

Donde * indica el complejo conjugado. En este caso los fasores son reales y la fuerza promedio queda

$$\langle \vec{F}_{DEP} \rangle = \frac{1}{2} v Re[\tilde{\alpha}] (\vec{E} \cdot \nabla) \vec{E} \dots (2.31)$$

Usando la siguiente identidad vectorial

$$\nabla(\vec{A} \cdot \vec{B}) = (\vec{A} \cdot \nabla) \vec{B} + (\vec{B} \cdot \nabla) \vec{A} + \vec{B} \times (\nabla \times \vec{A}) + \vec{A} \times (\nabla \times \vec{B}) \dots (2.32)$$

Tomando en cuenta de que el campo es irrotacional ($\nabla \times \vec{E} = 0$) lo que da

$$\langle \vec{F}_{DEP} \rangle = \frac{1}{4} v Re[\tilde{\alpha}] \nabla(\vec{E} \cdot \vec{E}) \dots (2.33)$$

La anterior es la fuerza de dielectroforesis, que usualmente se representa como

$$\langle \vec{F}_{DEP} \rangle = \frac{1}{4} v Re[\tilde{\alpha}] \nabla |\vec{E}|^2 \dots (2.34)$$

O en su valor RMS como

$$\langle \vec{F}_{DEP} \rangle = \frac{1}{2} v Re[\tilde{\alpha}] \nabla |\overrightarrow{E_{RMS}}|^2$$

Para una partícula esférica, la variación de la magnitud de la fuerza con la frecuencia está dada por la parte real del factor Clausius-Mossotti (2.24), así sustituyendo la polarizabilidad efectiva $\tilde{\alpha}$ en (2.34) obtenemos

$$\langle \vec{F}_{DEP} \rangle = \pi \varepsilon_m a^3 Re \left[\frac{\tilde{\varepsilon}_p - \tilde{\varepsilon}_m}{\tilde{\varepsilon}_p + 2\tilde{\varepsilon}_m} \right] \nabla |\vec{E}|^2 \dots (2.35)$$

La anterior es la expresión completa para la fuerza DEP promedio [43].

2.8 Fluorescencia

La fluorescencia es la emisión de luz que ocurre dentro de los primeros nanosegundos después de la absorción de la energía de fotones, con determinada longitud de onda, para excitar los electrones de los orbitales exteriores situados en un estado de energía de reposo, a un estado de energía mayor. La diferencia entre la longitud de onda de excitación y la longitud de onda emitida, es conocida como el cambio de Stokes [60]. Ya que la longitud de onda de excitación es diferente a la longitud de onda emitida, la fluorescencia es ampliamente utilizada para el estudio biológico, biomédico y bioquímico.

Una forma de evaluar la fluorescencia de forma esquemática, es a través de los diagramas propuestos por Alexander Jablonski (1930), como el de la figura 2.9, donde del lado izquierdo se muestran los estados en donde los electrones normalmente residen en pares y con spines opuestos sobre un mismo orbital y del lado derecho del diagrama se muestran los estados en donde los electrones pueden existir en dos órbitas separadas con el spin paralelo uno del otro [60]. El estado S_0 representa el estado basal, es decir, la energía de un electrón que no ha sido excitado por la luz para moverse a un estado de energía mayor. Los estados S_1 y S_2 son estados con mayor energía ($S_0 < S_1 < S_2$).

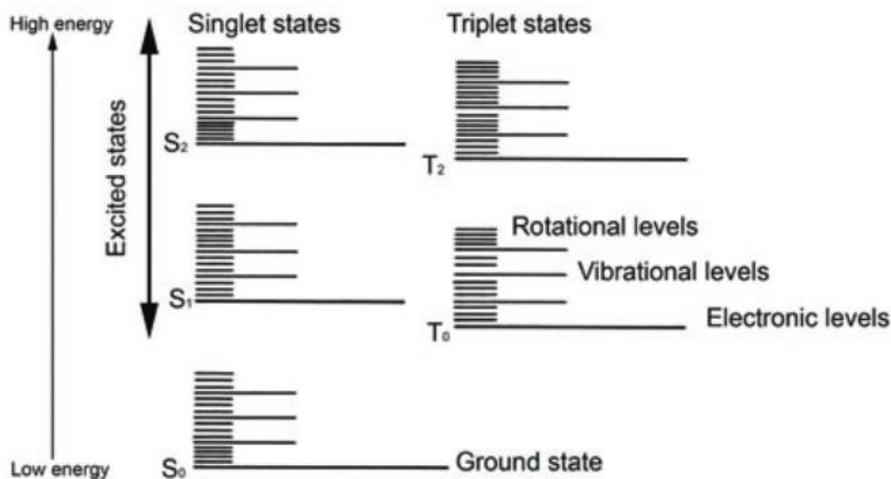


Figura 2.9 Diagrama de Jablonski que muestra los estados de energía de una molécula [60].

2.8.1 Absorción y emisión

Cuando la energía de un fotón absorbido por un fluoróforo es mayor que la energía mínima necesaria para provocar una transición de energía de los electrones situados en los orbitales exteriores de la molécula, entonces esa energía es absorbida y usada para

efectuar un cambio en el estado de energía del electrón, por ejemplo de un estado S0 a un estado S1. Esta energía está inversamente relacionada con la longitud de onda del electrón (λ) como se indica en la ecuación 2.36

$$E = \frac{h \cdot c}{\lambda} \dots (2.36)$$

Donde h es la constante de Planck y c es la velocidad de la luz en el vacío.

Una vez excitada, la molécula utiliza diferentes maneras para liberar energía y regresar a su estado basal. En los fluoróforos, la liberación de esta energía se lleva a cabo en forma de un fotón con la longitud de onda correspondiente según la ecuación 2.36. En la figura 2.10 se muestra un ejemplo del espectro de absorción y emisión de la fluoresceína FITC usando el diagrama de Jablonski [60].

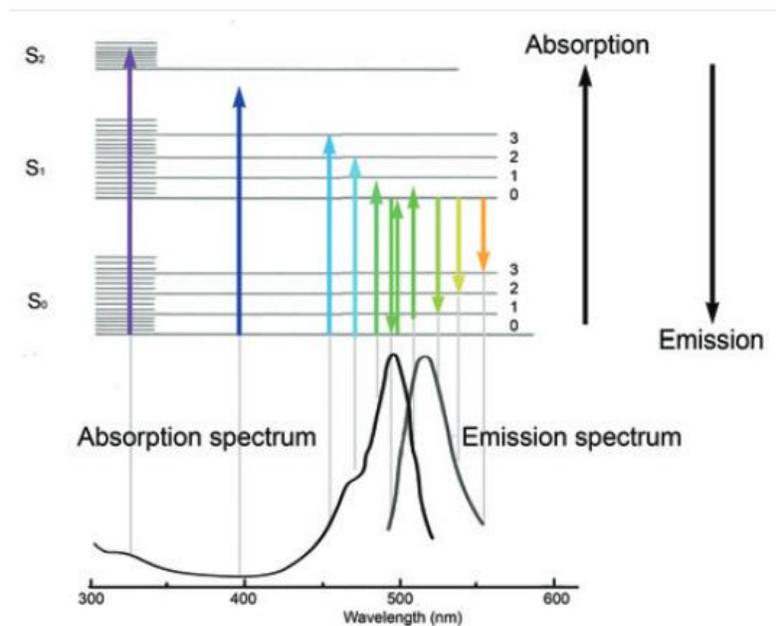


Figura 2.10 Diagrama de Jablonski utilizado para describir el espectro de absorción y emisión de la fluoresceína FITC.

Las flechas se muestran del color de la longitud de onda en la que absorben (flechas hacia arriba) y la longitud de onda en que emiten (flechas hacia abajo) [60].

2.8.2 Fluoróforos

Las moléculas que son usadas por sus propiedades fluorescentes son llamadas fluoróforos. El electrón más externo en los orbitales de la molécula de fluoróforo determina su eficiencia como componente fluorescente así como las longitudes de onda de absorción y de emisión. Cuando estos componentes fluorescentes se encuentran en su estado basal y absorben la energía de fotones, alteraciones electrónicas pueden ocurrir en la molécula.

La energía absorbida normalmente mueve un electrón a un orbital diferente de mayor energía en un tiempo promedio de los femtosegundos. Generalmente el proceso de excitación también provoca la vibración molecular en la cual la distancia entre los núcleos de la molécula varía. Las vibraciones moleculares y la emisión de fluorescencia es la forma en que los fluoróforos regresan a su estado basal, ya que toda la energía absorbida es eventualmente liberada [60].

2.9 Modelado de microcanales usando circuitos eléctricos.

Ya que se requerirá del aumento de la resistencia hidráulica en algunos de los canales microfluídicos dentro del microchip para establecer trayectorias preferenciales para las micro-gotas, en esta sección se modelarán los microcanales como resistencias eléctricas.

Raramente se pueden definir y describir los flujos de fluidos a través de tuberías reales, dado que la el uso de componentes y geometrías en el sistema hidráulico añade complejidad dentro del mismo. Sin embargo, los flujos unidireccionales pueden ser tratados usando técnicas de estimación, lo cual reduce la complejidad del sistema, convirtiéndolo en uno más sencillo de analizar [61].

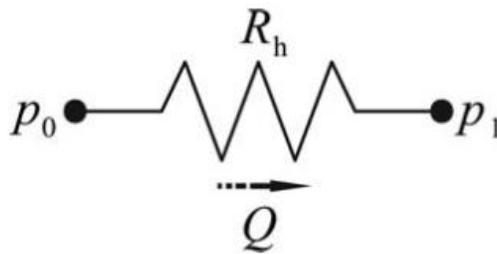


Figura 2.11 Símbolo para relacionar la diferencia de presión con el flujo para una tubería en estado estable.

Para poder aproximar los componentes en los sistemas hidráulicos como componentes en los circuitos eléctricos, es necesario hacer algunas consideraciones [61]:

1. Las tuberías se consideran perfectamente rectas e infinitamente largas.
2. Se desprecian los efectos en las entradas.
3. Se utilizan los resultados de tuberías infinitamente largas como aproximación de los flujos en tuberías finitas.
4. Se cumple que $\frac{R}{L} \ll 1$ y $\frac{R}{L} \ll \frac{1}{Re}$ en donde R es el radio de la tubería y L es el largo del tubo. En este caso podemos asumir que el gradiente de presión a lo largo de la tubería es constante.

Entonces, podemos definir la resistencia hidráulica como

$$R_h = \frac{8\eta L}{AR^2} \dots (2.38)$$

Donde η es la viscosidad dinámica, L es la longitud del canal, A es el área transversal de la tubería y R es el radio de la tubería. Entonces podemos relacionar la resistencia

hidráulica con el flujo Q , que circula por la tubería como se muestra en la figura (2.11), de la siguiente manera

$$\Delta p = p_0 - p_1 \dots (2.39)$$

$$Q = \frac{\Delta p}{R_h} \dots (2.40)$$

La relación (2.40) es llamada la ley de Hagen-Poiseuille. Sin embargo, para los canales microfluídicos, rara vez se obtienen secciones transversales circulares debido a las técnicas de fabricación utilizadas para la construcción de los chips, por lo que, para aproximar la resistencia hidráulica de estos sistemas, se generaliza la ecuación (2.38) usando el radio hidráulico r_h

$$R_h \cong \frac{8\eta L}{r_h^2 A} \dots (2.41)$$

Donde r_h está definido como

$$r_h = \frac{2A}{P} \dots (2.42)$$

Donde P es el perímetro del canal y A es el área transversal del canal.

Capítulo 3 Diseño y Construcción del Microchip

Como se mencionó en la sección 1.1, la creciente necesidad de obtener análisis bioquímicos y biomédicos con tiempos de respuesta más cortos, con mayor exactitud y reduciendo los insumos respecto a los grandes equipos de instrumentación y de laboratorio clínico convencional, han llevado a la búsqueda de nuevas tecnologías de análisis, como las encontradas en los dispositivos Bio-MEMS.

El diseño y la construcción de microchips basados en la tecnología de gotas para el análisis de partículas, de sustancias químicas, de reacciones enzimáticas, etc., involucra la participación de distintas áreas del conocimiento como lo son la mecánica de fluidos, la óptica, la química y la biología, entre otras. Por lo anterior, los proyectos para la implementación de la tecnología de gotas en chip son clasificados como proyectos multidisciplinarios. En este capítulo se especifican los criterios provenientes de diferentes disciplinas que se consideraron para el diseño del microdispositivo.

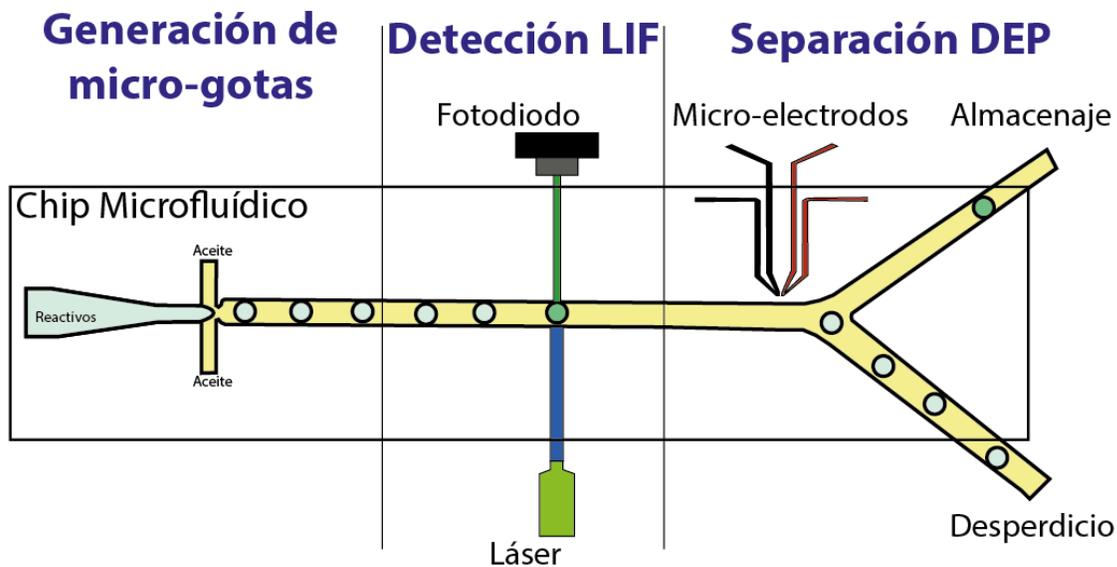


Figura 3.1. Ilustración esquemática simplificada en donde se observan las tres regiones involucradas en el microchip.

3.1 Diseño del Microchip

Para explicar el diseño, separamos el microchip en tres secciones diferentes: **sección de generación, sección de detección (off-chip) y sección de separación** como lo muestra el esquemático de la figura 3.1. Además, la aplicación final del chip microfluídico es determinante para decidir ciertos parámetros de diseño, por esto a continuación abordamos algunos de los principales parámetros de diseño a considerar para la construcción del chip en cuestión.

3.1.1 Especificaciones de diseño

Para poder especificar los parámetros de diseño para la construcción del microchip, empezaremos por identificar qué factores se involucran en las partes que lo componen. En el mapa esquemático de la figura 3.2 se desglosan las consideraciones que hay que tener en cuenta para conseguir los parámetros de diseño. Los tres principales parámetros se encuentran en la fila 2. Los parámetros involucrados en el nivel 5, guardan una estrecha relación con la aplicación final del sistema, por lo que es importante definir dicha aplicación.

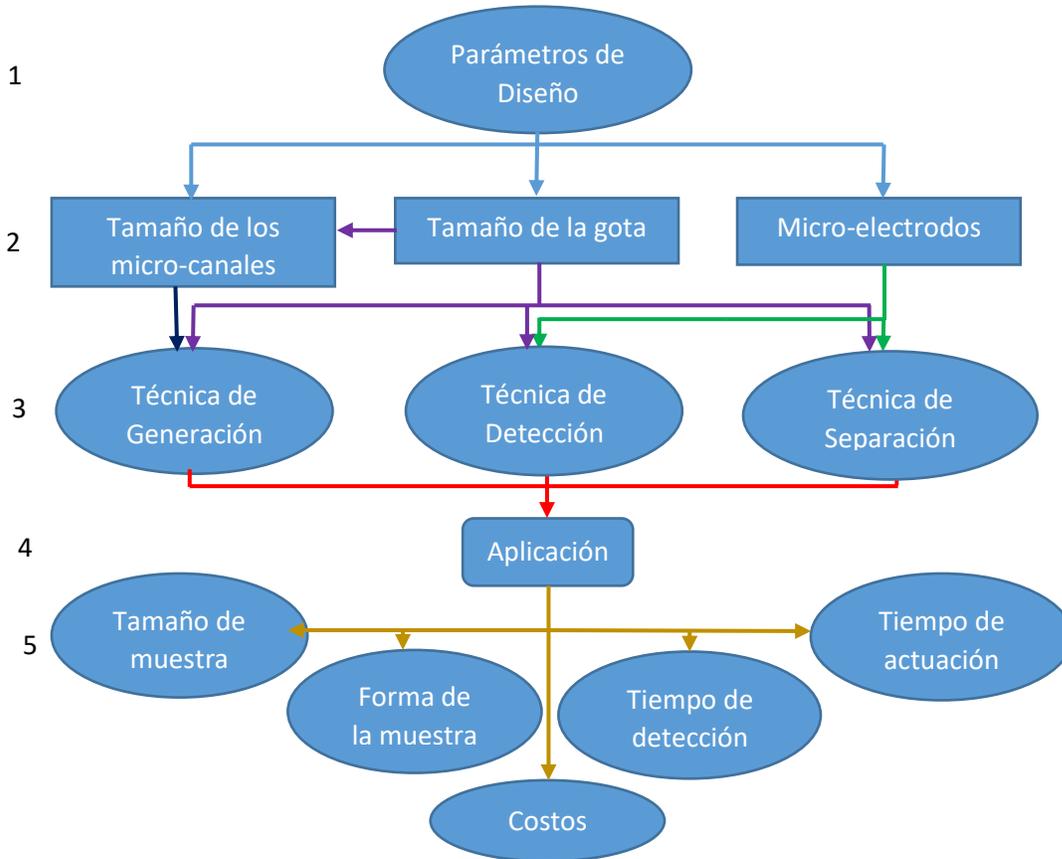


Figura 3.2 Mapa esquemático que muestra los factores involucrados para obtener los parámetros de diseño para la construcción del microchip.

Una de las razones por la que existe un creciente interés por desarrollar sistemas Lab on a chip es que la reducción de tamaños en las características del chip conlleva a la reducción en el dispendio de insumo, y así los costos relacionados a los reactivos empleados también se ven reducidos. Para ejemplificar la relación anterior, en la tabla 3.1 se muestran dos sustancias frecuentemente utilizadas en la investigación, así como la relación que tienen con la reducción en las dimensiones de un depósito fluídico. Ésta comparación muestra claramente que para realizar análisis de bajo costo es deseable

seguir la tendencia de la miniaturización en este sistema.

Tabla 3.1 Reducción de costos en depósitos fluidicos de diferentes dimensiones. ¹<https://www.sciencecompany.com>
²<http://www.sigmaaldrich.com>.

Volumen del depósito fluidoico (ancho x largo x altura)	10(cm)x 10(cm)x 10(cm)	10(mm)x 10(mm)x 10(mm)	10(μm)x 10(μm)x 10(μm)
Costo de Agua Desionizada ¹ (USD)	4.36	4.36E-3	4.36E-12
Costo de Fluoresceina ² a una concentración de 100 μMol (USD)	1.31E-10	1.31E-13	1.31E-22

Por otro lado, se ha reportado que se pueden separar gotas con una tasa de hasta 30[KHz], usando diferentes geometrías [54], por lo que es importante contemplar que los tiempos de detección y de actuación del sistema deben ser reducidos.

El sistema será usado en un futuro para la separación de microgotas contenedoras de bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) muertas de microgotas con bacterias *E. coli* vivas. Las bacterias *E. coli* muertas y las vivas pueden ser diferenciadas por medio de la intensidad de fluorescencia que se emite cuando se utiliza un intercalador de ADN, como el Bromuro de Etidio, el cual solo se intercala en la cadena de ADN de las células muertas. Cuantificando la señal de fluorescencia obtenida al interrogar cada bacteria, es posible diferenciar bacterias muertas de bacterias vivas, ya que las muertas fluorescen mientras que las vivas no lo hacen.

Para modificar la trayectoria de las micro-gotas, proponemos el uso de la fuerza DEP por medio del uso de electrodos embebidos en el microchip. Su diseño se tratará más adelante.

Debido a que evaluaremos el funcionamiento del microchip combinando dos poblaciones diferentes de gotas, y que además, requerimos incubar las microgotas contenedoras de bacterias vivas para obtener bacterias muertas o vivas, y posteriormente

efectuar su separación, es necesario tener dos chips: un chip dedicado solo a la generación de microgotas, y otro dedicado a la separación de las mismas.

Cabe resaltar, que como se observa en la figura 3.1, el sistema de detección de fluorescencia de las micro gotas basado en LIF es externo al dispositivos (*off-chip*) y fue previamente implementado por el compañero Benjamín Vázquez de la Facultad de Ingeniería de la UNAM como parte de su proyecto de maestría [58]. Este sistema es utilizado para realizar ensayos de fluorescencia en micro-gotas en el laboratorio de Biofísicoquímica del Departamento de Físicoquímica de la Facultad de Química de la UNAM. El sistema es capaz de detectar micro-gotas con diámetros del orden de 10^{-6} [m] y con concentraciones de fluoresceína en el orden de 10^{-6} [m]. La disponibilidad de este sistema, además de las ventajas mencionadas en la sección 1.1, respecto a otros sistemas de detección de gotas fluorescentes, lo hacen apto para utilizarlo como técnica de detección en el proyecto que se propone en esta tesis.

A continuación se detalla el diseño y fabricación de los chips de generación y separación de micro-gotas.

3.1.2 Chip para la generación de micro-gotas

Dentro de las partes primordiales en la constitución del microchip está la región para generar las micro-gotas. Para este chip emplearemos una geometría de enfoque de flujo (ampliamente utilizado por el grupo del Dr. Luis Olgún en la Facultad de Química, en la cual usaremos una fase acuosa que será el fluido que formará la micro-gota, y una fase oleosa combinada con surfactante el cual ayudará a mantener a las gotas como entidades individuales, esto es, el surfactante evitará que las gotas coalescan cuando tengan contacto unas con otras. Como se mencionó en la sección 1.1, hay tres factores principales involucrados en la formación de las gotas: la razón con la que se inyectan los fluidos en el chip, la dimensión de los micro-canales y la geometría de los mismos.

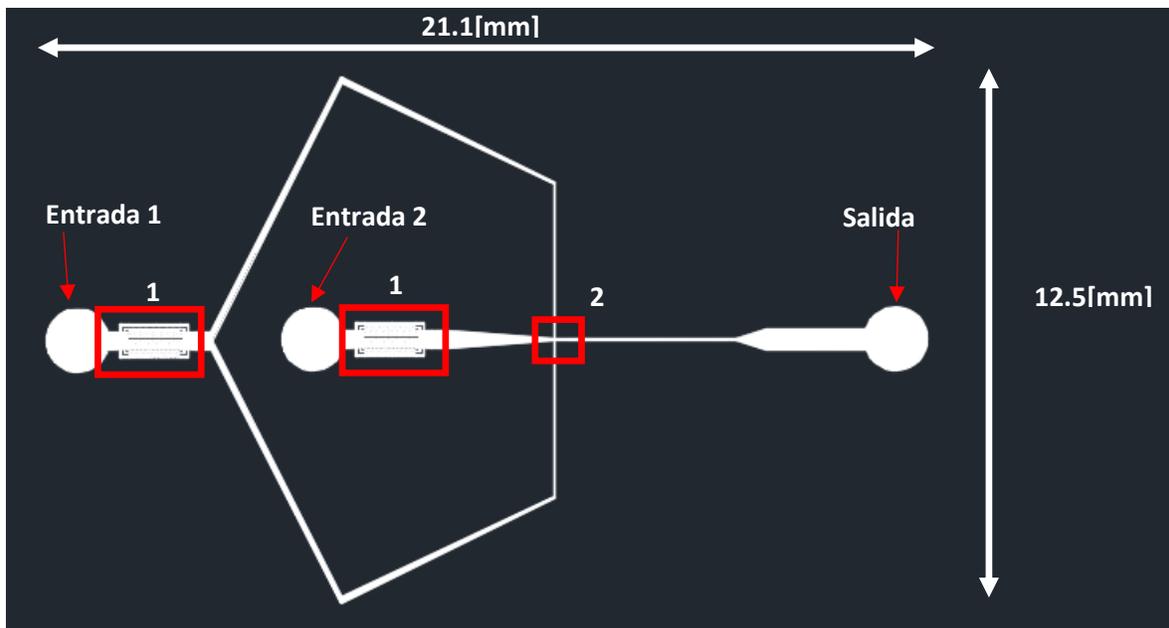


Figura 3.3 Microchip propuesto para la generación de microgotas.

La entrada 1 y 2 son para la entrada de la fase oleosa y la fase acuosa respectivamente y la salida es el lugar por donde se almacenan las microgotas generadas. Los filtros y la unión tipo cruz en donde se generan las gotas están marcadas por los rectángulos rojos 1 (figura 3.4) y 2 (figura 3.5) respectivamente

Las dimensiones de los canales se definen pensando en que se requieren canales delgados para detectar bacterias dentro de las gotas [62]. El tamaño de las bacterias *E. coli* es entre 1 y 3 micrómetros. En el Anexo 1 se muestra el cálculo detallado para predecir el número de bacterias que podemos obtener dentro de cada gota. Para esto usamos la distribución de Poisson, en donde la probabilidad de encontrar x bacterias en el interior de cada gota está dada por la ecuación 3.1.

$$P(X_1 = x_1) = \frac{e^{-\lambda_1} \lambda_1^{x_1}}{x_1!} \dots (3.1)$$

Donde λ representa el número de bacterias que se espera encontrar en el volumen de cada gota, y esto está determinado por la concentración de bacterias en la fase acuosa.

En este trabajo, proponemos utilizar micro-gotas esféricas con un diámetro de 30 $[\mu\text{m}]$, por lo que los canales microfluídicos principales relacionados con la detección de fluorescencia serán de 30 $[\mu\text{m}]$ de ancho. Ya que la concentración de $10^9 \left[\frac{UFC}{ml}\right]$ es una concentración típica utilizada para trabajar con bacterias *E. coli*, hay un 89% de probabilidad de encontrar más de 10 bacterias en cada micro-gota utilizando dicha concentración.

Cuidando entonces que el diámetro de las gotas sea de 30 $[\mu\text{m}]$, y que los microcanales sean adecuados para este tamaño, se propone el chip mostrado en la figura 3.3. El chip está compuesto de dos entradas, correspondientes a la fase oleosa (entrada 1) y a la fase acuosa (entrada 2), y de una salida, por la cual se recolectarán las micro-gotas generadas para su posterior tratamiento. Así mismo, en la figura 3.3, se indican con rectángulos rojos las regiones en donde se ubican los filtros microfluídicos y la región de enfoque de flujo, las cuales podemos ver amplificadas en la figura 3.4 y la figura 3.5 respectivamente.

Los filtros de entrada al microchip son implementados para filtrar la fase acuosa y la fase oleosa y así evitar que el chip se obstruya debido a impurezas presentes en los fluidos, como pelusas y residuos de PDMS, que tengan un tamaño mayor a 15 $[\mu\text{m}]$. Como se explicó antes, la fuerza de cizallamiento que ejerce la fase oleosa sobre la fase acuosa es la que permite generar micro-gotas en la geometría de enfoque de fluido. Esta fuerza se puede modificar cambiando la razón con la que se inyectan ambas fases al microchip, y a su vez esto cambia el tamaño de la micro-gota.

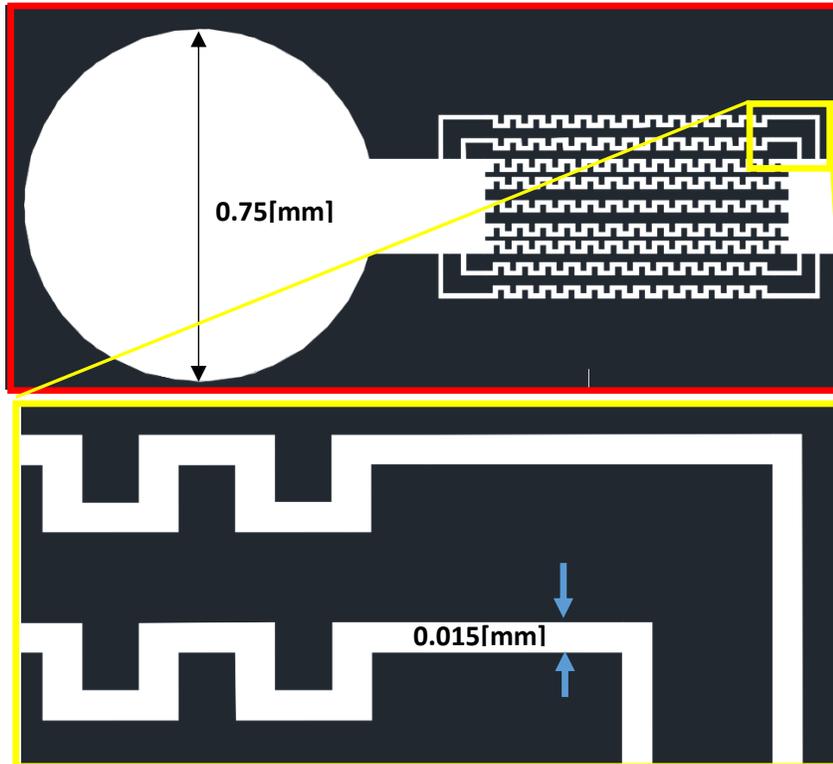


Figura 3.4 Filtros de entrada. Son utilizados para filtrar los fluidos de entrada al microchip.

La principal tarea de este chip es generar gotas para poder almacenarlas en un contenedor y, si es requerido, reinyectarlas en otro chip dedicado para su separación. Dado que las gotas están rodeadas de un surfactante¹, es posible mantenerlas almacenadas o manipularlas por unos cuantos días después de generadas.

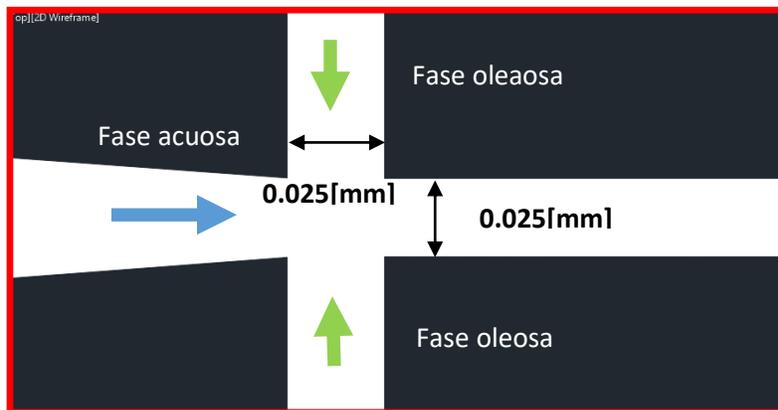


Figura 3.5 Región de enfoque de flujo. En esta región es dónde se forman las microgotas debido a la fuerza de cizalladura que ejerce la fase oleosa sobre la fase acuosa.

¹ Para este trabajo se utilizará PFPE-PEG-PFPE triblock copolymers

Para obtener gotas esféricas de 30 [μm] de diámetro, se realizaron varias pruebas experimentales, ya que se observó que al utilizar canales cuadrados de 30 [μm] por lado en el chip generador, las gotas que se obtenían no era esféricas, sino alargadas. Es así que al reducir la sección transversal del canal a 25 [μm] de ancho por 30 [μm] [19], como se muestra en la figura 3.5, se obtienen gotas alargadas, que al ser reinyectadas al chip de separación, se volvían esféricas con el diámetro del diseño.

3.1.3 Chip para la separación de micro-gotas

En la sección 1.1 se mencionaron las ventajas de emplear un sistema de separación basado en la fuerza DEP en chip, tales como las altas tasas de separación reportados y la facilidad de implementación en chip con respecto de otras formas de actuación.

Del capítulo 2 recordamos que para generar la fuerza DEP sobre la gota, necesitamos formar un campo eléctrico no uniforme dentro del chip, lo cual lograremos usando un par de micro-electrodos no simétricos. En la tabla 3.2 hacemos una comparación de dos tipos de electrodos más utilizados para producir la fuerza DEP.

Tabla 3.2 Tabla comparativa de electrodos planares y electrodos tridimensionales.

Tipo de electrodo	DEP	Método de fabricación	Costo
Electrodos planares	Sí	Técnicas de fotolitografía, evaporación y/o bombardeo de iones y CVD [22][63]	Mayor costo y más infraestructura
Electrodos volumétricos en PDMS	Sí	Técnicas de fotolitografía, técnicas de electro-platinado y litografía suave [64][32]	Menor costo y menor uso de infraestructura

Como este trabajo es una primera propuesta en el cual se fabricarán múltiples chips para evaluar su funcionamiento, se requiere que los electrodos no solamente sean capaces de formar un campo eléctrico no uniforme dentro del micro-canal, sino que es deseable que la técnica de fabricación sea lo más rápida posible y a un costo accesible para el Laboratorio. En el Laboratorio de micro sistemas Bio-MEMS de la Facultad de Ingeniería se tiene desarrollada la técnica de *lift-off* que se menciona en la Tabla 3.2, sin embargo, para su realización, requerimos de acceder a la evaporadora de metal en CCADET y a la posibilidad de adquirir pellets de oro, los cuales son de costo elevado. Por otro lado, los electrodos volumétricos generan la misma no uniformidad del campo eléctrico a lo largo de

toda la altura del micro-canal, mientras que con los electrodos planares la no uniformidad del campo eléctrico es variante con la altura, lo cual podía afectar el movimiento lateral de las micro-gotas por DEP.

Debido a esto es que optamos por la implementación de electrodos volumétricos, los cuales pueden ser fabricados por la técnica de litografía suave y la inyección de soldadura de bajo punto de fusión².

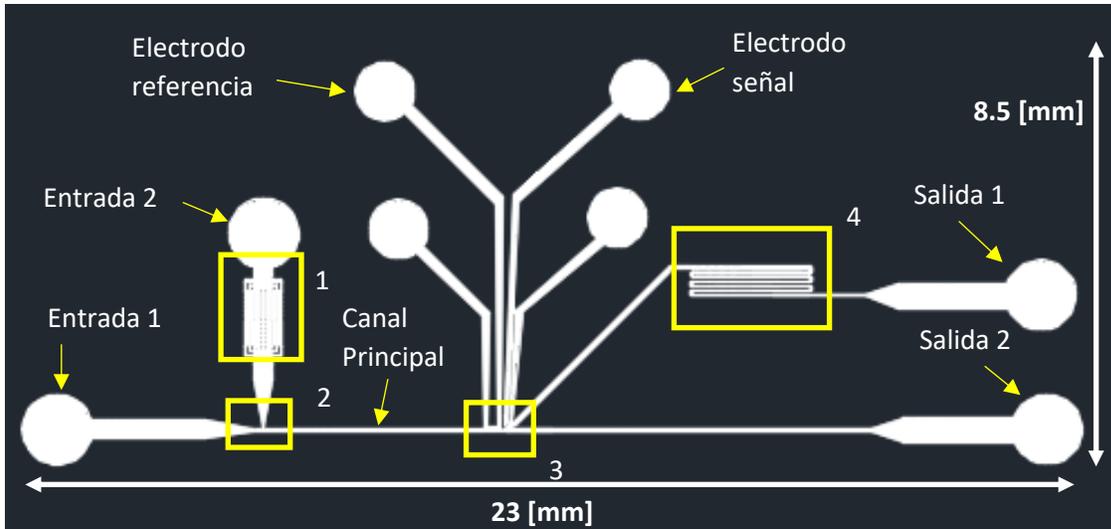


Figura 3.6 Chip separador para la separación de microgotas.

Las principales partes del microchip se encierran en los rectángulos amarillos: 1. Filtros de entrada; 2. Geometría de flujo cruzado, 3. Zona de separación de microgotas, 4. Resistor hidráulico. Las salidas 1 y 2 son terminales de los canales de recolección y de desecho respectivamente.

Recordando que en la sección anterior se especificó que las gotas son esféricas con un diámetro de 30 [μm], el chip propuesto para la separación de micro-gotas tiene una altura de 30 [μm], por lo que el canal principal del chip tendrá una sección cuadrada de 30 [μm], como se muestra en la figura 3.6. Los filtros de entrada del chip están representados en la figura 3.4 mostrada anteriormente. Como las gotas son generadas previamente por el chip propuesto en la sección 3.1.2 y a la salida de este son recolectadas para su posterior separación, la geometría de flujo cruzado en la figura 3.6, que se amplía en la figura 3.7, permitirá separar estas micro-gotas reinyectadas al chip por la entrada 1, usando un flujo de aceite proveniente de la entrada 2. La relación entre las velocidades de infusión de aceite y de gotas fija la separación promedio entre las gotas reinyectadas al chip.

² Indalloy 19, Indium Corporation

Como se muestra en el modelo propuesto de la figura 3.6, existen dos posibles trayectorias que las gotas pueden tomar; una es el canal de recolección que termina en la salida denotada como “salida 1”, y la otra es el canal de desecho que termina en la “salida 2”. En el canal de recolección transitan todas las gotas que son separadas debido a sus características fluorescentes y por el canal de desecho fluyen todas las gotas no deseadas o no seleccionadas.

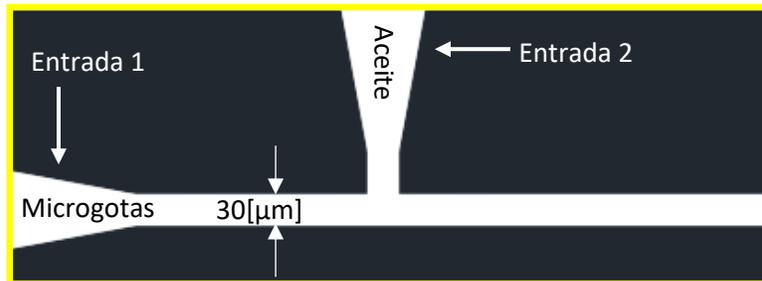


Figura 3.7 Junta T usada para separar las micro-gotas reinyectadas al microchip.

En la figura 3.8 se muestra el serpentín utilizado para incrementar la resistencia hidráulica del canal de recolección del chip de la figura 3.6. Esta resistencia se coloca con el propósito de que las micro-gotas fluyan sólo por el canal de desperdicio si es que no son seleccionadas para su separación. El cálculo de la resistencia de este diseño se lleva a cabo en el Anexo 2, en donde se resalta que la trayectoria que recorren las gotas seleccionadas presenta casi 7 veces más resistencia que la trayectoria de desperdicio, por lo que el camino preferencial de las gotas será el canal de desperdicio.



Figura 3.8 Resistor hidráulico utilizado para

En la figura 3.9 se hace un acercamiento al diseño propuesto para separar las microgotas, en donde se aprecian las medidas de algunos canales incluyendo las medidas de los electrodos.

Los electrodos con geometrías asimétricas entre ellos generan un campo eléctrico no uniforme como se explica en la sección 2.7.1, el cual es necesario para generar la fuerza de dielectroforesis. Así pues, la geometría de los electrodos propuesta, se basó en la literatura en donde se ha reportado que este tipo de geometría es capaz de generar una fuerza de dielectroforesis para separación de microgotas en plataformas microfluídicas [55]. Como las microgotas tendrán un tamaño de $30\ \mu\text{m}$, éstas fluirán abarcando la parte central del microcanal. Para corroborar que la mayor magnitud de campo eléctrico se encuentre en la zona de bifurcación, ya que es la región en donde se debe desviar la microgota cuando los electrodos se enciendan, se realizó una simulación numérica en COMSOL Multiphysics usando la porción del chip mostrado en la figura 3.9, cuyo desarrollo se muestran en el *Anexo 3*.

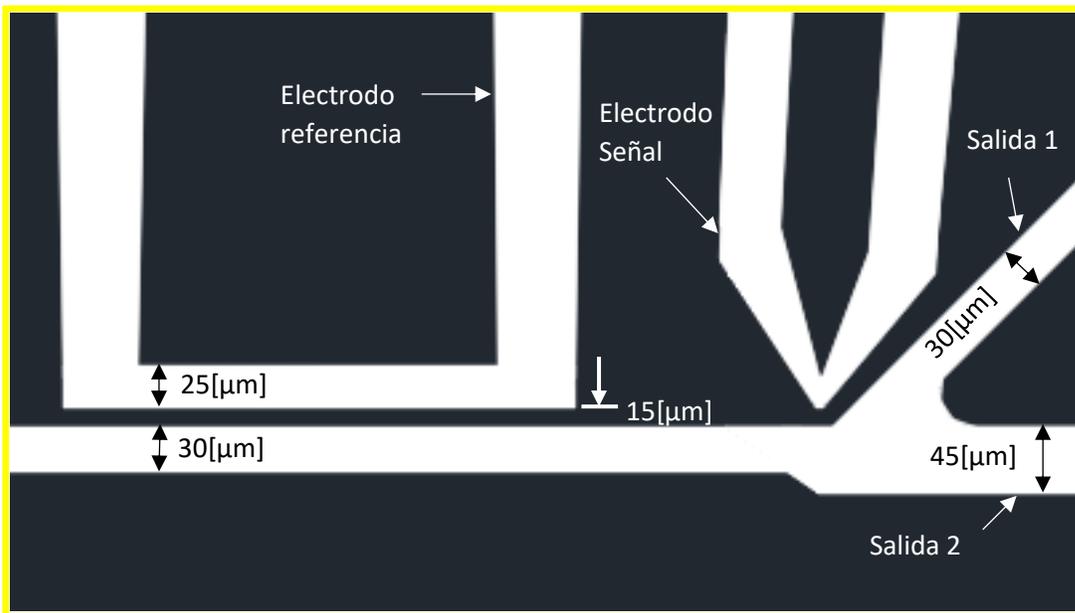


Figura 3.9 Porción de chip microfluídico para separación de gotas.

Como resultado de las simulaciones, obtuvimos las líneas de campo eléctrico formadas dentro del canal microfluídico en estado estacionario cuando una diferencia de potencial de $10\ \text{V}$ en corriente continua es aplicado entre los electrodos. En la simulación se usó una velocidad del fluido de $150\ \mu\text{m/s}$ a la entrada de chip, que es la velocidad que se deseará utilizar para hacer separación de gotas a altas velocidades. En la figura 3.10,

se muestra el campo eléctrico obtenido de la simulación y se observa que las líneas de campo (líneas rojas) sufren una curvatura dentro del canal debido a la geometría de los electrodos, esto indica que el campo eléctrico es un campo no uniforme en esta región.

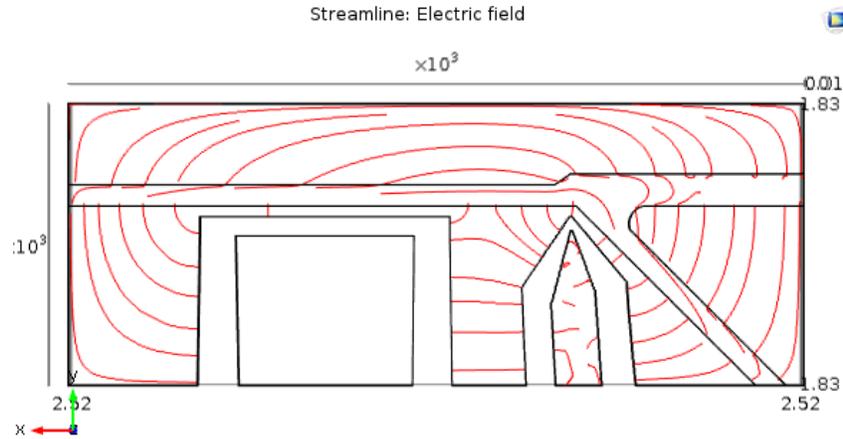


Figura 3.10 Líneas de campo eléctrico en el chip.

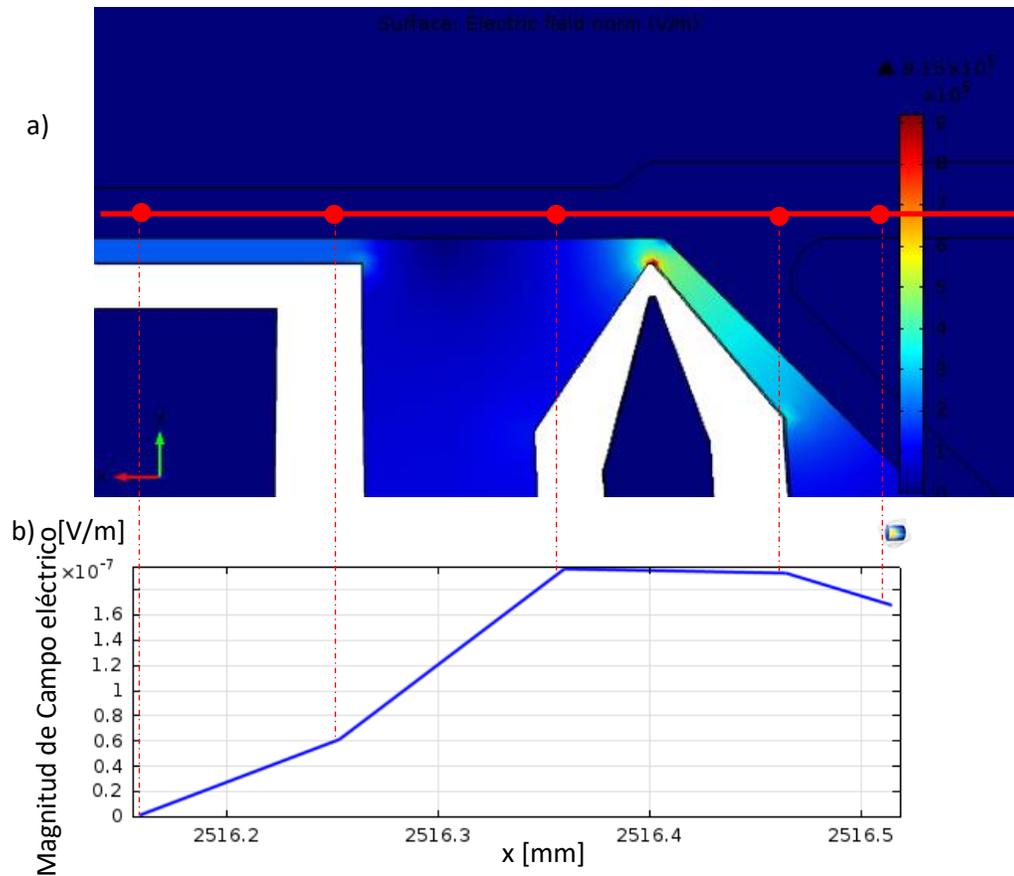


Figura 3.11 Magnitud del vector de campo eléctrico dentro del chip.

a) Magnitud del vector de campo eléctrico sobre el plano xy con barra de colores, la línea roja indica la trayectoria de una partícula y b) gráfica de la magnitud del vector del campo eléctrico de acuerdo a las posiciones marcadas en a).

Para obtener la magnitud del vector del campo eléctrico mostrada en la figura 3.11 se tomó como referencia la parte central del canal microfluídico en donde las micro-gotas fluyen (línea roja). Se observa que esta norma es mayor justo en la zona de bifurcación del canal principal, que es la zona en donde se requiere para separar las gotas cuando los electrodos son encendidos.

Por otra parte, las velocidades calculadas dentro del sistema se muestran en los cortes transversales al canal en la figura 3.12, en donde las velocidades máximas ubicadas en la parte central de los canales de recolección y de desperdicio son $8.3629 \times 10^{-5} [\frac{m}{s}]$ y $1.4154 \times 10^{-4} [\frac{m}{s}]$ respectivamente, por lo que la trayectoria de preferencia de la partícula que fluya por el chip será seguir el camino de desperdicio.

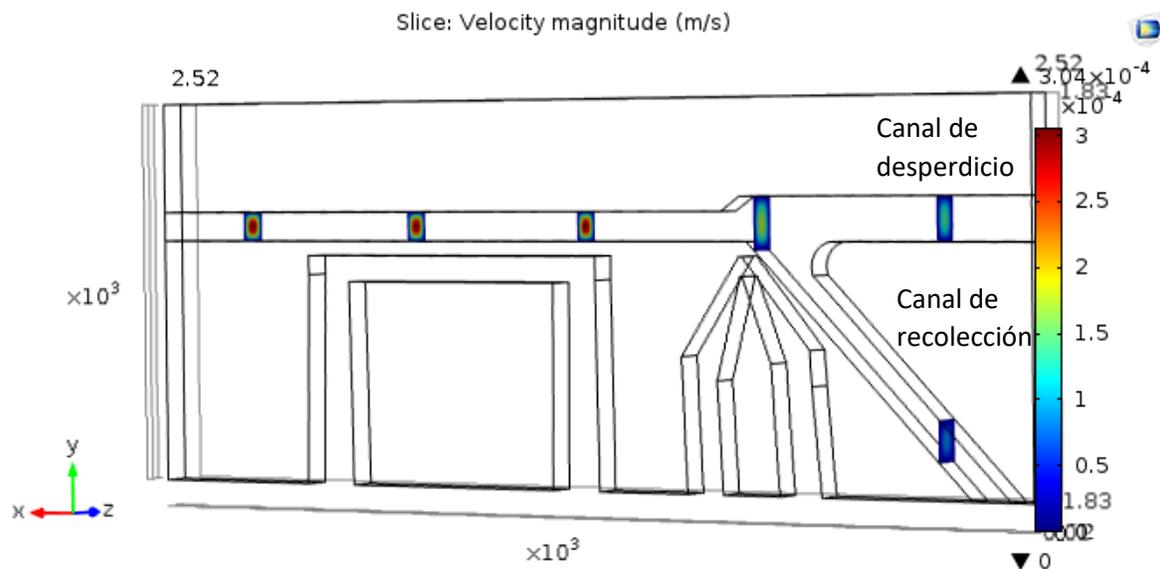


Figura 3.12. Magnitud de la velocidad dentro del chip.

Se muestran los cortes transversales de los canales de desperdicio y recolección en donde las velocidades máximas son $141.54 [\frac{\mu m}{s}]$ y $83.629 [\frac{\mu m}{s}]$ respectivamente.

Haciendo uso de los resultados en estado estacionario de la simulación, obtenemos la trayectoria de una partícula que fluye dentro del chip cuando los electrodos están prendidos (100[V]) y apagados (0[V]). En la figura 3.13 a, b y c se muestra la trayectoria de la partícula cuando los electrodos están apagados, para los tiempos 0.1, 1.9 y 4 segundos respectivamente. En la figura 3.13d se observa la trayectoria de la partícula cuando los

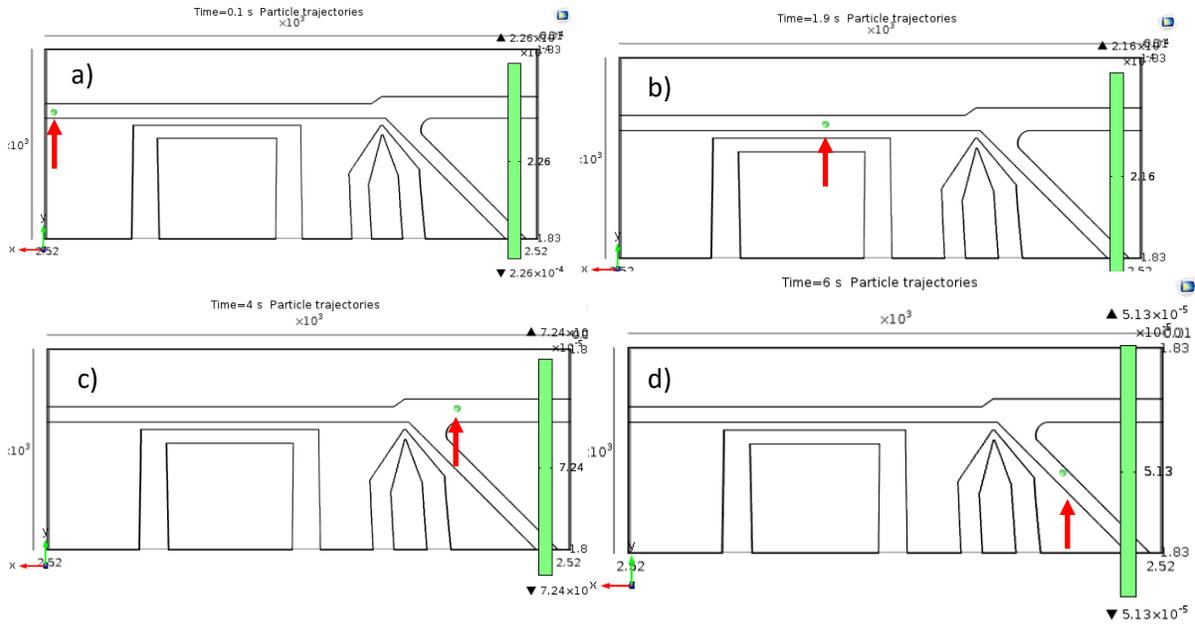


Figura 3.13 Trayectoria de una partícula

Electrodos apagados en a) $T=0.1$ s, b) $T=1.9$ s y c) $T=4$ s y electrodos prendidos en d) $T=6$ s

electrodos están polarizados para el tiempo de 6 segundos. La partícula sigue dos trayectorias diferentes debido a la presencia y ausencia de la fuerza DEP.

Es necesario resaltar que las magnitudes de voltaje, velocidad y campo eléctrico son propias a la porción del chip en estudio y las consideraciones específicas correspondientes a éste.

3.2 Fabricación del microchip

3.2.1 Proceso de Fotolitografía

Dentro de las técnicas estándares para la fabricación de dispositivos MEMS es recurrente transferir patrones por medio de fotolitografía a un sustrato. Esta técnica es ilustrada en la figura 3.14 para un sustrato de silicio.

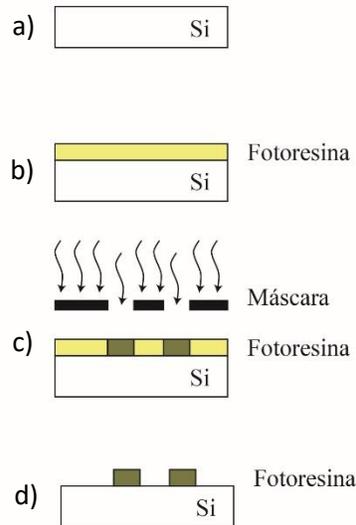


Figura 3.14 Proceso estándar de fotolitografía

a) Preparación de sustrato, b) Depósito de fotoresina sobre sustrato, c) Exposición de fotoresina con rayos UV y d) Revelado y liberación de estructuras.

Para la fabricación del patrón utilizado para elaboración de los chips, se utilizó la técnica de fotolitografía. El proceso se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de Micro Sistemas Bio-MEMS y Lab on a Chip de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) con el equipo *Intelligent Micro Patterning's SF-100 Maskless Photolithography System*. Este sistema utiliza una tecnología patentada llamada *Smart Filter*, basada en el uso de un dispositivo de micro-espejos digitales (DMD por sus siglas en inglés), el cual contiene un arreglo de micro-espejos de 1024x768, los cuales se pueden controlar individualmente para generar una máscara digital sin la necesidad de fabricar máscaras físicas. Cuando la máscara de la imagen, que es previamente dibujada en algún CAD, es enviada de la PC al sistema *Smart Filter*, este proyecta el patrón sobre el sustrato usando los DMD.

Como se mencionó en las secciones 3.1.2 y 3.1.3, se quiere altura de 30[μm] en ambos chips. La resina fotosensible disponible y utilizada para la fabricación de los chips

fue la serie SU8 2015 de *MicroChem*, la cual es una resina negativa. Esto último quiere decir que las zonas de la resina que sean irradiadas con una longitud de onda mayor de 350 [nm] fortalecerán los enlaces moleculares de la resina. El proceso de fabricación detallado se describe en el *Anexo 4*. En la figura 3.15 a) se muestra el patrón de resina SU82015 transferido a la oblea de silicio utilizada como sustrato, y en b) y c) se muestran las fotos obtenidas con el equipo SF-100 en zonas específicas de la oblea de silicio.

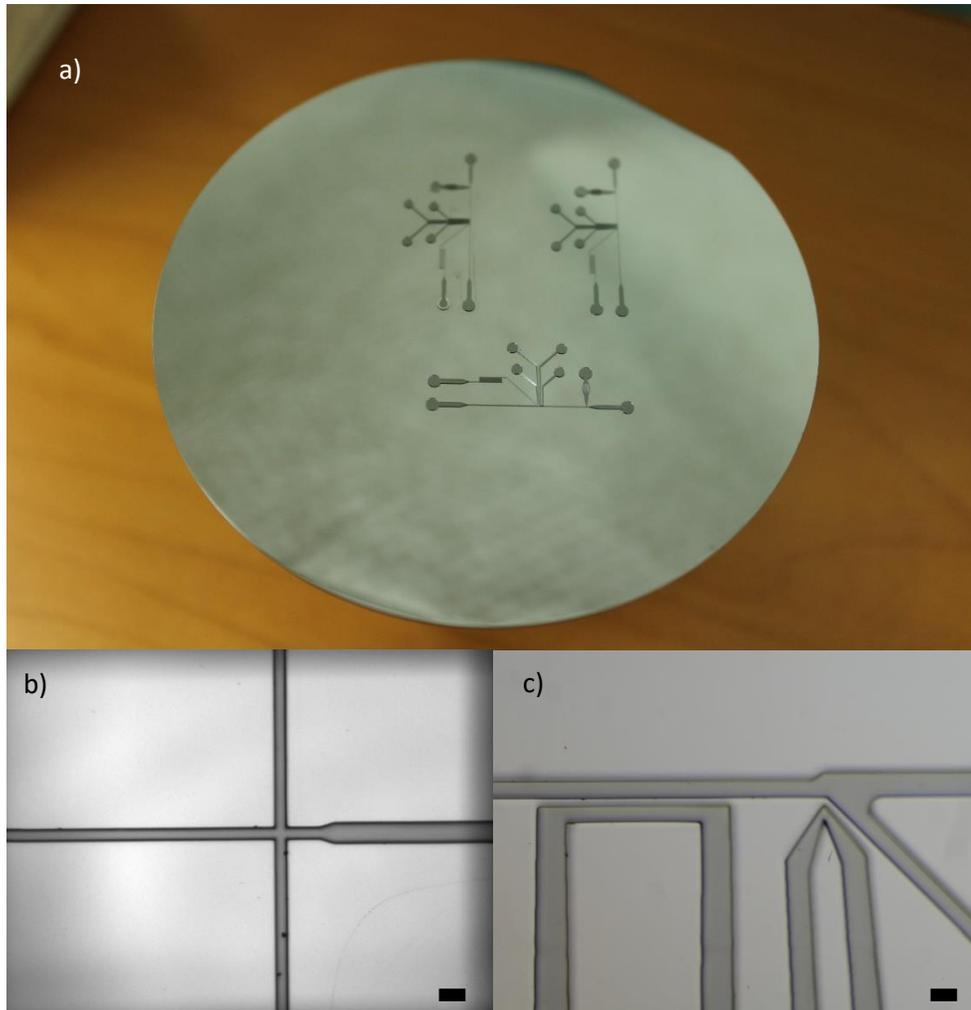


Figura 3.15 Resultado de la fabricación por la técnica de fotolitografía

a) Estructuras en una oblea de silicio resultado de la fotolitografía, b) fotografía tomada con el equipo SF-100 mostrando la zona de generación de micro-gotas y c) fotografía del equipo SF-100 mostrando la zona de separación del chip en donde se muestran también los electrodos. La barra de escala mide 30[μm].

3.2.2 Proceso de litografía suave

Posteriormente se utilizó la técnica de litografía suave para obtener réplicas del chip microfluídico. Se decidió emplear el polímero PDMS, debido a que es un material inerte, fácil de moldear, aislante térmicamente y eléctricamente, permeable a gases y además su transparencia óptica favorecerá el monitoreo de la fluorescencia emitida por las microgotas. Este proceso se detalla detenidamente en el *Anexo 7*.

Para obtener las medidas de profundidad de los canales del dispositivo, se acudió al Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para el diagnóstico y terapia (LaNSBioDyT), ubicado en la **Facultad de Ciencias de la UNAM**, y se utilizó el perfilómetro KLA Tencor D-600. Se realizaron 5 mediciones en diferentes lugares de la estructura para obtener un valor promedio de la profundidad de las diferentes trayectorias mostradas en la figura 3.16. Las medidas se tomaron con dos fuerzas diferentes: la medición 1 con una fuerza de 2 mg y la medición 2 con 5 mg. Las mediciones y el promedio de cada serie se encuentran en la tabla 3.3.

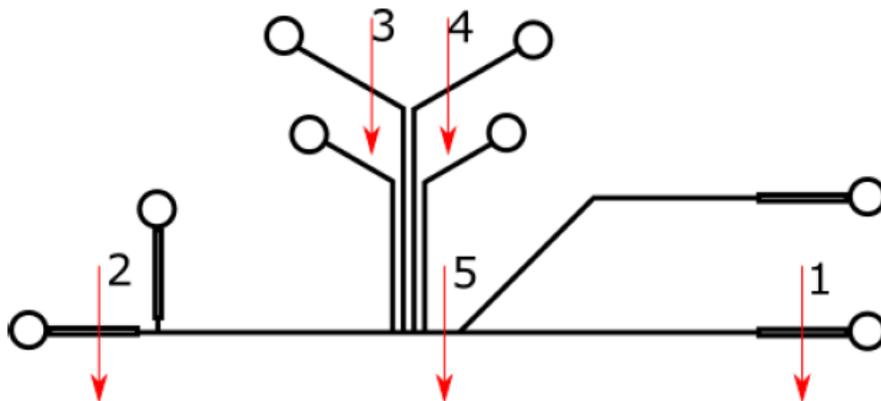


Figura 3.16 Trayectorias del perfilómetro

Tabla 3.3 Mediciones de perfiles con fuerzas 2 mg (Medición 1) y 5 mg (Medición 2)

Perfil	Medición 1 [μm]	Medición 2 [μm]
1	25.95	34.44
2	22.88	34.04
3	24.04	34.71
4	25.03	34.88
5	20.61	26.64
Promedio	23.70	32.94

Se tomaron las mediciones con dos tipos de fuerza diferentes ya que cuando entra en contacto la punta del perfilómetro con la muestra, el material PDMS, que es flexible, se deforma y la medición no es confiable, entonces al tener una medición en donde apenas se roza la superficie (2 mg) y otra en donde se hace pleno contacto (5 mg), se puede asumir que la medida real debe estar entre esos dos valores. En la figura 3.17 se muestra el perfil del canal usando ambas fuerzas. Así la profundidad de los canales en el chip es de 28.32 ± 4.62 [μm].

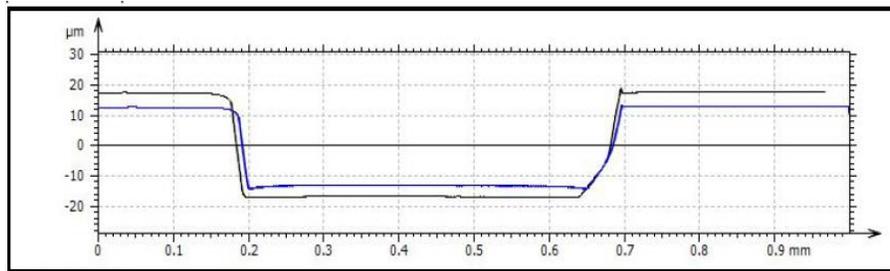


Figura 3.17 Comparación de los perfiles tomados en el mismo sitio con fuerzas 2 mg (azul) y 5 mg (negro)

El chip microfluídico obtenido del proceso de litografía suave se muestra en la figura 3.18.

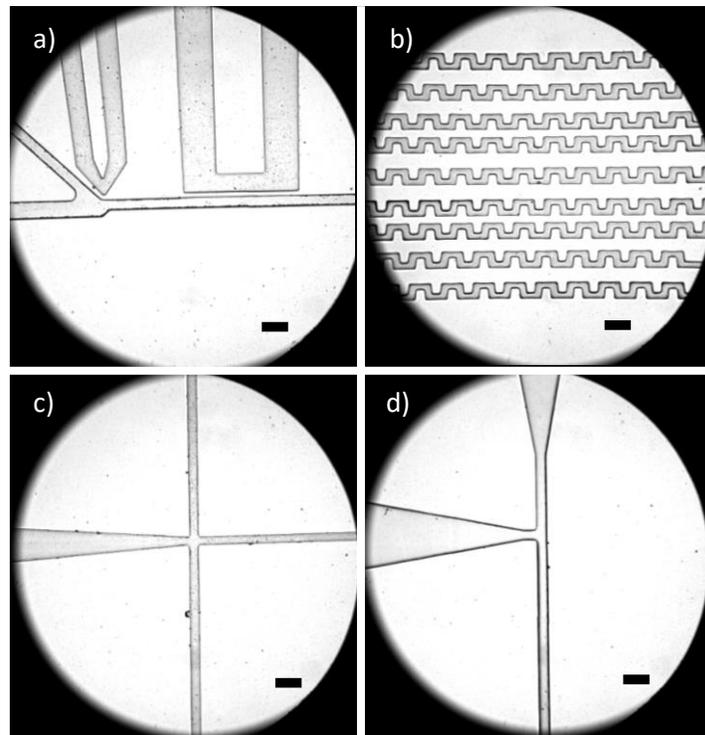


Figura 3.18 Dispositivo microfluídico usando litografía suave.
a) Región de separación, b) Filtros, c) geometría de enfoque de flujo para generar gotas y d) geometría de flujo cruzado para reinyectar micro-gotas.

3.2.3 Fabricación de micro-electrodos

Aprovechando la técnica de fotolitografía y la realización de réplicas usando litografía suave, se construyen micro-canales específicos para ser rellenados con soldadura y así obtener trazas conductoras que servirán como electrodos. La fabricación de los micro-electrodos se detalla en el Anexo 9.

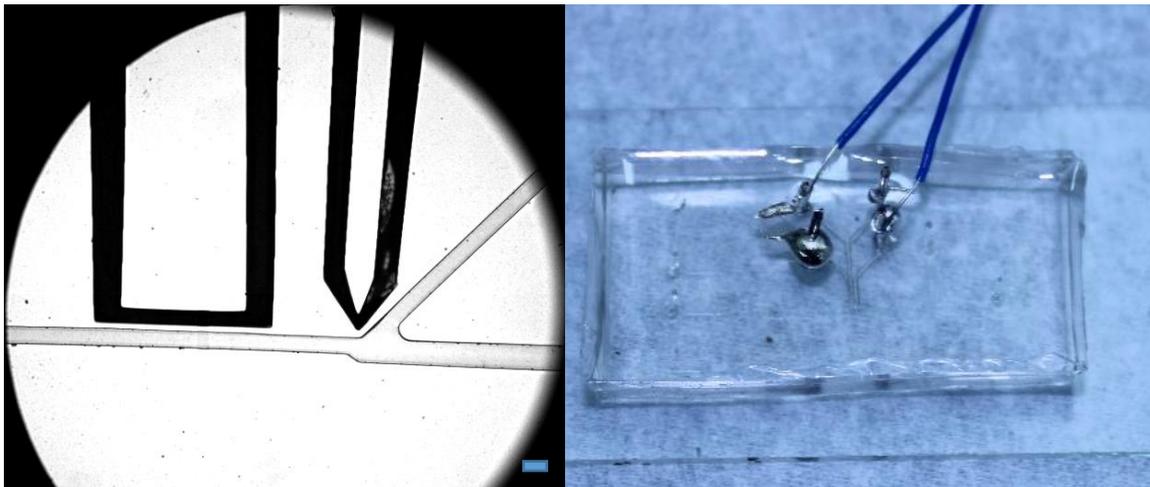


Figura 3.19 Chip microfluídico final. Barra de escala de 45 [μm]

Capítulo 4 Diseño electrónico

La integración de los circuitos electrónicos y los dispositivos Bio-MEMS incrementa la versatilidad de los sistemas y expande las posibilidades de encontrar nuevas aplicaciones e incluso mejorar procesos ya existentes. En el capítulo 3 se detalló el diseño del chip microfluídico para la separación de micro-gotas fluorescentes, el cual utilizará un sistema LIF para inducir fluorescencia en ellas y un par de electrodos para separarlas. Como parte del sistema LIF, la fluorescencia emitida por las gotas es dirigida por un camino óptico descrito en la tesis de maestría de Benjamín Vázquez [58] hasta un fotodiodo de avalancha (APD-100, HINDS Instruments). Utilizaremos esta señal de fluorescencia para decidir si se activan o se desactivan los micro-electrodos dentro del microchip y así separar o no separar las gotas interrogadas. Esta decisión se tomará comparando los valores de la señal de fluorescencia con un valor umbral, el cual es un valor que se coloca por arriba de las intensidades del ruido del fondo y de valores de gotas fluorescentes con intensidades menores a las de interés, de tal forma que solo las micro-gotas con una intensidad de fluorescencia mayor a este se podrán separar. En la sección 4.2 se detalla más acerca de este tema.

Como se ha mencionado antes, la polarización de los electrodos generará la fuerza de dielectroforesis que separará a las micro-gotas, lo cual se logra mediante la aplicación de un alto voltaje a los electrodos. El tiempo en el que los electrodos permanecerán polarizados dependerá de la velocidad de la gota.

Con lo anterior, se identificarán dos partes principales dentro del circuito para este sistema: el circuito para el acondicionamiento de la señal de fluorescencia y el circuito para el control de prendido de los electrodos. Además, el sistema electrónico deberá ser capaz de utilizarse para separar gotas a tasas de hasta 10 mil gotas por segundo. En la figura 4.1 se muestran las principales consideraciones de diseño principales para la construcción del circuito.

Circuito de Acondicionamiento	Circuito de Control
<p>Amplificar señales de fluorescencia de diferentes valores de voltajes de entre 10 [mV] y 500 [mV] provenientes del fotodiodo de avalancha.</p> <p>Conectar la salida de esta etapa conectarla a el circuito de control.</p>	<p>Modificación del umbral de detección de micro-gotas y del tiempo de encendido de los micro-electrodos al inicio de cada experimento.</p> <p>Polarizar los electrodos con un alto voltaje proveniente de un amplificador de alto voltaje.</p> <p>Separar como máximo 10 000 gotas por segundo.</p>

Figura 4.1. Consideraciones de diseño electrónico

A continuación se describirá el diseño del circuito electrónico involucrado en el funcionamiento del sistema, así como el desarrollo de las consideraciones de diseño electrónico de la figura 4.1.

4.1 Acondicionamiento de la señal de fluorescencia

La mayoría de los sensores y actuadores necesitan de acondicionamiento de señales a la entrada o salida de los mismos. Dentro del acondicionamiento de estas señales se encuentran procesos de amplificación, atenuación, filtrado, aislamiento, compensación, etc.

Como parte del arreglo del sistema LIF, para captar la fluorescencia emitida por las micro-gotas, se utiliza un fotodiodo de avalancha que pre-amplifica y transduce la corriente provocada por la incidencia de fotones y la multiplicación de los portadores de carga en el semiconductor, a una señal de voltaje. Esta señal de voltaje suele ser pequeña (del orden de las decenas o centenas de milivolts) debido a las bajas intensidades de fluorescencia emitidas por las micro-gotas.

Para el acondicionamiento de esta señal, se incluyen una etapa de filtrado, amplificación, compensación por offset y acoplamiento de impedancias como se muestra en la figura 4.1.

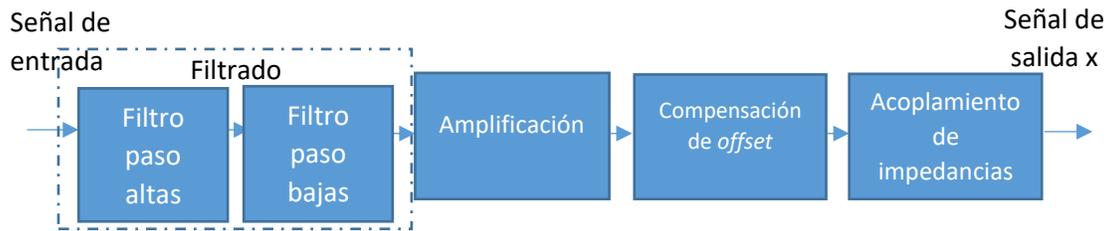


Figura 4.2 Etapas del circuito de acondicionamiento

4.1.1 Filtrado de la señal

La señal de interés será la señal obtenida a la salida del fotodetector de avalancha, el cual es parte del sistema LIF. Este amplifica la señal 8.5 veces y tiene un ancho de banda de 450 [kHz] que abarca desde 0 [kHz] a 450 [kHz]. Como se mencionó, el circuito deberá ser capaz de utilizarse para separar hasta 10 mil gotas por segundo, sin embargo, también deberá ser capaz de separar alrededor de las centenas de gotas ya que a veces se presentan dificultades con la mecánica de fluidos del chip microfluídico y no se logra alcanzar a separar 10 mil gotas por segundo.

Entonces el paso de las gotas sobre el punto focal del láser no siempre será a una velocidad y frecuencia constantes, por lo que se espera separar entre 1 hasta 10 mil gotas en un segundo. Así, la frecuencia de la señal de fluorescencia podría variar entre 1 [Hz] hasta los 10 [kHz].

En el laboratorio en donde se llevaron a cabo los experimentos con las micro-gotas en ocasiones presentaba un ruido en la toma eléctrica que variaba entre los 500 [kHz] y 1 [MHz]. Además, se trabaja en un cuarto oscuro para ocupar el sistema LIF y así aminorar la influencia de fuentes de luz externas en las mediciones de fluorescencia. A pesar de esto, para poder manipular el arreglo experimental, se utiliza un foco rojo que en ocasiones es detectado por el fotodiodo de avalancha, aumentando la componente de DC de la señal de fluorescencia en alrededor de 25 [mV].

Para que la señal a la salida de los filtros no sea atenuada, la amplificación de estos filtros tendrá que ser de 1x. Ya que se desea obtener la mayor información de la señal del fluorescencia para detectar las bacterias que miden entre 1 y 3 [μm] usaremos filtros de segundo orden que tienen una pendiente de 40 [dB] por década.

Por lo anterior, se hizo la implementación de un filtro Butterworth paso altas de segundo orden a una frecuencia de corte de 0.5 [Hz] para quitar la componente de DC y un

filtro Butterworth paso bajas de segundo orden a una frecuencia de corte de 60 [KHz] para conservar las componentes de mayor frecuencia de la señal de interés y quitar el ruido electromagnético de las frecuencias altas que no son de incumbencia en este sistema. El cálculo detallado de estos filtros, se describe en el *Anexo 10*.

El filtro paso altas tiene una pendiente de 40dB por década y su función de transferencia se representa de forma general en la ecuación 4.1.

$$T(s) = \frac{V_2}{V_1} = \frac{Ks}{s^2 + \left(\frac{w_0}{Q}\right)s + w_0^2} \dots (4.1)$$

Ya que los valores de K, Q y w_0 son conocidos, la función de transferencia para el filtro paso altas será:

$$T(s) = \frac{V_2}{V_1} = \frac{s^2}{s^2 + 14.21338s + 101.01} \dots (4.2)$$

La respuesta en frecuencia de la ecuación 4.2 se da en la figura 4.3.

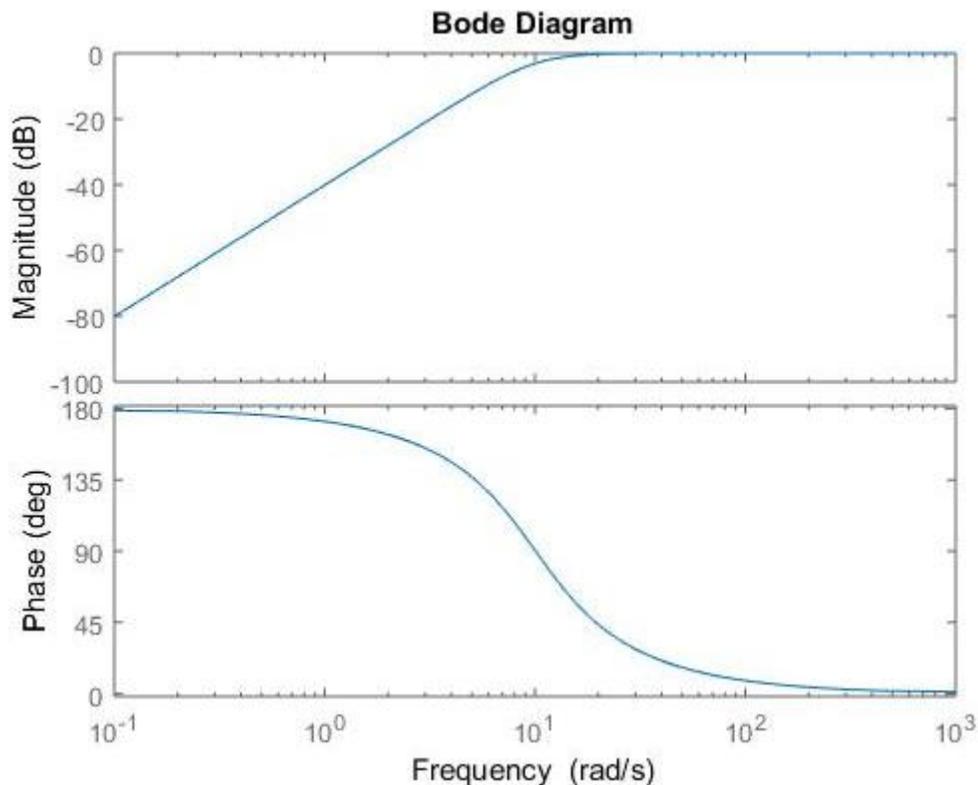


Figura 4.3 Diagrama de Bode de la función de transferencia teórica del filtro paso altas.

Para el filtro paso bajas, la función de transferencia está dada de forma general por la ecuación 4.3

$$T(s) = \frac{V_2}{V_1} = \frac{Kw_0^2}{s^2 + (w_0/Q)s + w_0^2} \dots (4.3)$$

Conocemos los valores de K, Q y w_0 , por lo que sustituyendo en la ecuación 4.3, la función de transferencia para el filtro paso bajas será:

$$T(s) = \frac{V_2}{V_1} = \frac{1.421223034 \times 10^{11}}{s^2 + 533145.9384s + 1.421223034 \times 10^{11}} \dots (4.4)$$

La respuesta en frecuencia del filtro paso bajas se muestra en la figura 4.4.

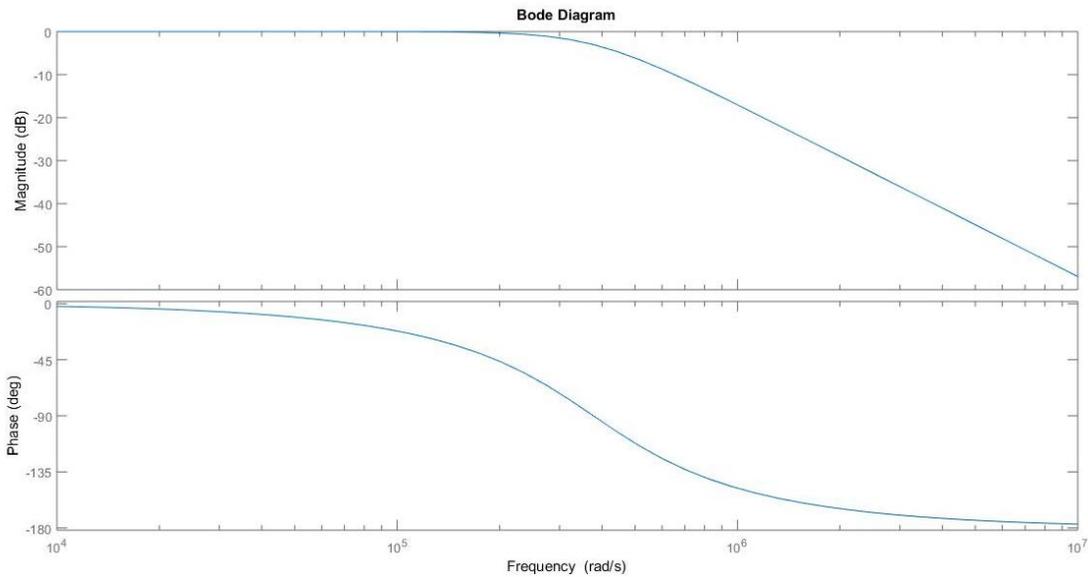


Figura 4.4 Diagrama de Bode de la función de transferencia teórica del filtro paso bajas

Para alimentar el circuito, haremos uso de reguladores de voltaje a ± 5 [V]. El amplificador TL08x puede alimentarse con un voltaje de entrada de ± 5 [V] hasta ± 15 [V] y tiene un ancho de banda de ganancia unitaria (Unity-gain Bandwidth) de 3 [MHz]. Además, si consideramos que la señal de salida del filtro podría tener como máximo un valor de 3.3 [Vpp], el cual será un voltaje máximo de diseño para la entrada para el circuito de control, podemos calcular el tiempo de subida que necesitará el amplificador (*slew rate*) de la siguiente forma:

$$S_r = 2\pi f_{max} V_p$$

Dónde f_{max} es la frecuencia máxima de trabajo y V_p es el voltaje máximo de salida del amplificador. Entonces, el S_r será:

$$S_r = 2\pi(10[\text{kHz}])(3.3[\text{V}]) = 0.2073 \left[\frac{\text{V}}{\mu\text{s}} \right]$$

El amplificador TL08x tiene un S_r de $13 \left[\frac{\text{V}}{\mu\text{s}} \right]$, el cual es mayor del calculado, por lo que este amplificador será utilizado para implementar estos filtros de segundo orden de ganancia unitaria.

La figura 4.5 es una imagen demostrativa de las señales de entrada a la etapa de filtrado (color azul) y de salida (naranja) para un experimento en el cual se observan pasar 44 gotas con una concentración de fluoresceína de $10 \mu\text{M}$.

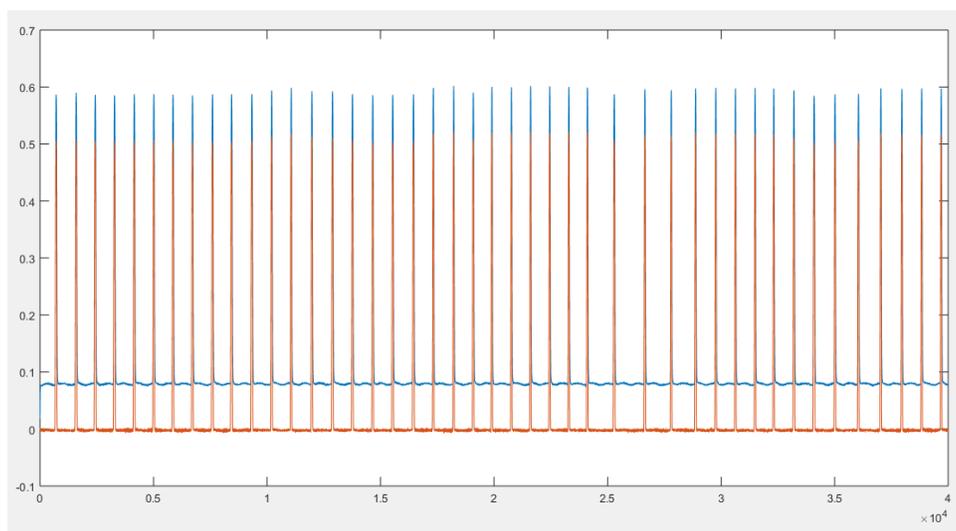


Figura 4.5 señales de entrada a la etapa de filtrado (color azul) y de salida (naranja) para una concentración de fluoresceína de $10 \mu\text{M}$.

4.1.2 Etapa de amplificación

El equipo de trabajo del laboratorio de Biofisiología del Departamento de Fisiología de la Facultad de Química de la UNAM ha trabajado con concentraciones de Bromuro de Etidio de $40 \mu\text{M}$ para la detección de bacterias muertas, lo que produce magnitudes de fluorescencia de aproximadamente 70 mV a la salida del fotodetector de avalancha. Con esta referencia, para poder alcanzar una amplitud de 3.3 V y así ampliar el rango dinámico de voltaje de la señal de salida, se requiere de una amplificación de 47 veces. Sin embargo, como se había mencionado antes, la amplitud de la señal adquirida no siempre es la misma debido a factores humanos y técnicos, por lo que se requiere ajustar la amplificación del sistema cada vez que se realice un experimento.

Para amplificar la señal usaremos un amplificador operacional en su configuración inversora (ver *Anexo12*) para tener un control sobre la ganancia directamente proporcional a la resistencia de retroalimentación R_R :

$$\frac{V_2}{V_1} = -\frac{R_R}{R_E}$$

así, modificando el valor de la resistencia colocada en la retroalimentación del amplificador (R_r), podremos amplificar la señal de fluorescencia.

Como se mencionó en la sección anterior, el S_r del TL08x es suficiente para tratar la señal en cuestión. Este tiene un ancho de banda de ganancia unitaria (*Unity-gain Bandwidth*) de 3 [MHz] por lo que para una señal con una frecuencia máxima de 10 [kHz] la ganancia máxima que podremos utilizar será:

$$\text{Ganancia de lazo cerrado} = \frac{\text{Ancho de banda de ganancia unitaria}}{\text{Frecuencia máxima de la señal}} = \frac{3[\text{MHz}]}{10[\text{kHz}]} = 300$$

Entonces la ganancia máxima que podremos utilizar en esta etapa será de 300, por lo que, en esta etapa usaremos un amplificador operacional TL084 en su configuración inversora para amplificar la señal proveniente de la etapa de filtrado. La amplificación de esta etapa determinará la amplificación total del circuito de acondicionamiento ya que la etapa de filtrado tiene una ganancia unitaria.

4.1.3 Compensación por *offset*

Para colocar la referencia de la señal en un nivel diferente que tierra, es necesario implementar una etapa en donde se sume una señal de DC a la señal de salida de la etapa de amplificación y así, preparar la señal en un nivel adecuado dentro de 0[V] y 3.3[V] para su posterior digitalización. Para lo anterior usaremos un amplificador operacional en una configuración sumador inversor, y en conjunto con la etapa de amplificación inversor de la sección anterior, obtendremos una señal sin invertir a la salida de la etapa de acondicionamiento.

4.1.4 Acoplamiento de impedancias

Como parte final del acondicionamiento de la señal, colocaremos una etapa de acoplamiento de impedancias para evitar la caída de tensión en la señal cuando esta sea conectada al conversor ADC. Usando un amplificador operacional en su configuración seguidor de voltaje podemos acoplar estas impedancias.

4.2.5 Resultado de la etapa de acondicionamiento

Para evaluar el funcionamiento de la etapa de acondicionamiento de la señal, descrita anteriormente en la figura 4.1, se utiliza una señal de prueba con una amplitud de 20 [mV_{p-p}], a una frecuencia de 1[KHz]. La prueba se realizó para 3 diferentes valores de resistencia R_f y se obtuvo el factor de amplificación y el logaritmo base diez del factor de ruido F que es el factor señal a ruido de la salida del circuito entre la relación señal a ruido a la entrada del mismo (*Anexo 13*).

Tabla 4.1 Amplificación de salida del amplificador

Resistencia R_f [K Ω]	Voltaje p-p [V]	Amplificación Salida x	10log(F)
4.7	0.124	6.2	5.993322467
10	0.2551	12.755	5.697449865
330	8.1053	405.265	4.138491852

4.2 Circuito de control

Para activar y desactivar los micro-electrodos para separar las gotas fluorescentes, es necesario colocar un circuito que nos ayude a diferenciar los niveles de intensidad de la señal de fluorescencia. Como se mencionó, cada vez que haya fluorescencia en las micro-gotas, es decir, cuando las bacterias dentro de la gota estén muertas, necesitaremos activar los micro-electrodos y así separar la gota por el camino de recolección del chip. Para tomar esta decisión, se comparará el valor de la señal de fluorescencia con un valor umbral. Este valor umbral se coloca por arriba de las intensidades del ruido del fondo y de valores de gotas fluorescentes con intensidades menores a las de interés, de tal forma que solo las micro-gotas con una intensidad de fluorescencia mayor a éste se podrán separar. Además, este valor umbral se podrá modificar en cada experimento, ya que las gotas de interés no siempre tendrán la misma intensidad de fluorescencia porque existen variaciones de un experimento a otro, como pueden ser pequeños cambios en el enfoque del láser del sistema LIF, el movimiento de los componentes ópticos, etc. La señal de fluorescencia a la entrada del circuito de control, será la señal de salida de la etapa de acondicionamiento. Ésta señal se digitalizará para poder modificar el valor de umbral por software, lo que facilita el montaje del experimento, y así se obtendrá una señal de disparo que servirá para multiplexar la señal en los micro-electrodos, esto es, multiplexar entre tierra y la señal de polarización.

Lo anterior supone un sistema de control de lazo abierto como se muestra en la figura 4.7.

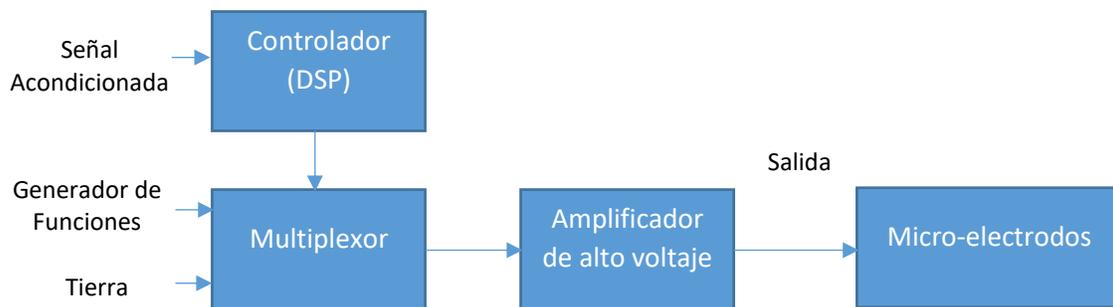


Figura 4.6 Diagrama de control lazo abierto

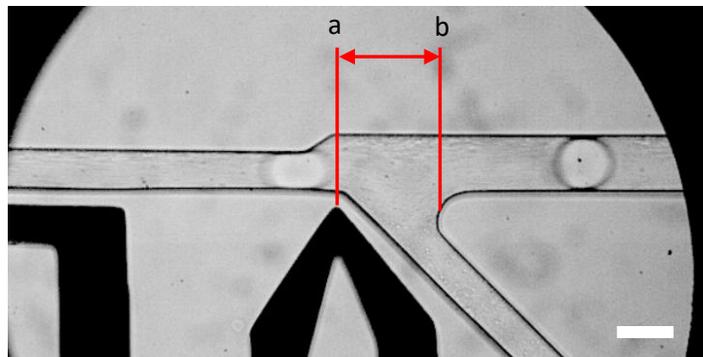
Como se ha mencionado, la frecuencia máxima que nos interesa implementar a futuro de la señal de fluorescencia a la salida del circuito de acondicionamiento será de 10 [kHz] con un valor máximo posible de 3.3 [V].

4.2.1 Digitalización de la señal

A pesar de que el registro de las señales de fluorescencia de las distintas pruebas se llevan a cabo con el mismo arreglo experimental, los niveles de intensidad y la frecuencia de esta señal no siempre son los mismos, ya que existen múltiples factores que alteran dichas variables. Por ejemplo, cuando se mueve o se cambia el chip o los objetivos del microscopio con los que se trabaja, la intensidad de fluorescencia es modificada. También cuando es modificada la razón del flujo a la que se introducen los fluidos al microchip o cuando las salidas del chip son saturadas por los fluidos a medida que son usados, la velocidad de las gotas cambia ocasionando un cambio en la frecuencia de la señal de fluorescencia. Estos dos parámetros son de suma importancia pues son parámetros necesarios para definir el control del sistema.

La magnitud de la señal nos indicará la intensidad de fluorescencia presente en la gota, con lo cual discriminaremos si es de interés separar la micro-gota o no. En nuestro caso, la señal de encendido de los electrodos dependerá de si la señal de fluorescencia es mayor que determinado umbral, por lo que se efectuará una continua comparación del valor actual con el valor del umbral fijado.

La frecuencia de la señal está relacionada con la velocidad de las gotas, entre mayor sea su velocidad, mayor será la frecuencia. Esta velocidad determinará el tiempo de encendido de los electrodos. Si se mantienen encendidos los electrodos por mucho tiempo, se separarán múltiples gotas con un solo disparo, lo cual es indeseable. El correcto funcionamiento es separar una gota cada vez que los electrodos se polaricen. Para lograrlo, con ayuda de una cámara rápida, medimos el tiempo que tarda en pasar una gota del punto *a* al punto *b* mostrados en la figura 4.8, cada vez que se realice un experimento.



*Figura 4.7 Tiempo de encendido de electrodos.
El tiempo de encendido de los electrodos será el tiempo que tarde la gota en pasar del punto *a* al punto *b*. Barra de escala de 45[μ m]*

Tanto el umbral de decisión como el tiempo de encendido de los electrodos serán valores que tendrán que ser especificados antes de que el circuito de control comience su funcionamiento, ya que al ser un control de lazo abierto, una vez comenzado el sistema, este no cuenta con una retroalimentación para modificar dichos parámetros. Además, en la búsqueda de una futura implementación de esta plataforma dentro de un *lab on a chip*, con módulos de análisis como la espectroscopía de impedancia electroquímica, la cual requiere de operaciones de multiplicación y convolución de señales, junto con la posibilidad de implementar un control de lazo cerrado, entonces, es requisito emplear un sistema de procesamiento.

La señal de fluorescencia a la salida del foto detector la podemos simplificar como un nivel alto cuando una micro-gota fluorescente pasa sobre el láser, y por lo tanto emite fluorescencia, y un nivel bajo que significa que no hay ninguna gota fluorescente que pase por encima del láser. El haz del láser es enfocado dentro del micro-canal, en donde tiene un diámetro aproximado de entre 5 y 10 [μm]. Por esto, para que la señal de fluorescencia de dos micro-gotas no se encimen, la distancia mínima entre las micro-gotas dentro del canal cuando pasen por la región en donde el láser está enfocado, deberá de ser de 10 [μm] como se muestra en el la figura 4.8 a). Si requerimos separar 10 000 gotas en un segundo, significa que todas las gotas serán fluorescentes, y que todas deberán estar separadas la misma distancia. Por eso la velocidad de las gotas v_{gota} será de:

$$v_{gota} = \frac{(40[\mu\text{m}])(10000)}{1[\text{s}]} = 0.4\left[\frac{\text{m}}{\text{s}}\right]$$

Si el láser tiene un diámetro aproximado de 10 [μm], entonces podemos simplificar la señal de fluorescencia como se muestra en la figura 4.8 b). El periodo de la señal entonces será de 100 [μs]. Como el tiempo que permanece la señal en su estado más alto es de 25 [μs], se necesita muestrear un mínimo de:

$$muestreo = \frac{1}{25[\mu\text{s}]} = 40\,000\text{ mps}$$

Por lo anterior utilizamos un muestreo de 40 000 muestras por segundo, lo cual nos permitirá detectar si se presenta un nivel alto en la señal de fluorescencia que sea por arriba del umbral de detección.

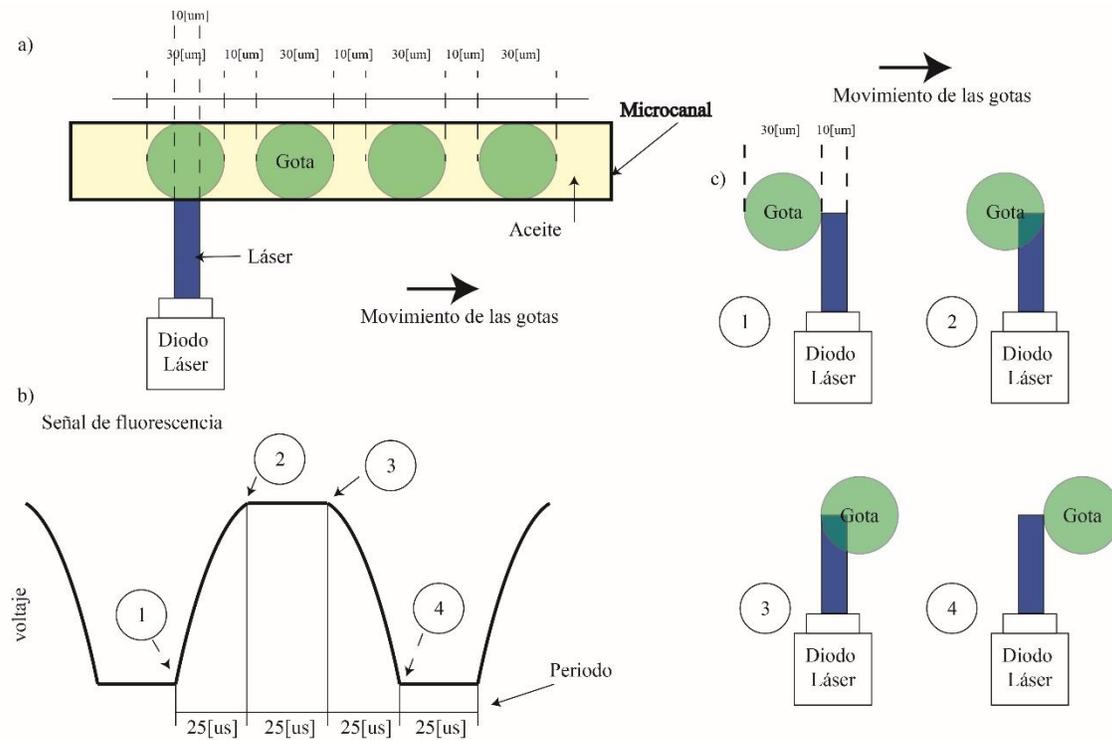


Figura 4.8 a) Ilustración de micro-gotas moviéndose a través del micro-canal con el láser enfocado. b) señal resultante de la ilustración a). c) Movimiento de las gotas en donde se muestran las cuatro partes de la señal en b).

En la tabla 4.2 comparamos 3 posibles opciones para ocupar como controlador, de las cuales la Raspberry Pi 3B y el C2000 Piccolo LaunchPad son las opciones que más satisfacen los requerimientos. Para trabajar en un control en tiempo real, se propuso utilizar el DSP C2000 Piccolo LaunchPad debido a la resolución del convertidor analógico con el que cuenta (resolución de 0.8 [mV]) y por su bajo precio, además de que se tiene interés de trabajar con un DSP dentro del laboratorio y poder integrar otras capacidades en un futuro.

Tabla 4.2 Tabla comparativa de las posibles opciones a usar.

Microcontrolador /Kit	Procesamiento de Señales (Convulación)	Bits Convertidor Analógico	Frecuencia de Reloj	Lenguaje de Programación Principal	Disponibilidad de Accesorios	Precio (USD)
Raspberry Pi 3B	Sí	-	125MHz	Phyton, C, C++	MUCHA	45.57
Pic 18F4550	No	10	48MHz	Ensamblador, C	REGULAR	10
C2000 Piccolo LaunchPad	Sí	12	60MHz	Ensamblador, C	REGULAR	17.05

El DSP fue programado dentro del IDE *Code Composer Studio v7*, cuyo programa se muestra en el *Anexo 13*. Dentro del algoritmo para elaborar el programa, se incluye un registro que servirá para contar el número de veces que los micro-electrodos son encendidos, y que junto con la ayuda de una cámara rápida, nos ayudará a verificar la eficacia del sistema.

4.2.2 Señal de polarización en los micro-electrodos

Para polarizar los electrodos usaremos el amplificador TREK PZD350A de alto voltaje que nos ayudará a amplificar la señal proveniente de un multiplexor. Este multiplexor estará controlado por la señal proveniente del DSP. Se hará el multiplexeo entre la señal proveniente de un generador de señales y tierra como se muestra en la figura 4.6. Mientras la señal de control sea un nivel bajo (0 [V]), ambos electrodos estarán conectados a tierra, por lo que no se producirá ningún campo eléctrico entre ellos. Cuando el DSP manda una salida alta (3.3 [V]), los electrodos son polarizados con la señal amplificada proveniente del generador de señales, y así la formación de un campo no uniforme en el chip provocará la presencia de la fuerza DEP sobre las micro-gotas para modificar su trayectoria y así separarlas. El tiempo que dure en alto la señal de salida del DSP, será el tiempo que duren los electrodos encendidos.

Como el DSP estará trabajando bajo un muestreo de 40 000 muestras por segundo, el intervalo entre cada muestra será de 25 [μ s], por lo que el multiplexor deberá ser capaz de multiplexar las señales en tiempos menores que este. El multiplexor HEF4051B tiene tiempos de retraso de propagación de la señal de activación de un estado alto a uno bajo de 30 [ns] y de retraso para la propagación del estado bajo al estado alto de 30 [ns], por lo que el tiempo total de retraso es de 60 [ns] para multiplexar la señal de polarización de los electrodos. Este tiempo es casi 417 veces menor que el tiempo entre los intervalos de muestreo, por lo que utilizaremos este multiplexor.

Para polarizar los electrodos, usaremos una señal senusoidal con una frecuencia de 80 [kHz] con una amplitud de 800 [Vpp], los cuales fueron parámetros de prueba obtenidos experimentalmente. El generador de señales será el que proveerá una señal sinusoidal con una frecuencia de 80[kHz] y una amplitud de 8 [Vpp] al amplificador de alto voltaje, el cual tendrá una amplificación de 100x. Además el amplificador necesita un tiempo de subida (S_r) mínimo de:

$$S_r = 2\pi(80[\text{kHz}])(800[\text{V}]) = 402.12 \left[\frac{\text{V}}{\mu\text{s}} \right]$$

Dado que este amplificador TREK PZD350A es un amplificador no inversor, maneja ganancias de hasta 150 y tiene un tiempo de subida (S_r) de $500 \left[\frac{\text{V}}{\mu\text{s}} \right]$, será utilizado para polarizar los micro-electrodos.

4.2.3 Resultado del circuito de control.

Para probar el circuito de control, utilizamos el generador de funciones simulando la señal de fluorescencia con una amplitud de $200 [mV_{p-p}]$ y una frecuencia de $1 [\text{KHz}]$ a la entrada del circuito de acondicionamiento, el cual amplificará 12. El ciclo de trabajo de la señal es del 25%, es decir, la señal de entrada permanece en estado alto por $200 [\mu\text{s}]$, ya que se simula que las gotas van separadas una de otra un tiempo de $800 [\mu\text{s}]$. En la figura 4.9 se muestra la señal de entrada al circuito de acondicionamiento (amarillo) y a la salida del mismo (azul).

El umbral para tomar la decisión de polarizar los electrodos, se fijó en un voltaje de $1.5 [\text{V}]$ y el tiempo de encendido de los electrodos se colocó en $225 [\mu\text{s}]$ para que fuera mayor que el tiempo en el que la señal de fluorescencia permanece por arriba de $1.5 [\text{V}]$. En la figura 4.10, se observa la señal de fluorescencia a la entrada del circuito de acondicionamiento (amarillo) y la señal de polarización que reciben los micro-electrodos (azul).

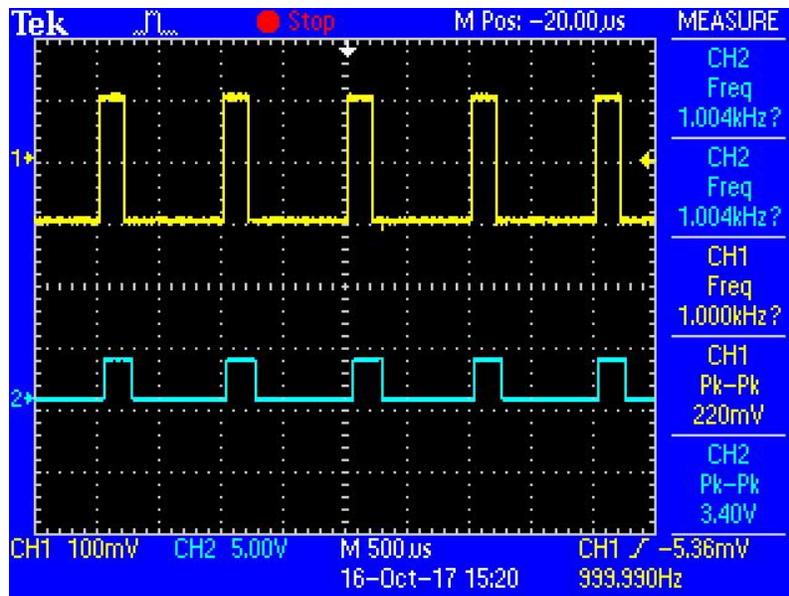


Figura 4.9 Señal de entrada (amarilla) y señal de disparo de los electrodos (azul)

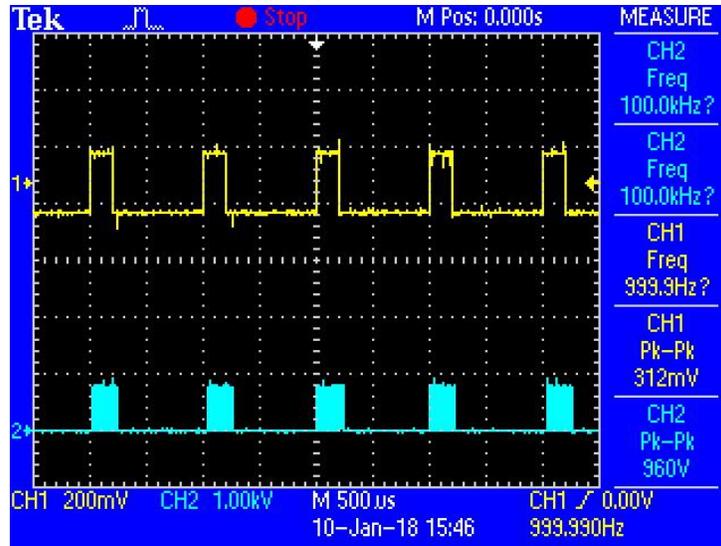


Figura 4.10 Señal de entrada (amarilla) y señal de polarización de los electrodos (azul)

4.3 Construcción del circuito

El circuito esquemático se elaboró en *Proteus 7* y se muestra en el *Anexo 16*. En la figura 4.11 se muestra el circuito final en placa fenólica en donde se señala la resistencia utilizada para cambiar la amplificación de la señal del fotodetector en la etapa de acondicionamiento.

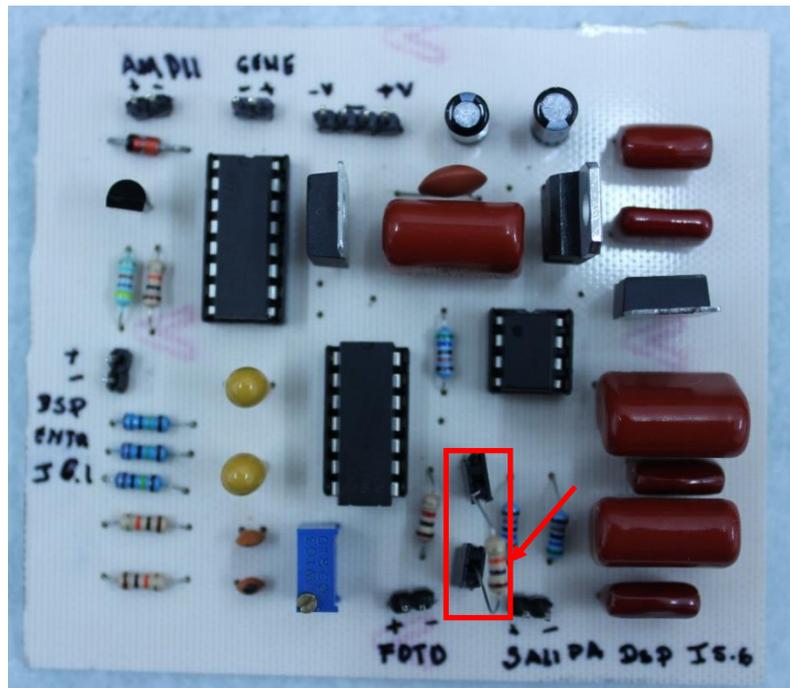


Figura 4.11 Circuito final en placa fenólica

Capítulo 5 Arreglo experimental y análisis de resultados

Como prueba de concepto inmediata, se utilizaron micro-gotas con fluoresceína. Estas pruebas servirán para caracterizar el sistema y así utilizarlo en pruebas futuras para separar gotas de Bromuro de Etidio y bacterias *E. coli*. La conveniencia de utilizar fluoresceína es que no es una sustancia tóxica y que las condiciones del laboratorio utilizado para la experimentación del sistema están adaptadas para el trabajo con este fluoróforo. Las muestras empleadas, así como el equipo óptico utilizado para las mediciones de fluorescencia fueron provistos por el Laboratorio de Biofísicoquímica del Departamento de Físicoquímica de la Facultad de Química de la UNAM.

5.1 Arreglo experimental

Para poder capturar la intensidad de fluorescencia despedida de las micro-gotas, empleamos el sistema óptico mostrado en la figura 5.1, que fue implementado en el trabajo de tesis de maestría de Benjamín Vázquez [58].

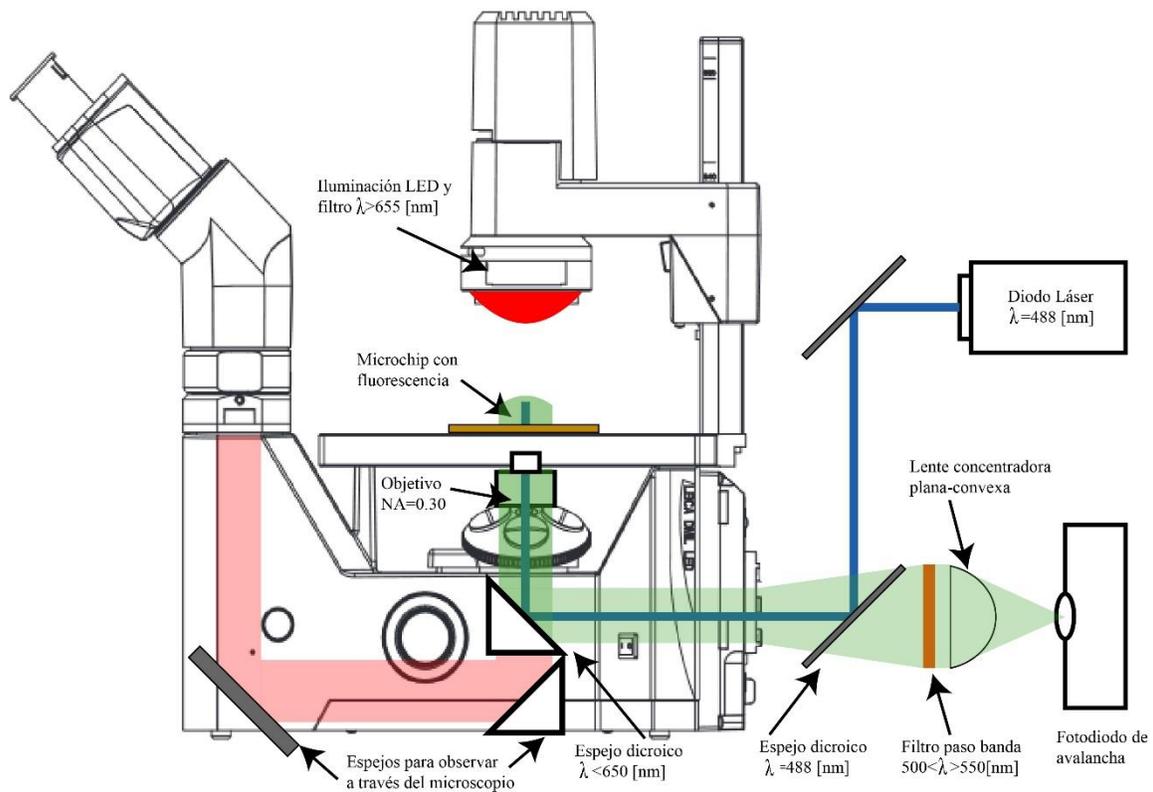


Figura 5.1 Diagrama general del sistema óptico utilizado [58]

Como se observa, existe un camino óptico trazado por los espejos y filtros ópticos, por el cual es direccionado un láser que tiene una longitud de onda $\lambda = 488 \text{ [nm]}$ (Coherent, Shapshire), además de recolectar y concentrar la fluorescencia en el fotodiodo de avalancha (Hinds Instruments, APD-100). El microchip es colocado en la platina del microscopio marca Leica y es conectado mediante tuberías (PTFE # 30 AWG) a bombas de jeringa marca Syringe Pump, usando jeringas de 1 [mL] marca DB plastipak. El experimento es monitorizado con una cámara rápida (Phantom, Micro M110) conectada a un equipo de cómputo por medio del software PCC 2.2.

Los micro-electrodos son conectados a la salida del amplificador de potencia (TREK, PZD350A), el cual recibe la señal determinada por el circuito de control. La ganancia del amplificador es de 100x de tal manera que la señal sinusoidal que polariza a los electrodos es una señal sinusoidal de 800 [Vpp] a una frecuencia de 80[KHz]. Esta señal es obtenida de un generador de funciones (Agilent, 33220A).

Para el registro de las señales, fue empleado un sistema de adquisición de datos NI USB-6351 (National Instruments) que cuenta con un ADC de 16 bits y una velocidad de muestreo de 1 [MS/s] cuando está configurada en multicanal. Las señales monitorizadas fueron la señal de salida del fotodetector, la señal a la salida del circuito de acondicionamiento y las señales de encendido y de polarización de los micro-electrodos y fueron guardadas empleando MATLAB (*Anexo 17*). Además, fue conectado un osciloscopio Tektronik TDS2012C para monitorizar y corroborar las múltiples señales medidas.

El esquema de conexión entre los dispositivos anteriormente descritos se muestra en la figura 5.2.

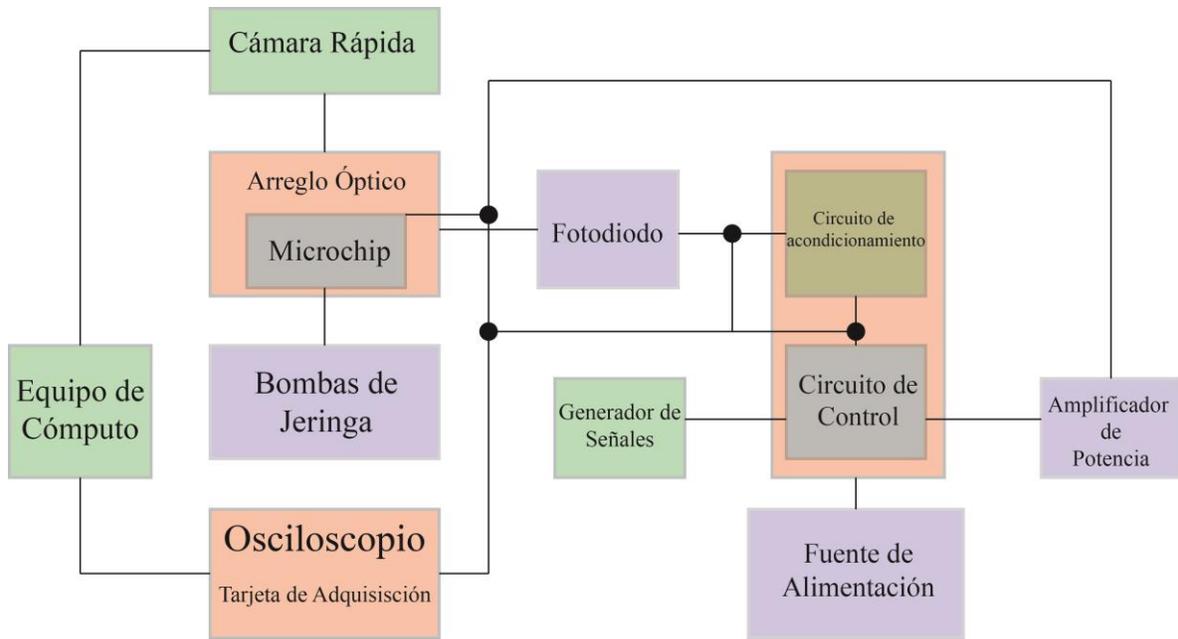


Figura 5.2. Diagrama de conexión del arreglo experimental.

En las figuras 5.3 a y b se muestra el arreglo experimental usado para realizar los experimentos descritos en la siguiente sección.

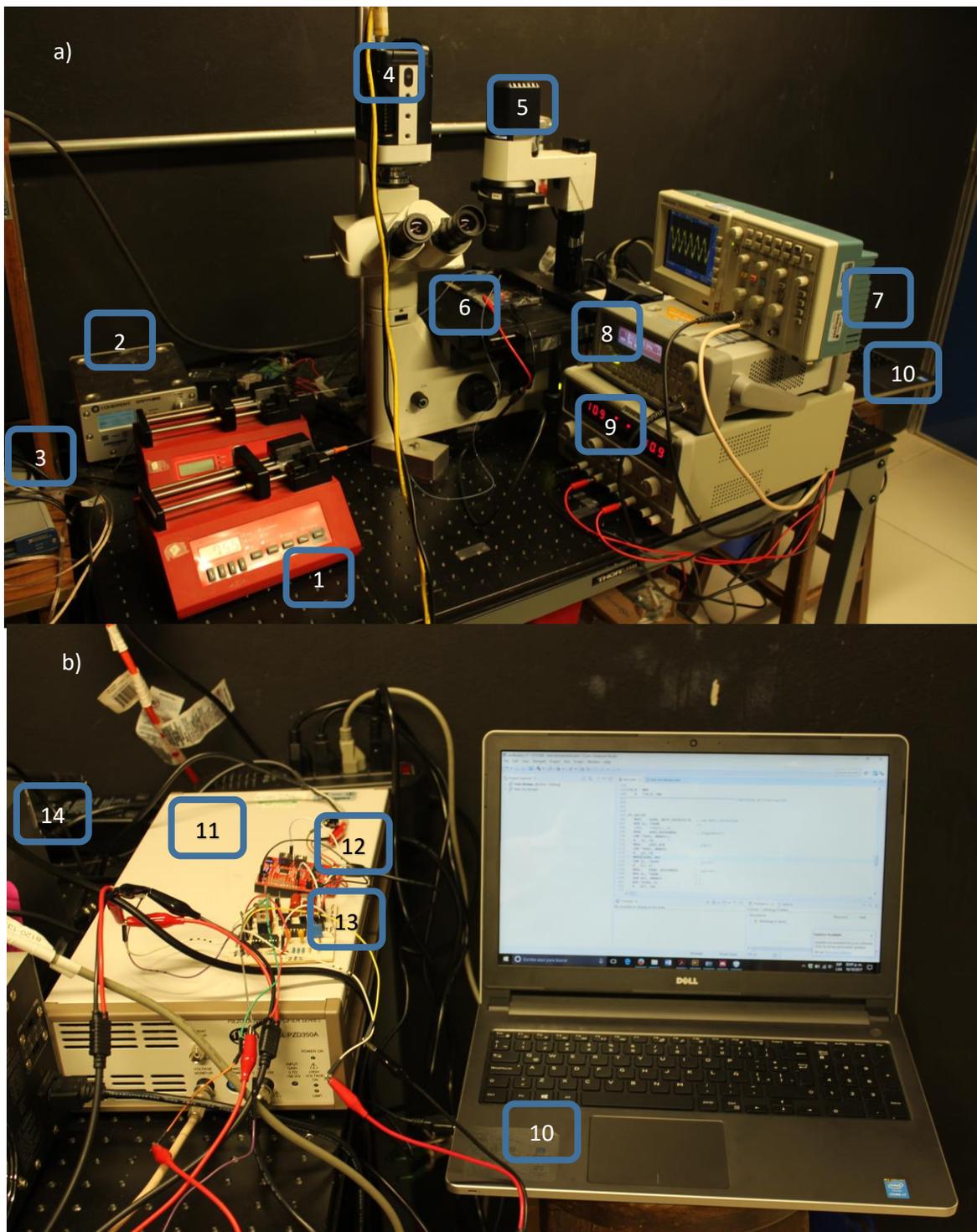


Figura 5.3 Fotografía del arreglo experimental.

1. Bombas de jeringa 2.Diodo láser 3.Tarjeta de adquisición 4.Cámara rápida 5.Microscopio de fluorescencia 6.Chip microfluídico 7.Osciloscopio 8.Generador de funciones 9.Fuente de voltaje 10.Equipo de cómputo 11.Amplificador de potencia 12.DSP 13.Circuito en placa fenólica 14.Fotodiodo de avalancha

5.2 Metodología experimental

Como primera prueba, las micro-gotas fueron generadas y separadas en el mismo chip, para determinar la capacidad máxima de separación. Esto también nos permitió registrar las diferentes intensidades de fluorescencia, correspondientes a distintas concentraciones de fluoróforo, y así tener un experimento de control que nos ayudara a separar gotas de diferentes concentraciones. Acto seguido, formamos dos poblaciones de gotas con dos concentraciones diferentes de fluoresceína en el chip específico de generación de micro-gotas y, reinyectándolas posteriormente en el chip de separación, separamos las gotas con mayor intensidad de fluorescencia. Por último, de la misma forma, generamos gotas de fluoresceína y gotas con colorante vegetal color azul, y separaremos las gotas que fluorecían del resto de la población.

Para cada uno de estos experimentos, fue necesario determinar el tiempo en que tarda la gota en recorrer la porción del chip descrita en la sección 4.2.1. Esto se hace analizando un video tomado con la cámara rápida justo en el momento en el que se quiera comenzar a separar las micro-gotas.

Todas las concentraciones de fluoresceína fueron diluidas en el buffer TRIS a 300 [mM] con un pH de 8 y el aceite empleado para generar las gotas es aceite fluorinado F-7500 (2-(Trifluoromethyl)-3-ethoxydodecafluorohexane) con surfactante EZK060 crudo al 1.8%. Para generar las gotas con colorante azul, se disolvió colorante vegetal de la marca McCormick en agua desionizada a una razón de masa de 20 a 1.

5.3 Resultados de las pruebas

5.3.1 Pruebas con diferentes concentraciones de fluoresceína

Comenzamos por realizar experimentos de control, de los cuales pudimos establecer relaciones entre el nivel del voltaje de la señal de fluorescencia y la concentración de fluoresceína presente en la gota, así como de la potencia del láser y la magnitud de voltaje de la señal de fluorescencia.

El factor de amplificación del circuito, propuesto en la sección 4.1, es de 4.7x para las 5 concentraciones mostradas a continuación y se usó el objetivo de 40x del microscopio Leica y una potencia del diodo láser de 10 [mW] para obtener la intensidad de fluorescencia máxima. Los fluidos se sometieron a una velocidad de infusión de $5 \left[\frac{\mu\text{L}}{\text{hr}} \right]$ para la fluoresceína y de $110 \left[\frac{\mu\text{L}}{\text{hr}} \right]$ para el aceite fluorinado. Por último, las mediciones se realizaron cuando el sistema había alcanzado una estabilidad en la generación de las micro-gotas, es decir, la frecuencia de la señal a la salida del fotodiodo era constante.

Usando el mismo chip para generar y separar las gotas, se realizaron 3 pruebas de cada concentración molar. En las figuras 5.4, 5.5, 5.6, 5.7 y 5.8 se muestran las señales de fluorescencia a la entrada del circuito de acondicionamiento (azules) y a la salida del circuito de acondicionamiento (naranja) de las pruebas más representativas. Además, se muestra la transformada rápida de Fourier de la señal de salida del circuito, en donde observamos la frecuencia de la señal.

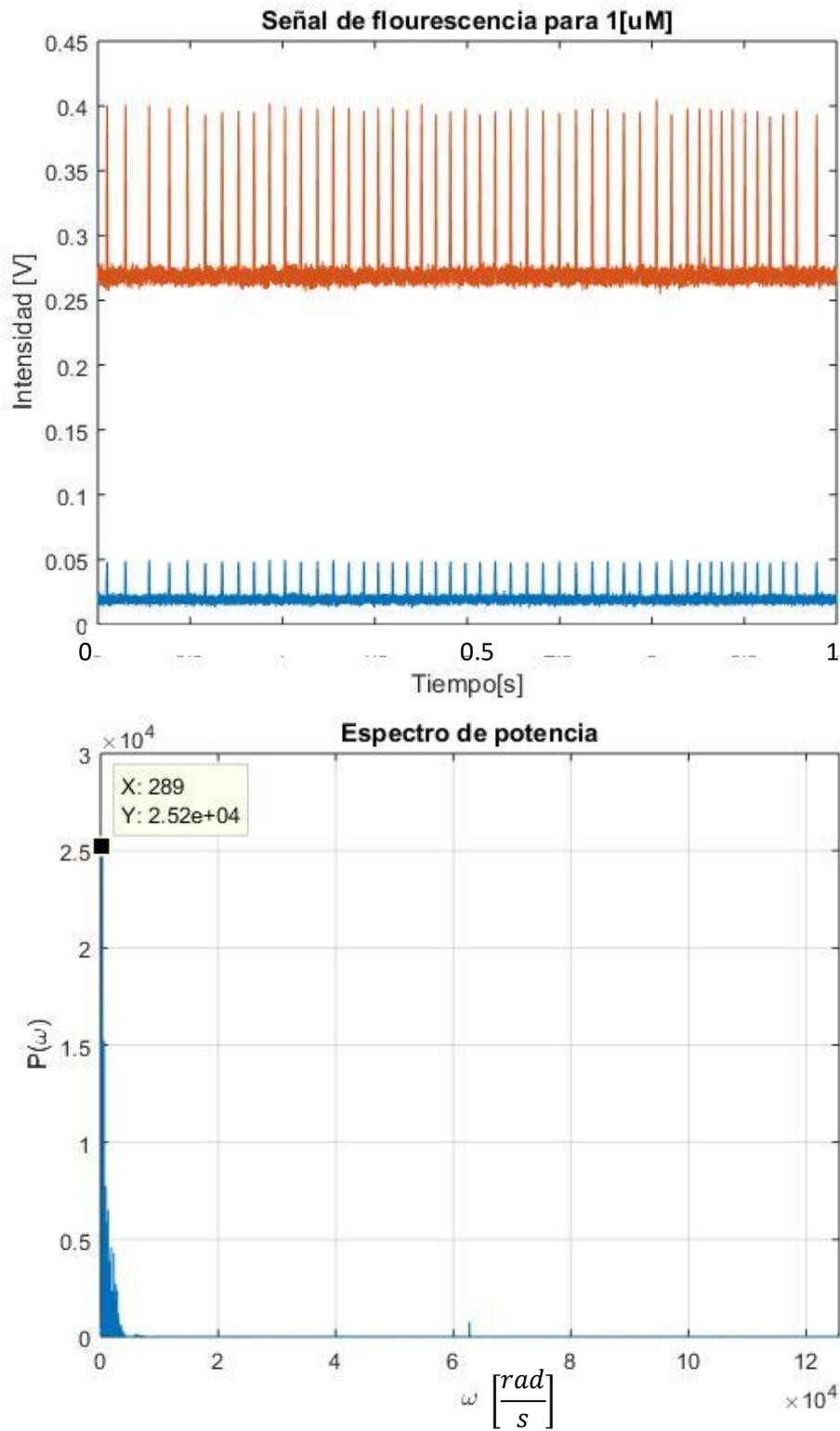


Figura 5.4 Señal de fluorescencia y espectro en frecuencias de la misma para una concentración de 1[μM]

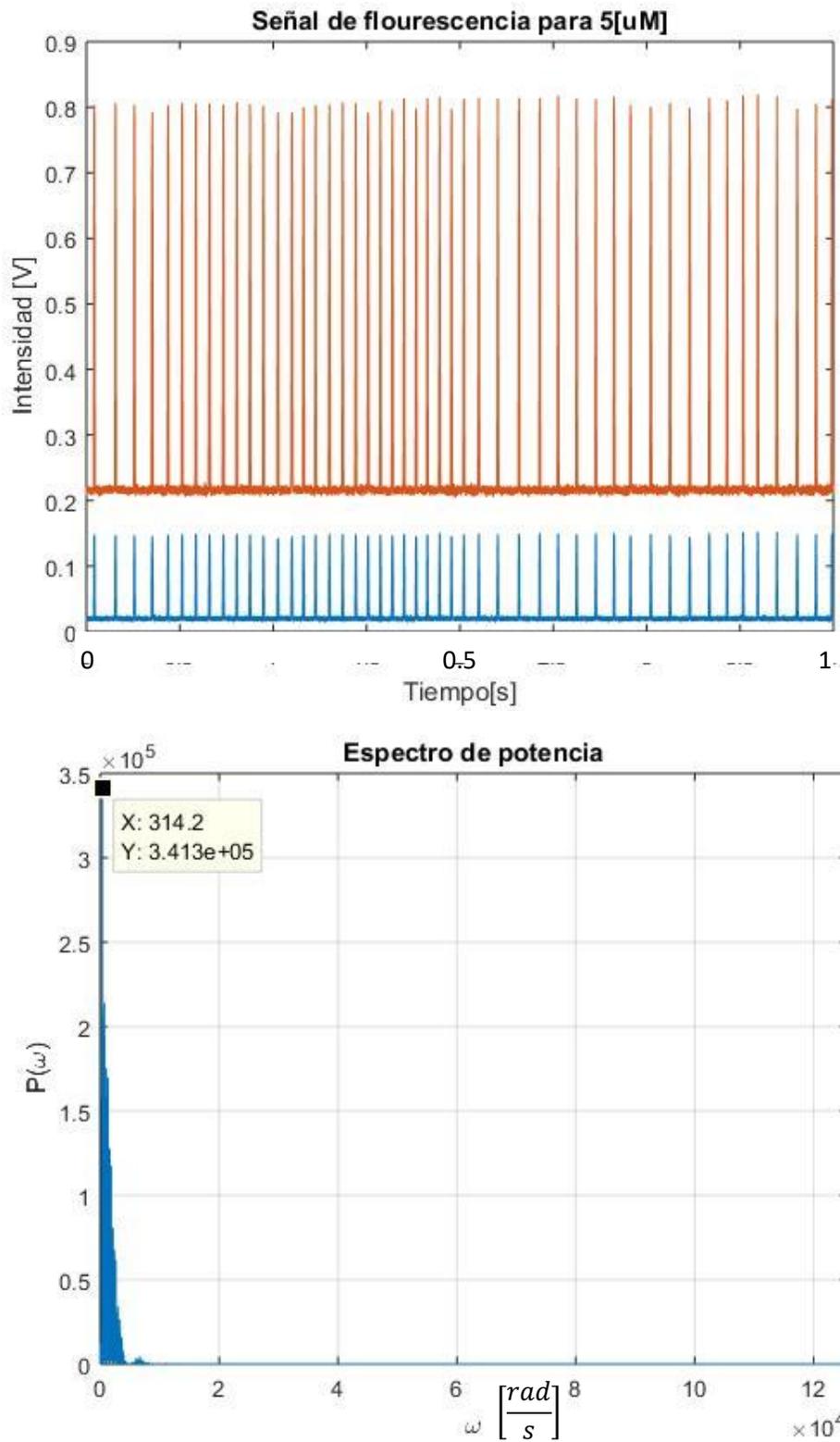


Figura 5.5 Señal de fluorescencia y espectro en frecuencias de la misma para una concentración de 5[μM]

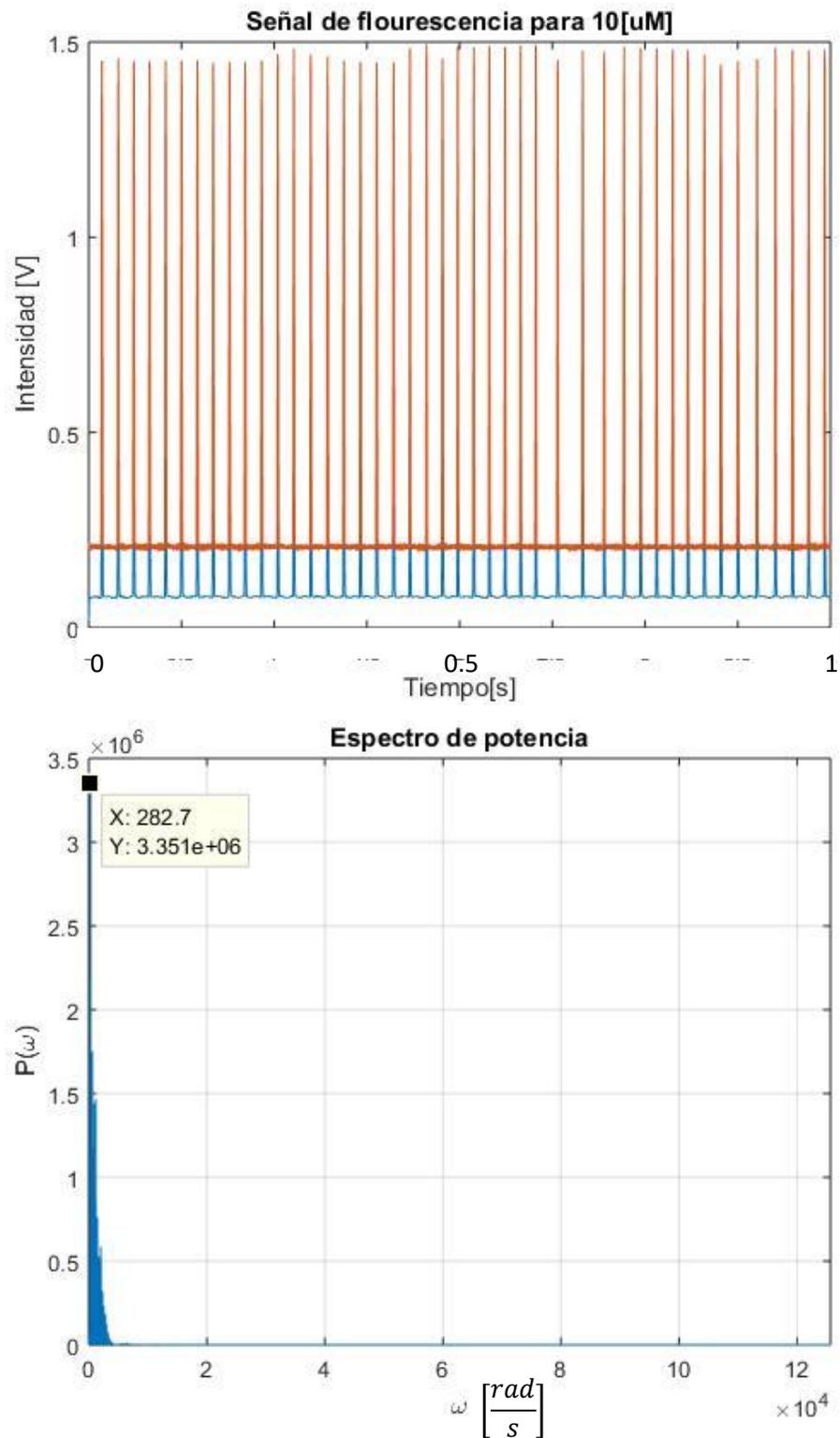


Figura 5.6 Señal de fluorescencia y espectro en frecuencias de la misma para una concentración de 10[μM]

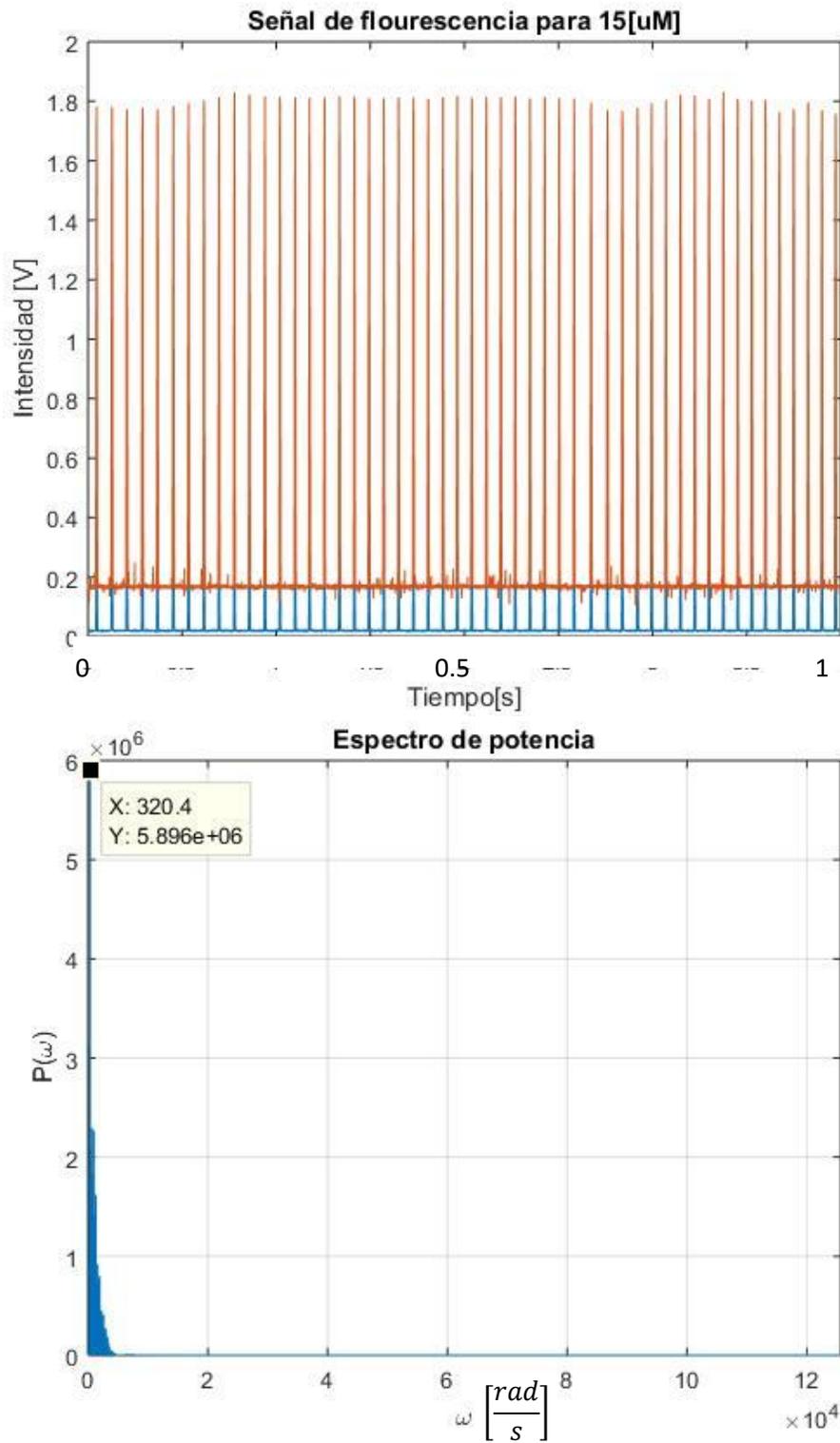


Figura 5.7 Señal de fluorescencia y espectro en frecuencias de la misma para una concentración de 15[μM]

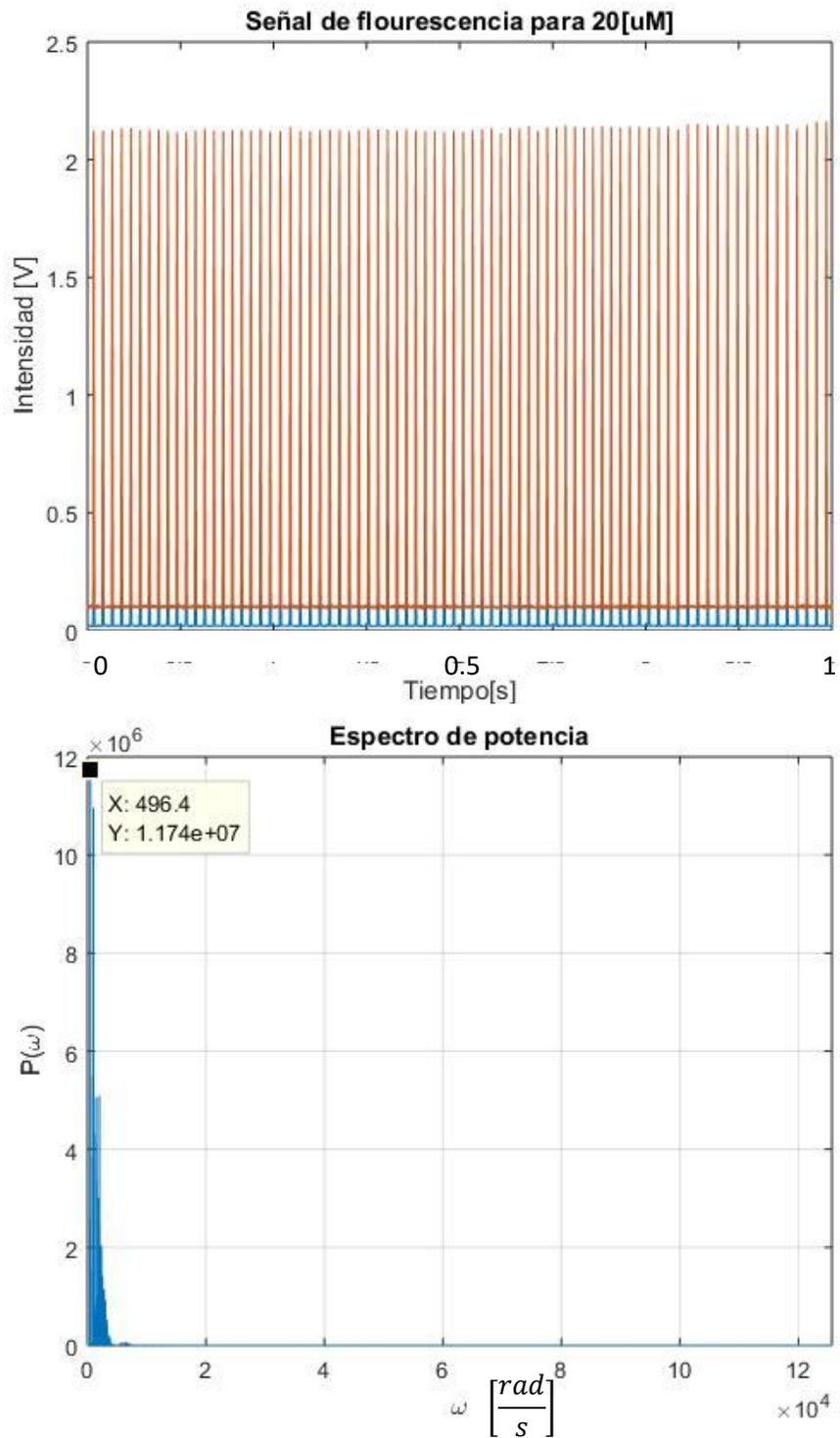


Figura 5.8 Señal de fluorescencia y espectro en frecuencias de la misma para una concentración de 20[μM]

En la tabla 5.1 encontramos la información obtenida de las tres mediciones de cada concentración de fluoresceína. La columna de concentración se refiere a la concentración molar de fluoresceína dentro de las micro-gotas, el $Voltaje_{p-p}$ es el voltaje pico a pico promedio medido a la salida del circuito de acondicionamiento, la columna de frecuencia es la frecuencia promedio de la señal obtenida con la transformada rápida de Fourier de la señal y el número de picos es el número promedio de veces que se presenta un nivel alto por arriba del umbral especificado en la señal de fluorescencia en un segundo.

Tabla 5.1 Valores promedio para las diferentes concentraciones de fluoresceína.

Concentración [μM]	$Voltaje_{p-p}$ [V]	Frecuencia [Hz]	Número de picos
1.00	0.15	48.33	47.67
5.00	0.61	46.33	49.33
10.00	1.29	41.00	39.33
15.00	1.70	56.66	55.67
20.00	2.09	85.00	84.67

La gráfica que representa la variación de la intensidad de voltaje de la señal con respecto a la concentración molar de fluoresceína, es mostrada en la figura 5.9, en donde también se representa la gráfica del modelo lineal correspondiente, así como las barras de desviación estándar correspondiente a cada punto.

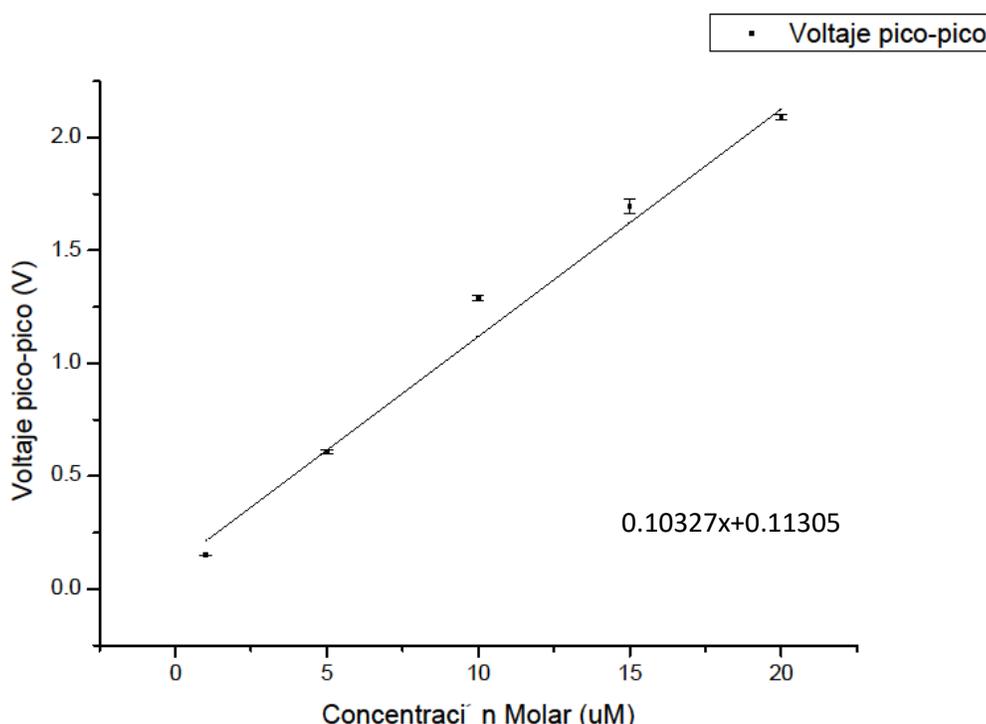


Figura 5.9 Valores de voltaje medidos diferentes concentraciones molares con su respectivo modelo lineal y barras de desviación estándar.

Adicionalmente en las figuras 5.10 y 5.11 es mostrada la señal de disparo (naranja) para la polarización de los electrodos cuando la señal del fotodiodo (azul) tiene un valor mayor que el umbral fijado. El tiempo de encendido de los electrodos es el mismo para las 5 diferentes concentraciones molares, el cual tiene una duración de 7 [ms].

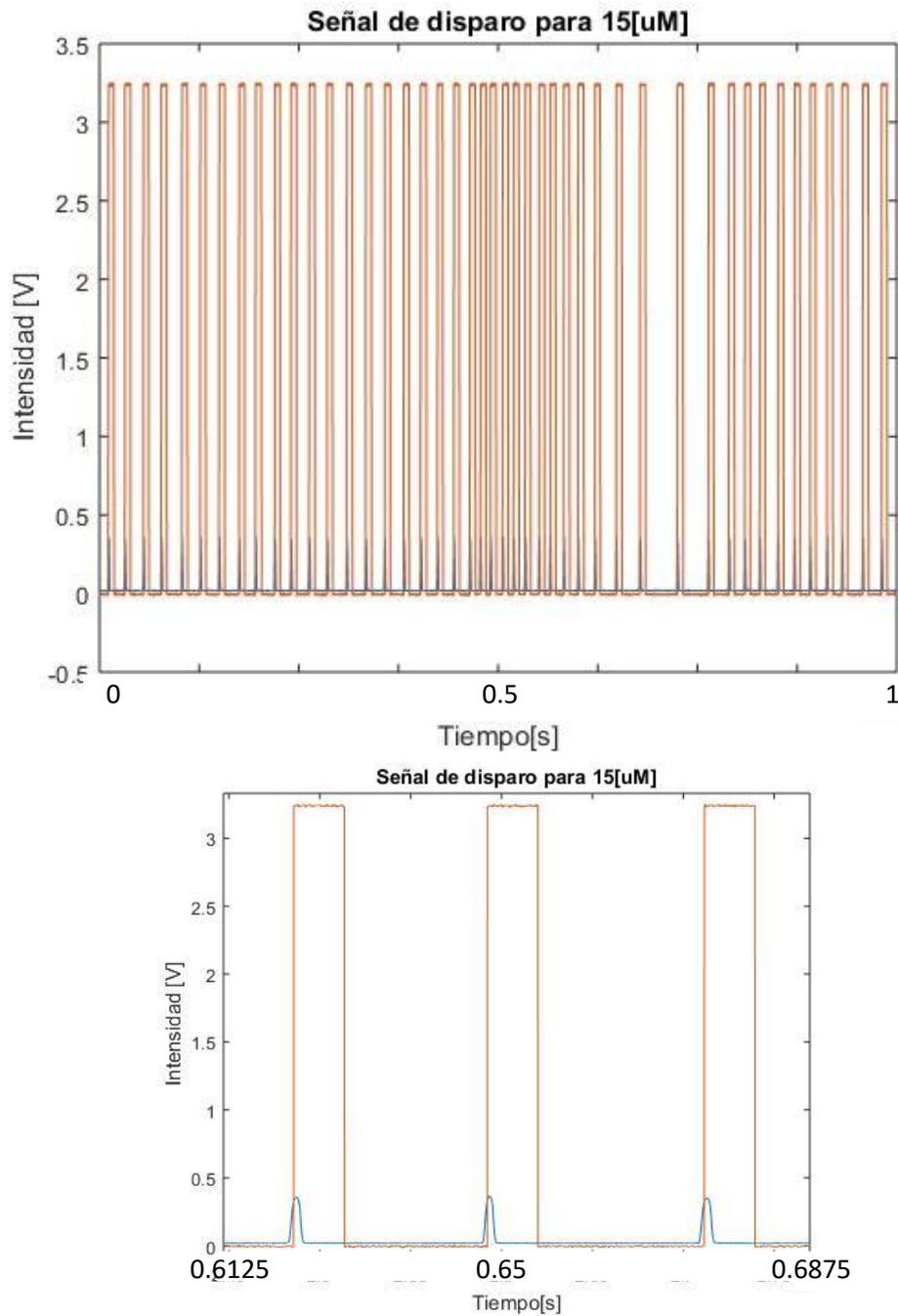


Figura 5.10 Señal de polarización (naranja) y señal del fotodetector (azul) para una concentración de 15[μM]

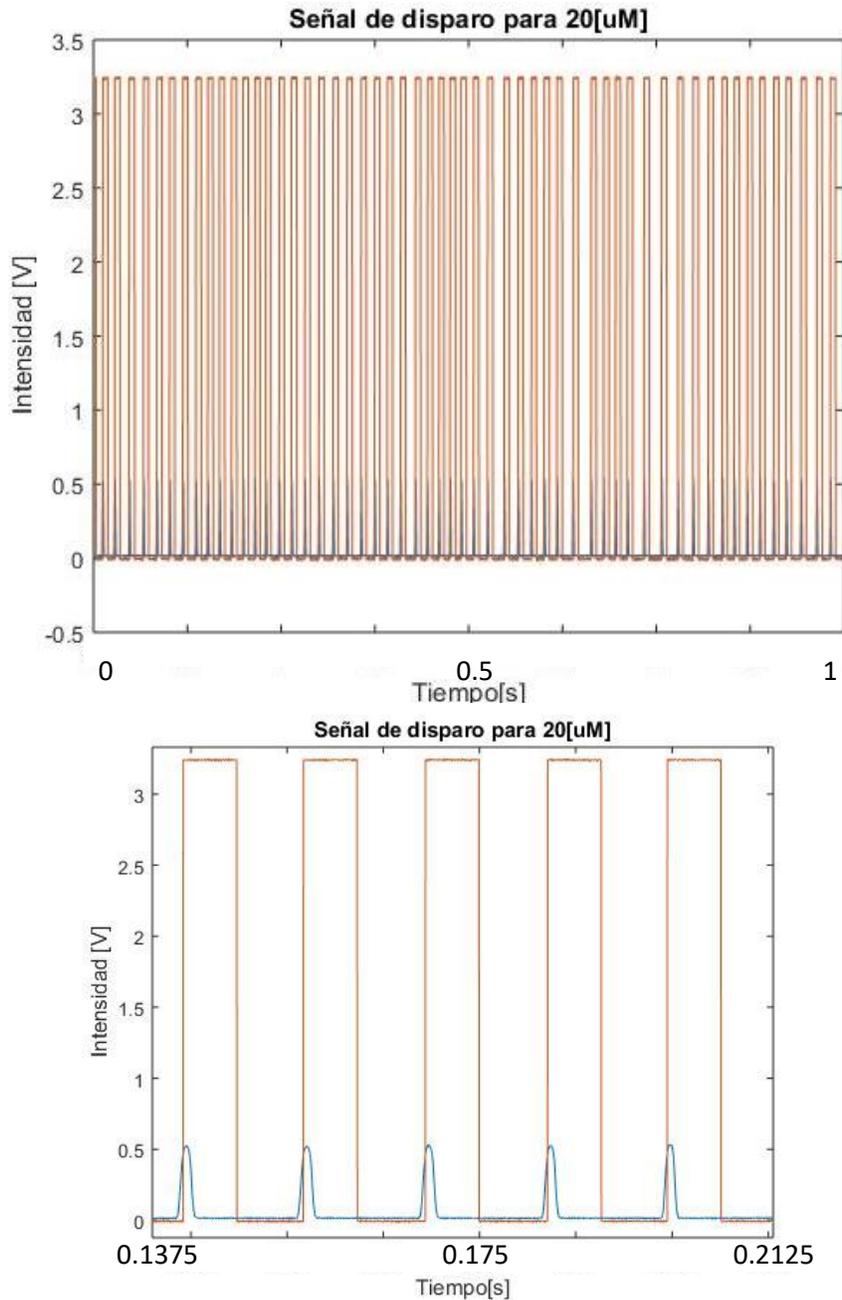


Figura 5.11 Señal de polarización (naranja) y señal del fotodetector (azul) para una concentración de 20[μM]

En la figura 5.12 se muestran fotos de la zona de separación del chip cuando éste está en funcionamiento. El punto blanco observado en la imagen es el punto focal del láser. Como en este caso las micro-gotas eran generadas en el mismo chip de separación, todas ellas tenían el mismo nivel de fluorescencia cuando el sistema estaba en funcionamiento, por lo que teóricamente todas las gotas eran separadas, y la frecuencia de la señal de fluorescencia es la misma que el número de veces que los electrodos son polarizados. En

la figura 5.12 c), se nota que hay una gota alargada fluyendo por el canal de recolección. Esta gota se forma porque ocurre electrocoalescencia entre una o más gotas, al fluir muy cerca una de la otra, cuando el campo de dielectroforesis está presente, aunado a que la saturación del canal de recolección aumenta la resistencia hidráulica de ese canal. Esta saturación es originada porque muchas micro-gotas son desviadas por la fuerza DEP en el canal de separación. Estas pruebas fueron realizadas con intervalos de duración de 1 [s] y el mismo comportamiento fue observado para las cinco concentraciones molares hasta ahora expuestas.

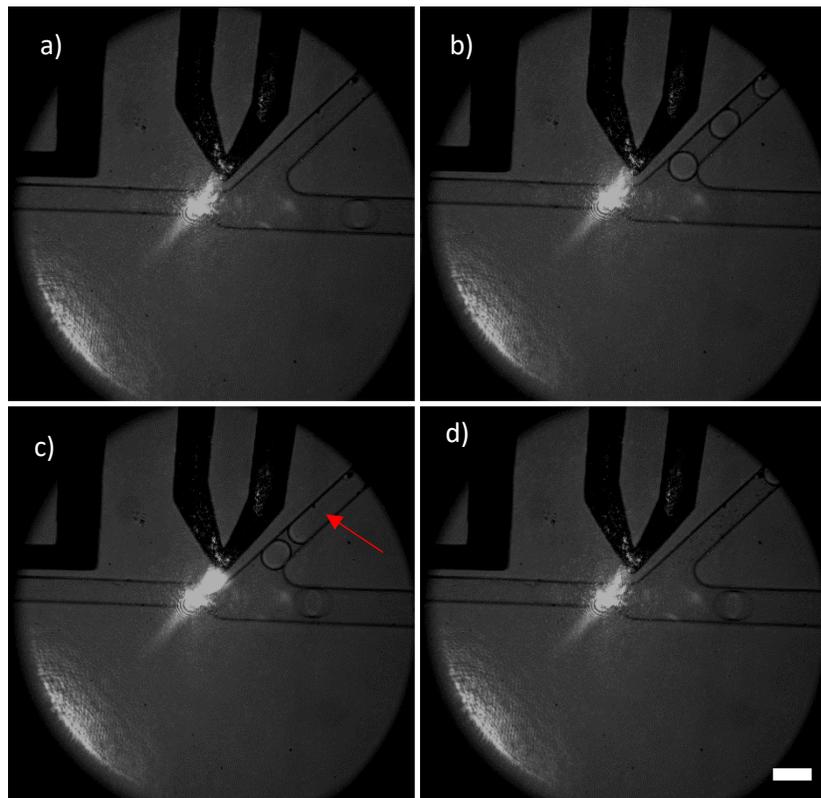


Figura 5.12 Separación de micro-gotas.

a) Electrodo sin polarizar, b) separación de micro-gotas, c) electrocoalescencia de gotas en el canal de separación y d) final de separación. Barra de escala de 45 [μm]

Usando los videos grabados en la cámara rápida se cuenta el número de gotas separadas y dicha cuenta se compara con el registro del DSP que señala el número de veces que los electrodos son polarizados (lo que suponía el número teórico de gotas separadas). Con esto, obtenemos las gráfica de error (figura 5.13), en donde el eje de frecuencia indica la frecuencia de la señal de fluorescencia (número de gotas detectadas por segundo) y el eje de las ordenadas es el porcentaje de error de experimento, esto es

cuántas gotas no fueron separadas del total de las veces que los electrodos fueron polarizados.

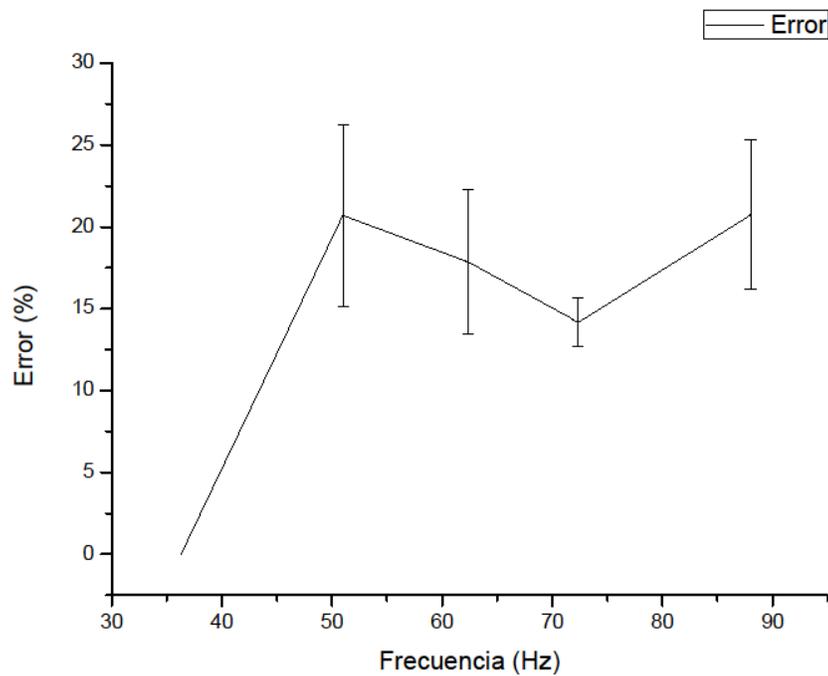


Figura 5.13 Gráfica de error contra la frecuencia a la que se separan las gotas con sus respectivas barras de desviación estándar.

Este error tan grande se debe a la saturación de gotas del canal de separación y a la coalescencia de las mismas, incrementando la resistencia hidráulica del canal, y provocando que las micro-gotas fluyeran por el canal de desperdicio.

Con la corroboración visual, también podemos representar el número de gotas que coalescen por segundo respecto a la frecuencia de la señal de fluorescencia como se muestra en la figura 5.14.

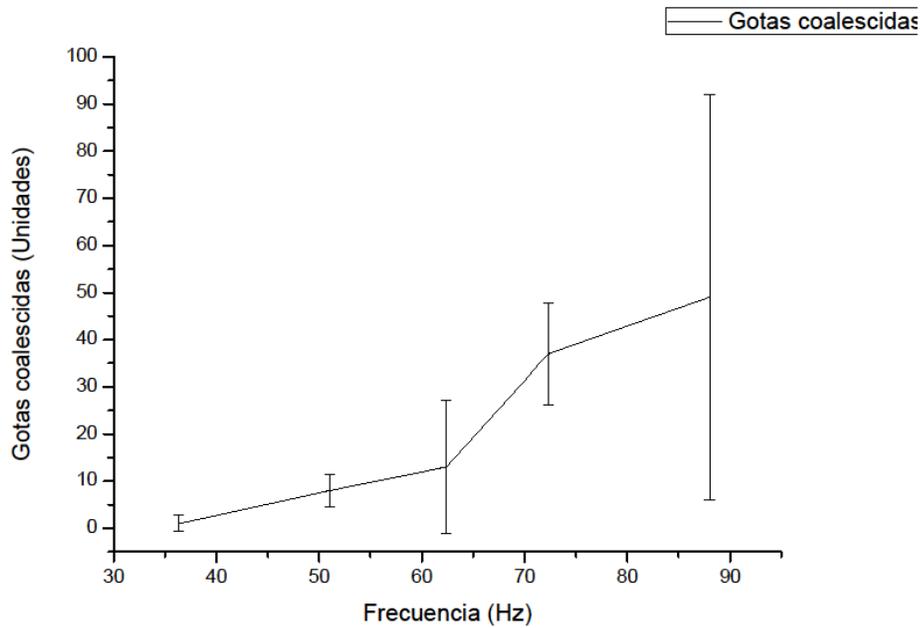


Figura 5.14 Gráfica de gotas coalescidas respecto a la frecuencia con la que son separadas con sus respectivas barras de desviación estándar

También se realizaron pruebas con una baja concentración de fluoresceína en las cuales se varió la potencia del láser. Se hicieron tres pruebas para cada intensidad de potencia del láser. Esto se hizo para identificar el límite de detección del sistema. En este caso, incrementamos la amplificación de la etapa de acondicionamiento a 405 veces, el cual fue el valor máximo caracterizado en la sección 4.2.5. La concentración utilizada fue de 50 [nM] y las demás condiciones del experimento fueron las mismas que las descritas previamente, solo que esta vez, la potencia del láser fue variada desde 4 [mW] hasta 10 [mW] con un incremento de 1 [mW] a la vez. Las figuras 5.15 y 5.16 muestran las señales de fluorescencia a la salida del fotodiodo (azules) y a la salida del circuito de acondicionamiento (naranjas), así como el espectro en frecuencias de la señal amplificada para una potencia de 4 [mW] y 10[mW] respectivamente. En la figura 5.17 se gráfica la variación del voltaje respecto a la potencia del diodo láser.

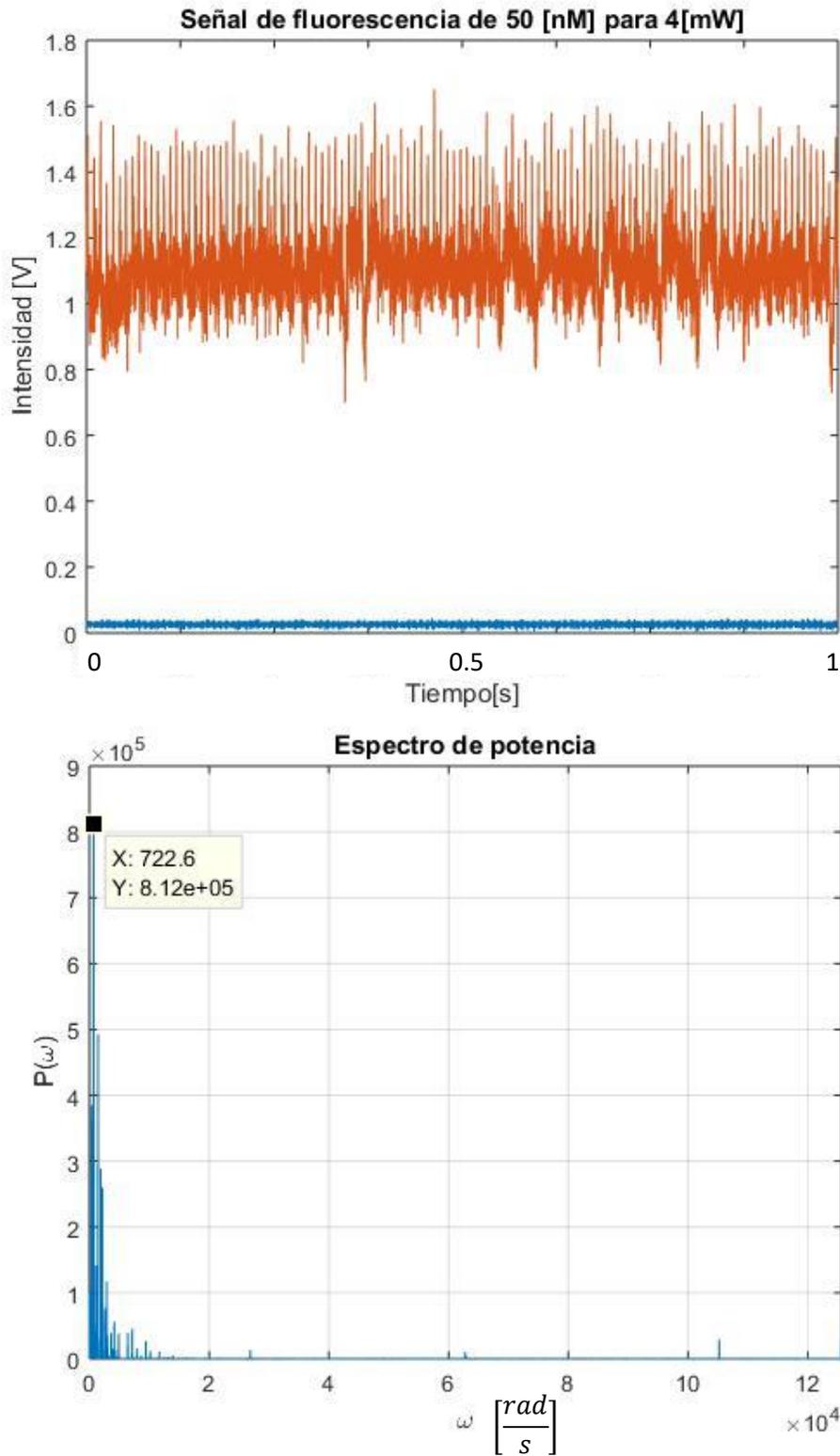


Figura 5.15 Señal de fluorescencia y espectro en frecuencia para una concentración de 50 [μ M] y una potencia de 4 [mW]

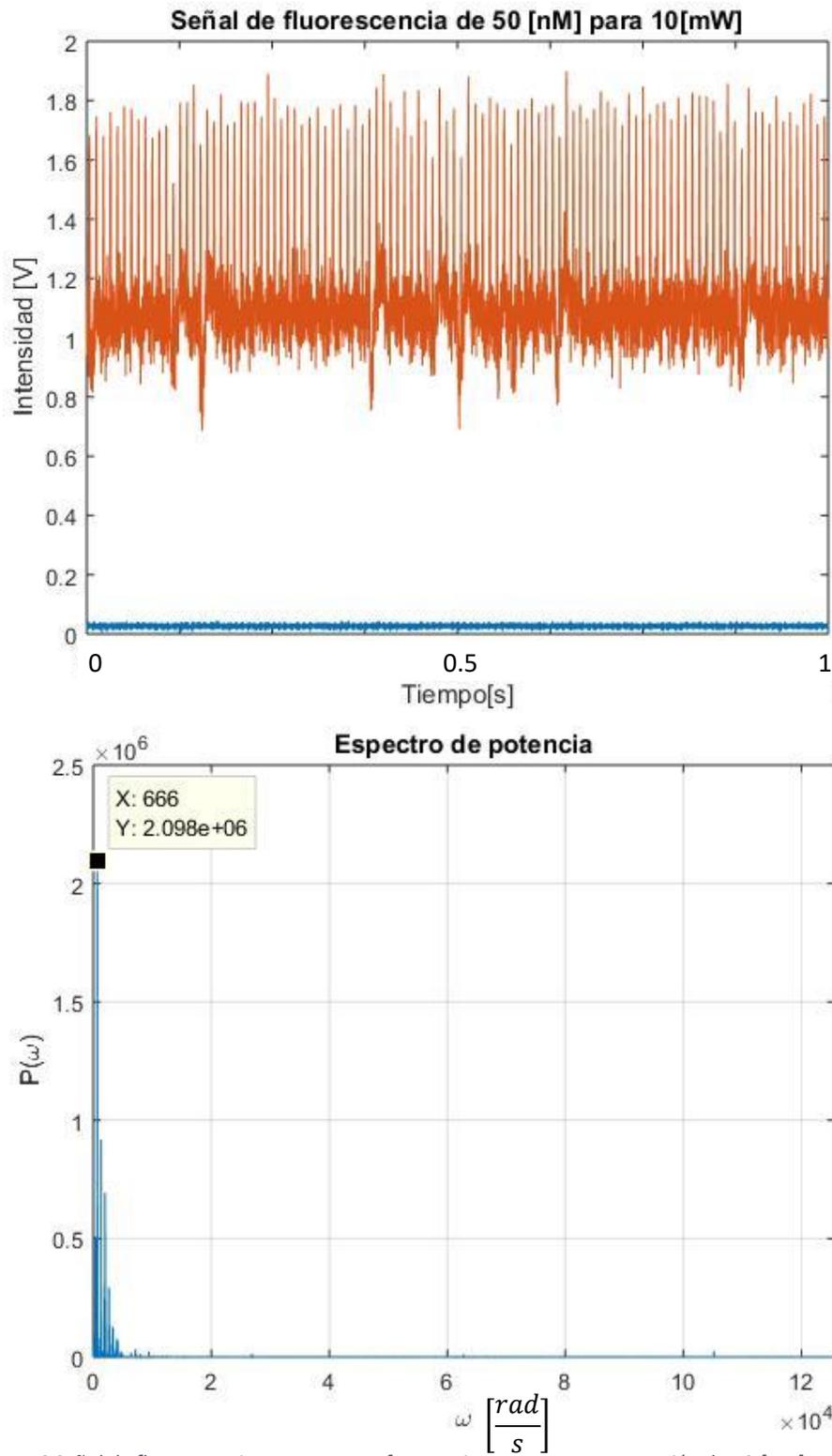


Figura 5.16 Señal de fluorescencia y espectro en frecuencia para una concentración de 50 $[\mu M]$ y una potencia de 10[mW]

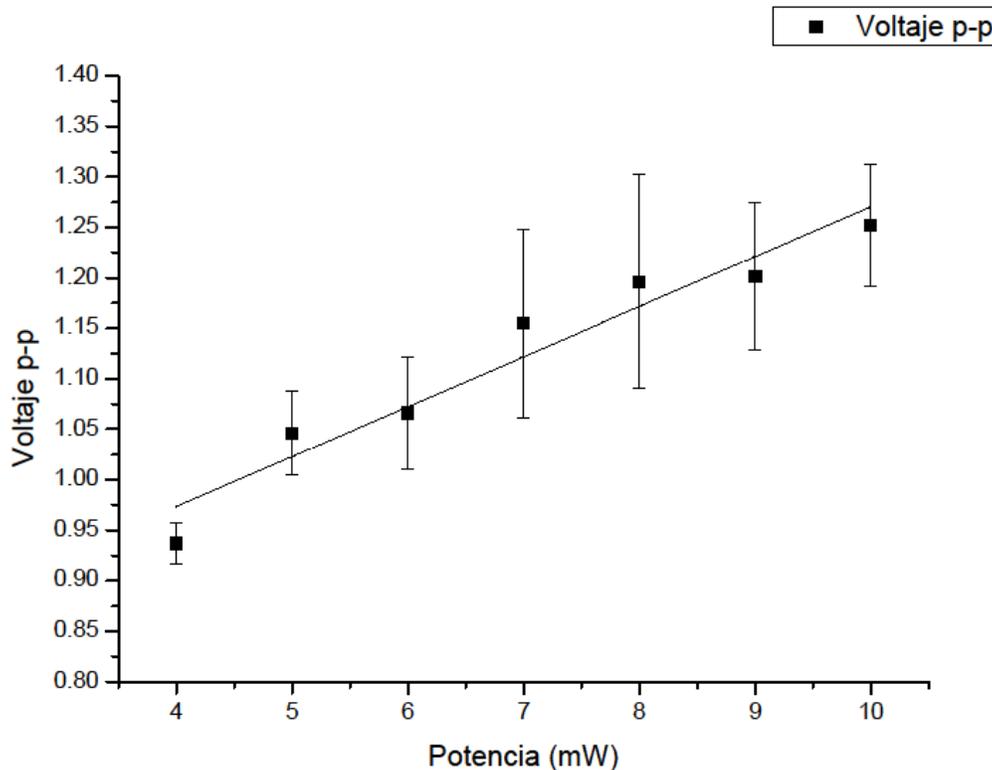


Figura 5.17 Gráfica de voltaje contra Potencia del láser con sus respectivas barras de desviación estándar para una concentración de fluoresceína de 50 [nM] a un pH 8

Al igual que se hizo en la prueba pasada para las diferentes concentraciones de fluoresceína, para la concentración de 50 [nM] se realizó una prueba de separación utilizando una potencia de 10 [mW] en el láser. El tiempo de encendido de los electrodos fue de 7 [ms] y el umbral de voltaje usado fue de 1.5 [V]. En la figura 5.18 se muestra la señal de fluorescencia a la salida del circuito de acondicionamiento (azul) y la señal de encendido de los electrodos (naranja), con una frecuencia de 119 [Hz]. En esta prueba, se logró registrar que los electrodos se encendieron 127 veces en un tiempo de prueba de 1 [s] y, corroborando esto visualmente con ayuda de la cámara rápida, se observó que 95 gotas fueron separadas, esto quiere decir que se presentó un error del 25.1 %. Además, 92 gotas separadas (96.8% de las gotas totales separadas) presentaron el fenómeno de electrocoalescencia porque gotas separadas se saturaron en el canal, lo que invita a en un futuro mejorar el diseño hidráulico de la bifurcación. En la figura 5.19 se muestra una captura del dispositivo en funcionamiento en donde se observa la coalescencia de las gotas.

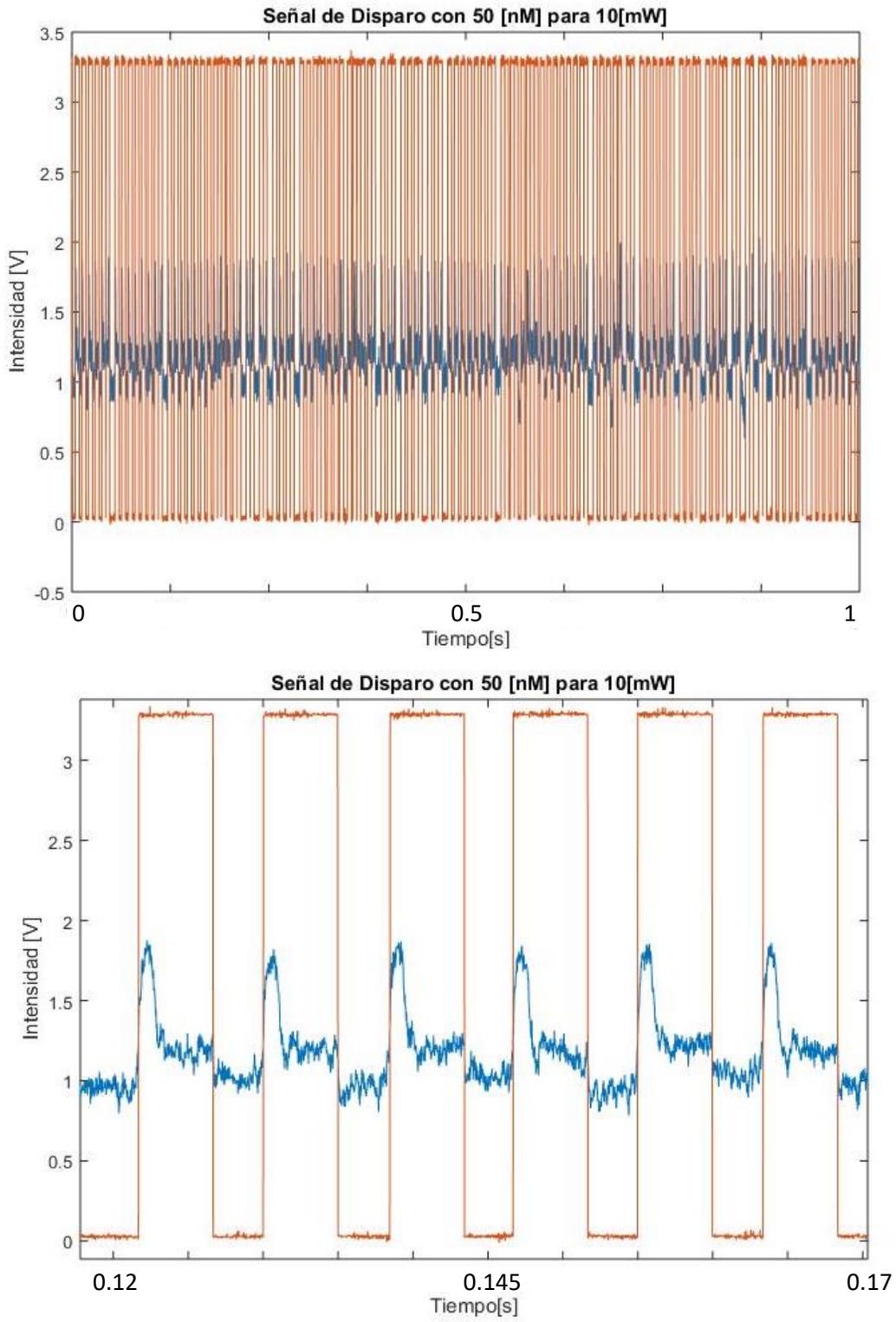


Figura 5.18 Señal de fluorescencia y de disparo para encender los electrodos para una concentración de 50 μM y una potencia de 4W

Para esta prueba con una concentración de fluoresceína de 50[μ M], y usando una amplificación del circuito de acondicionamiento de 405 veces, obtenemos el logaritmo base diez del factor de ruido para las diferentes señales correspondientes a cada valor de potencia del láser como se muestra en la tabla 5.2.

Tabla 5.2 Valores del logaritmo base diez del factor de ruido F para los diferentes valores de potencia del láser

Potencia [mW]	$10\log F$ dB
4	-19.4880666
5	-17.573619
6	-17.5100993
7	-14.2277331
8	-17.4583502
9	-13.7343567
10	-15.4012458

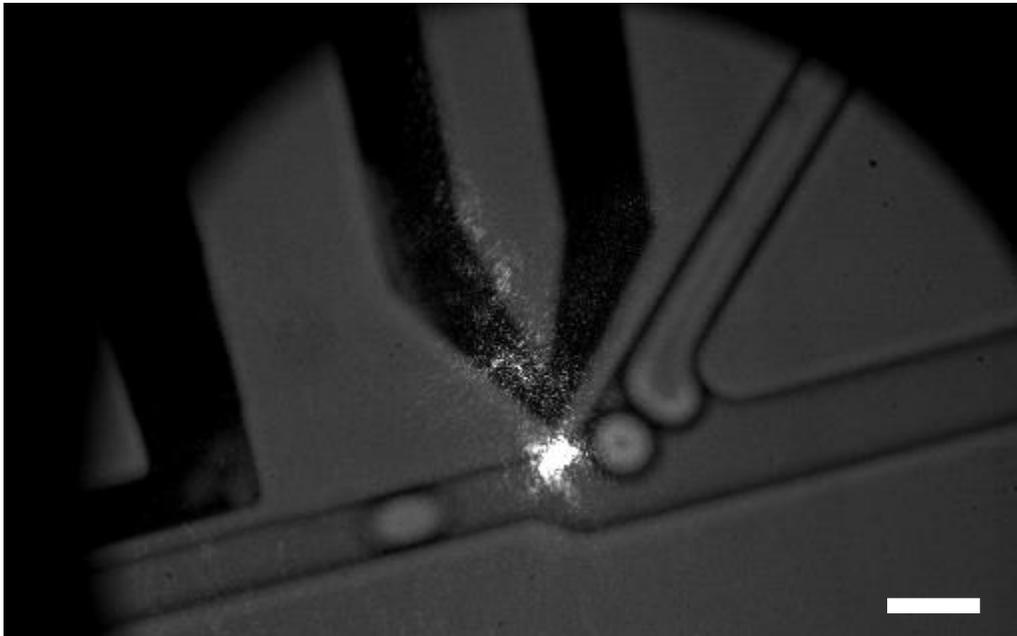


Figura 5.19 Coalescencia de micro-gotas. Barra de escala de 45 [μ m]

5.3.2 Separación de micro-gotas de fluoresceína a diferentes concentraciones.

Para esta prueba se formaron dos tipos de gotas, unas con fluoresceína a una concentración de 15 [μM] y otras con una concentración de 5 [μM]. Estas gotas se generaron en el chip de generación durante dos horas, a un flujo de 10 [$\frac{\mu\text{L}}{\text{hr}}$] para la fluoresceína y 100 [$\frac{\mu\text{L}}{\text{hr}}$] para el aceite, y posteriormente fueron mezcladas por difusión en un tubo *ependorf* por 24 [hrs]. Después fueron reinyectadas en el chip de separación, con una velocidad de infusión de 10 [$\frac{\mu\text{L}}{\text{hr}}$] para las gotas y 100 [$\frac{\mu\text{L}}{\text{hr}}$] para el aceite. La potencia del diodo láser se fijó en 10 [mW] para obtener la máxima intensidad de fluorescencia posible. El umbral de detección fue de 2 [V] y el tiempo de encendido de los electrodos fue de 7 [ms]. Las pruebas se llevaron a cabo durante 13 segundos.

En la figura 5.20 se muestra la señal de fluorescencia obtenida de esta prueba. Se pueden distinguir tres niveles de voltaje en vez de dos como se esperaba. Una posible explicación de lo que ocurre es que cuando las micro-gotas son reinyectadas al chip, la tensión superficial de la micro-gota no es lo suficientemente fuerte para mantener las gotas separadas y, por lo tanto, algunas de ellas se combinan, formando gotas de mayor tamaño. Cuando estas gotas son excitadas por el láser, despiden una mayor intensidad de fluorescencia debido a que el volumen excitado es más grande que las gotas de tamaño promedio. Dado que los voltajes para estas concentraciones fueron registrados en pruebas previas, relacionamos la concentración de 15 [μM] con un voltaje pico-pico promedio de 1.7 [V] y la concentración de 5 [μM] con un voltaje pico-pico promedio de 0.6 [V]. Así, para la figura 5.20, los picos medianos corresponden a las gotas de 15 [μM] y los picos pequeños corresponden a las gotas de 5 [μM].

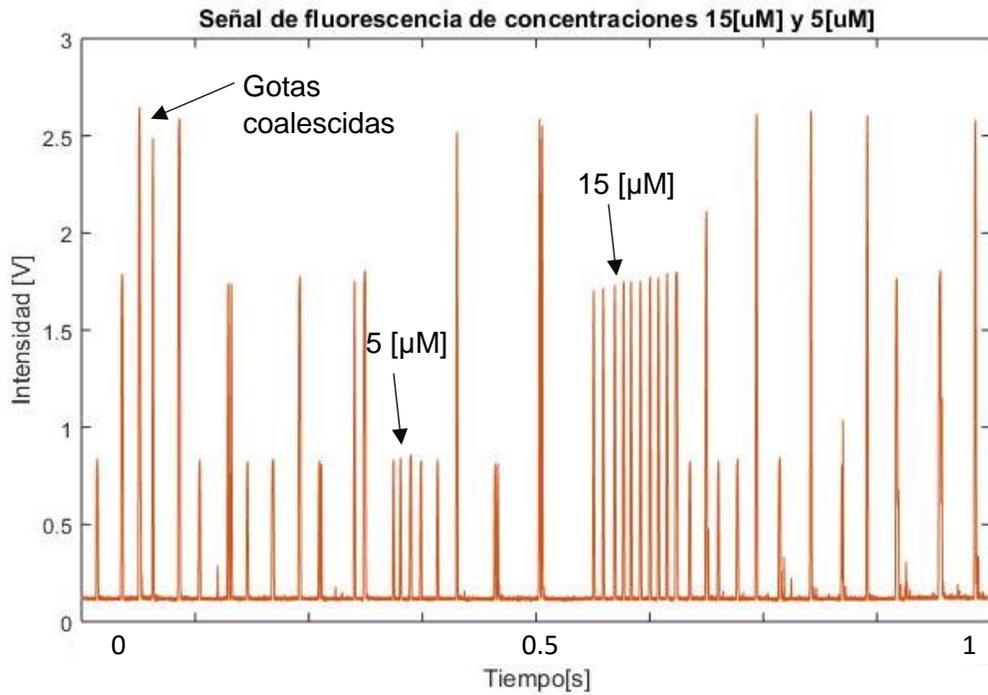


Figura 5.20 Señal de fluorescencia para concentraciones de 15 [μM] y 5 [μM]

El espaciado irregular entre las micro-gotas en el proceso de reinyección, se ve en la figura 5.21. Con el umbral de separación en 2[V], se separan las gotas con mayor intensidad como lo muestra la señal de disparo de la figura 5.22.

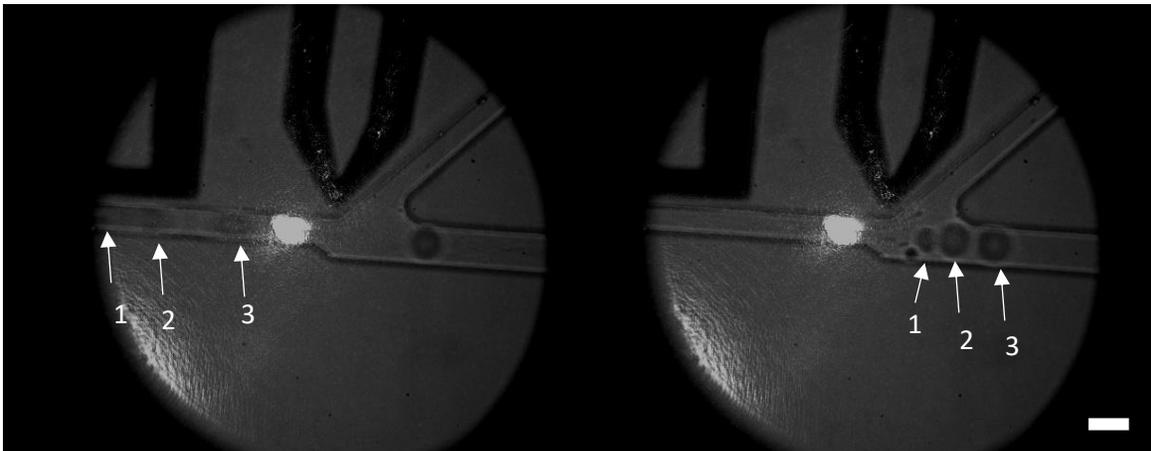


Figura 5.21 Espaciado irregular en la reinyección de las micro-gotas. Barra de escala de 45 [μm]

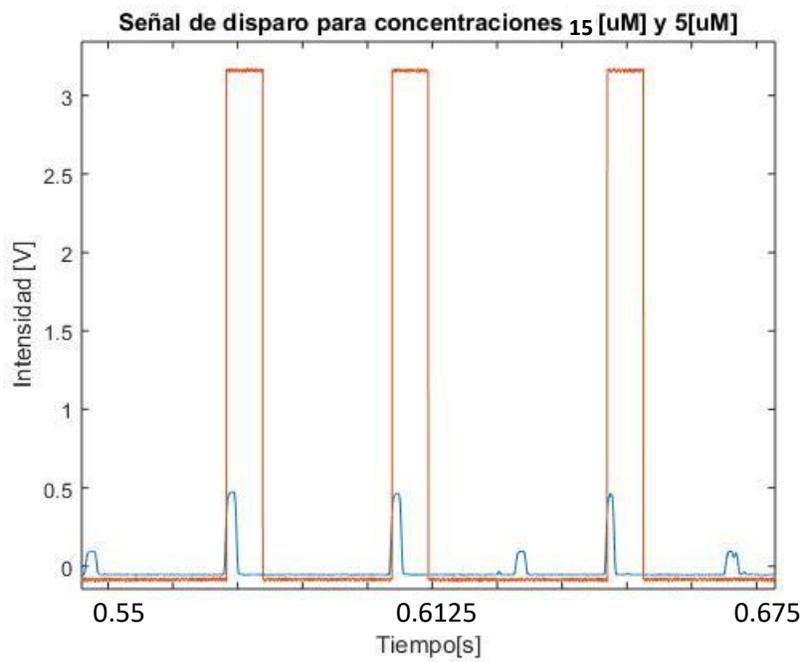
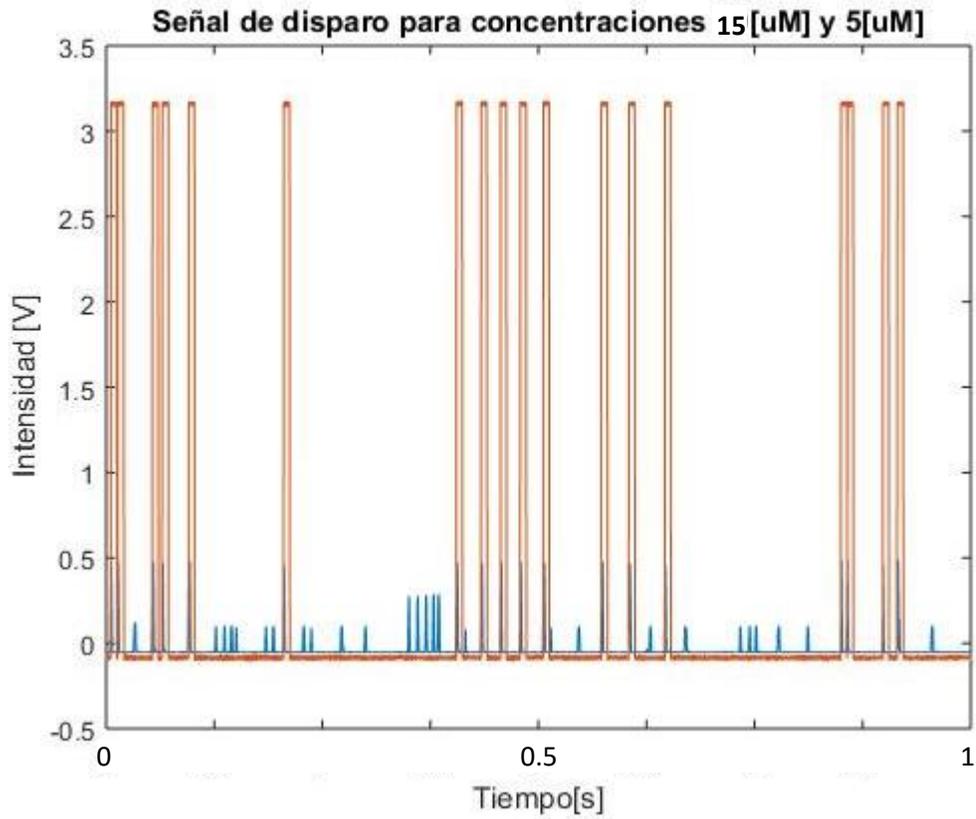


Figura 5.22 Señal de disparo para la separación de concentraciones de 15 [μM] y 5 [μM]

Se realizaron tres mediciones durante 13.1 [s], cada una en las cuales, en promedio, se activaron los electrodos 92 veces y se separaron 47 micro-gotas, esto es un error de 48.5%, de un total de 460 gotas inyectadas al chip durante este tiempo. Después se incrementó el flujo de las gotas a $15 \left[\frac{\mu\text{L}}{\text{hr}} \right]$ y se realizaron tres mediciones más, en donde se observó que, en promedio, se encendieron los electrodos 100 veces y se separaron 46 gotas, esto es un error de 54% de un total de 971 gotas inyectadas al chip.

5.3.3 Separación de micro-gotas de fluoresceína de micro-gotas con colorante vegetal.

En estas pruebas se generaron gotas de fluoresceína a una concentración de 20 $[\mu\text{M}]$ y gotas de colorante vegetal durante 2 horas en el chip de generación. Posteriormente se reinyectaron en el chip de separación a una velocidad de $8 \left[\frac{\mu\text{L}}{\text{hr}} \right]$ para las micro-gotas y $120 \left[\frac{\mu\text{L}}{\text{hr}} \right]$ para el aceite. El tiempo de encendido de los electrodos fue de 5 [ms] y el umbral fue de 1.5 [V]. En la figura 5.23 hay tres tipos de gotas, distinguidas por la transparencia de ellas, que corresponde a una gota con colorante vegetal, una gota combinada y una gota de fluoresceína.

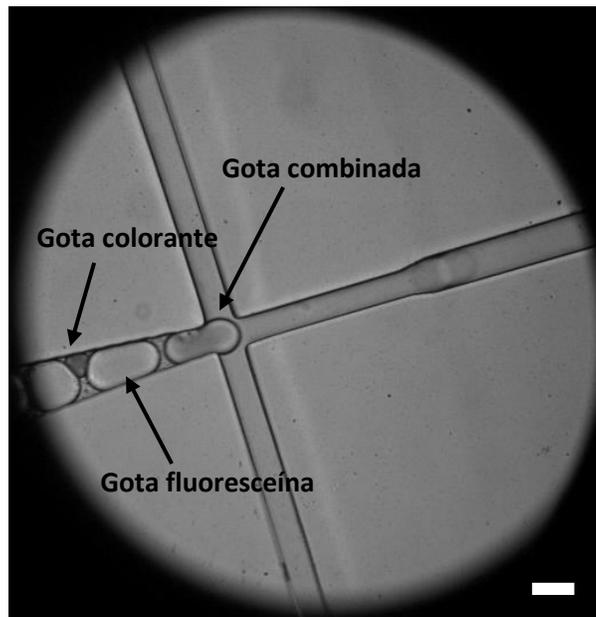


Figura 5.23 Tres tipos de gotas diferentes, diferenciadas por el oscurecimiento de su interior. Barra de 30 $[\mu\text{m}]$

En la figura 5.24 se puede observar cuando la gota de colorante (oscura) pasa por la zona de separación y no es separada como las gotas de fluoresceína (blancas).

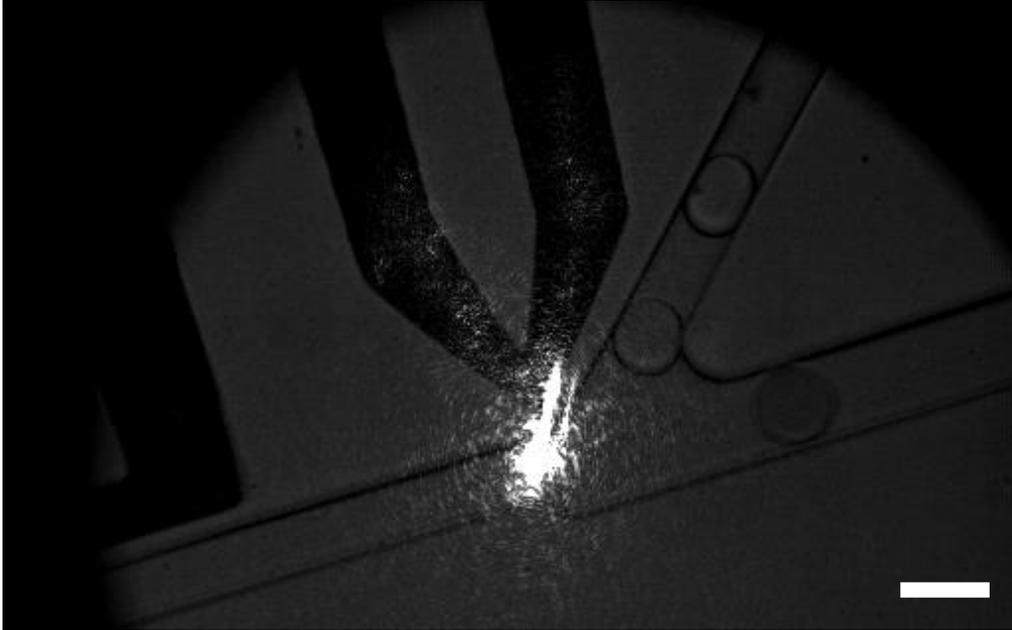


Figura 5.24 Separación de gotas de fluoresceína (blancas) y gotas con colorante azul. Barra de escala 45 [μm]

Se realizaron dos pruebas, con duración de 13.1 [s] cada una, de las cuales en promedio se separaron 27.5 gotas cuando los micro-electrodos se activaron 57 veces, esto representa un error del 51.75%. La separación irregular de las micro-gotas y el fenómeno de electrocoalescencia se hizo presente en el experimento (figura 5.25).

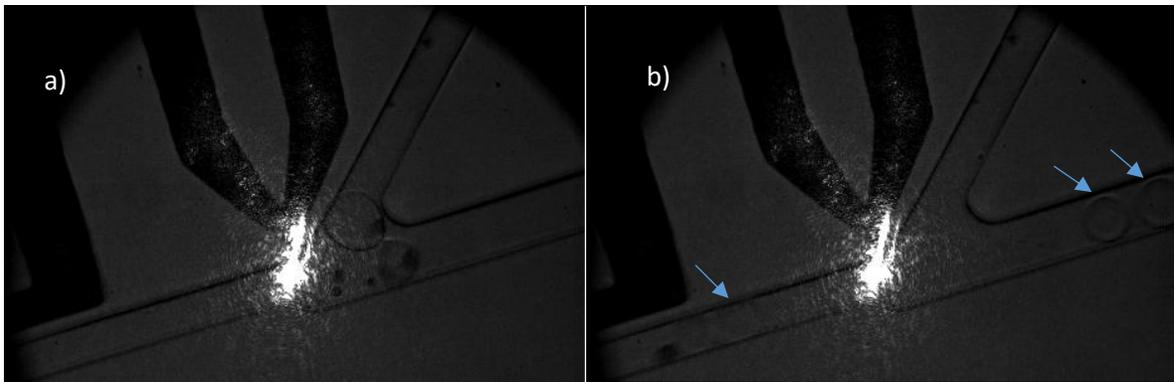


Figura 5.25 a) Gotas azules coalesciendo con gotas de fluoresceína y b) espaciamiento irregular entre gotas. Barra de escala 45 [μm]

Capítulo 6 Conclusiones y trabajo a futuro

6.1 Conclusiones

En este trabajo se describe el diseño, la fabricación y la prueba de un chip microfluídico para la separación, por medio de dielectroforesis, de gotas fluorescentes basado en detección de fluorescencia inducida por láser.

Se logró el objetivo de implementar un sistema con el cual se pueden distinguir y separar micro-gotas fluorescentes en chip para en un futuro realizar ensayos biológicos y bioquímicos. Para lograrlo, se cumplió con el objetivo específico propuesto de diseñar y fabricar un chip microfluídico, para separar micro-gotas de 30 [μm], basado en detección de fluorescencia inducida por láser, y usando la fuerza de dielectroforesis. Para obtener los parámetros de diseño, se consideró que se separarían micro-gotas con bacterias *E. coli* como prueba biológica futura. Además, para generar la fuerza de dielectroforesis fue necesario implementar un par de micro-electrodos volumétricos dentro del chip para generar un campo eléctrico no uniforme. Para el diseño se empleó el software de simulación COMSOL Multiphysics. Los valores obtenidos de campo eléctrico, así como el campo de velocidades y de presiones en las simulaciones, no son los mismos que los presentes en el sistema real ya que hay parámetros no considerados en la simulación como la longitud de las mangueras microfluídicas y la modificación de presiones a la entrada y salida del chip, que a su vez incrementa la resistencia hidráulica de los canales, así como la irregularidad en la forma de las micro-gotas.

Para fabricar el microchip, se utilizaron las técnicas de fotolitografía y litografía suave e inyección de soldadura de bajo punto de fusión, con lo cual obtuvimos un chip de polímero PDMS con micro-electrodos conductores. La profundidad de los canales microfluídicos fue medida usando un perfilómetro, obteniendo una profundidad promedio de 28.32 ± 4.62 [μm], con lo cual concluimos que en el proceso de fabricación propuesto para lograr canales de 30 [μm] de altura, se tiene un error de 1.68 ± 4.62 [μm].

También se cumplió el objetivo de realizar la separación de micro-gotas fluorescentes de aquellas no fluorescentes en el chip de forma automática. Para lograrlo se diseñó y fabricó un circuito electrónico que consta de una etapa de acondicionamiento, para la señal de fluorescencia obtenida del fotodiodo de avalancha, y una etapa de control que se encargará de controlar el encendido y apagado de los micro-electrodos del chip. La etapa de acondicionamiento cuenta con tres amplificaciones diferentes que nos permitirán

detectar señales de fluorescencia usando diferentes concentraciones molares del fluoróforo. Las amplificaciones son: 6.2x, 12.755x y 405.265x que para una señal sinusoidal de 20 [mV_{p-p}], a una frecuencia de 1 [KHz] presenta un factor de ruido de 5.99 [dB], 5.69 [dB] y 4.13 [dB], respectivamente.

La etapa de control está diseñada para trabajar en lazo abierto, utilizando los parámetros de tiempo de encendido de electrodos y umbral de detección a la entrada. Este circuito fue diseñado para separar como máximo 10000 micro-gotas por segundo, es decir, con una señal de fluorescencia a una frecuencia de 10 [kHz]. El arreglo experimental usado para el cumplimiento de este objetivo, fue calibrado para obtener la máxima respuesta posible. Se observó que aumentando la concentración de fluorescencia, el voltaje pico-pico aumenta de forma lineal en el rango de 1 [μM] a 20 [μM], el cual es un comportamiento deseado. Además, el sistema puede detectar una concentración mínima de fluoresceína de 50 [nM] con un volumen aproximado de 14.13 [pL], usando una potencia del láser de 4 [mW]. El factor de ruido máximo y mínimo encontrado en estas pruebas fueron de -13.7 [dB] y -19.4 [dB].

Durante las pruebas realizadas, se trabajó con una frecuencia de micro-gotas de 24 [Hz] a 116 [Hz]. Para la separación de gotas con fluoresceína observamos que la electrocoalescencia de las micro-gotas aumenta cuando la frecuencia de separación aumenta, esto denota una deficiencia en el diseño del microchip para hacer separación de gotas a altas frecuencias. Por último, el sistema presentó una eficacia del 85.3 % cuando trabajó ininterrumpidamente por 1 [s] y del 48.573 % cuando trabajó por 13.1 [s].

Los dos principales problemas que impiden separar más gotas por segundo en este chip, es la coalescencia de las gotas y la irregularidad en el tamaño y la separación que hay entre una y otra. Sin embargo, el sistema presentado demostró ser un sistema aplicable a diferentes muestras de análisis.

6.2 Trabajo a futuro

El sistema presentado en esta tesis, brinda la posibilidad de realizar trabajo a futuro en varias áreas. En este trabajo no se llevó a cabo la prueba biológica, por lo que la experimentación a realizar con muestras biológicas será trabajo futuro. Entre los principales experimentos referidos a este tema, está la separación de gotas contenedoras de *E coli* para el estudio y evaluación de fármacos.

La implementación de un control de lazo cerrado es, sin duda alguna uno de los siguientes pasos a seguir para continuar el trabajo de esta tesis. Ya que la velocidad de las micro-gotas no permanece constante por lapsos largos, un sistema para la determinación de la velocidad de cada gota es requerido. Por ejemplo, el empleo de las herramientas de análisis de imágenes para procesar aquellas capturadas por la cámara rápida podría permitirnos implementar algoritmos de inteligencia artificial para determinar las velocidades de las gotas, así como calcular la morfología de ellas y, con esto, regular la razón de los flujos de los fluidos modificando los gastos de las bombas de jeringa. Además, está la propuesta de trabajar en un modelo matemático que describa la velocidad de la gota dentro del chip, y que nos permitirá diseñar e implementar un esquema de control más interesante.

Finalmente, la modificación del diseño del chip microfluídico en búsqueda del aumento de la eficacia con la que se separan las gotas, será también trabajo por realizar. Dentro de las posibles modificaciones se encuentra: modificar la geometría para la generación de micro-gotas para mantener una generación constante de micro-gotas; el filtrado mecánico de estas para separar gotas de diferentes tamaños y solo separar gotas con un tamaño similar; cambiar la geometría de los canales de recolección y de desperdicio incluyendo sus respectivas resistencias hidráulicas y así facilitar la separación de las micro-gotas.

Capítulo 7 Anexos

ANEXO 1. Determinación de bacterias dentro cada micro-gota.

Para determinar cuál es la probabilidad de encontrar más de diez bacterias dentro de una micro-gota, necesitamos conocer primero el volumen de cada gota generada dentro del chip.

El diámetro de cada micro-gota es de aproximadamente 30 [μm]. Sabiendo eso, podemos determinar el volumen de cada micro-gota:

$$V = \frac{4}{3}\pi r^3 = \frac{4}{3}\pi(15 \times 10^{-6})^3 = 1.4137 \times 10^{-14} [m^3] = 14.13 [pL]$$

Sabiendo que se utilizará una concentración de $10^9 \left[\frac{ufc}{ml}\right]$, usamos la ecuación de Poisson (3.1) con $\lambda = 14.13 [UFC]$

$$P(X_1 = x_1) = \frac{e^{-14.13} 14.13^{x_1}}{x_1!}$$

Ahora calculamos las probabilidades para cuando $x= 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8$ y 9 .

$$P(X_0 = 0) = \frac{e^{-14.13} 14.13^0}{0!} = 7.3016 \times 10^{-7}$$

$$P(X_1 = 1) = \frac{e^{-14.13} 14.13^1}{1!} = 1.03171 \times 10^{-5}$$

$$P(X_2 = 2) = \frac{e^{-14.13} 14.13^2}{2!} = 7.289 \times 10^{-5}$$

$$P(X_3 = 3) = \frac{e^{-14.13} 14.13^3}{3!} = 3.43316 \times 10^{-4}$$

$$P(X_4 = 4) = \frac{e^{-14.13} 14.13^4}{4!} = 1.212764 \times 10^{-3}$$

$$P(X_5 = 5) = \frac{e^{-14.13} 14.13^5}{5!} = 3.427271 \times 10^{-3}$$

$$P(X_6 = 6) = \frac{e^{-14.13} 14.13^6}{6!} = 8.07122 \times 10^{-3}$$

$$P(X_7 = 7) = \frac{e^{-14.13} 14.13^7}{7!} = 16.29234385 \times 10^{-3}$$

$$P(X_8 = 8) = \frac{e^{-14.13} 14.13^8}{8!} = 28.77635232 \times 10^{-3}$$

$$P(X_9 = 9) = \frac{e^{-14.13} 14.13^9}{9!} = 45.178877314 \times 10^{-3}$$

Por tanto, para saber cuál es la probabilidad de encontrar 10 o más bacterias en cada gota se tiene que:

$$P(x \geq 10) = 1 - [P(X = 0) + P(X = 1) + P(X = 2) + P(X = 3) + P(X = 4) + P(X = 5) + P(X = 6) + P(X = 7) + P(X = 8) + P(X = 9)]$$

$$P(x \geq 10) = 1 - 0.103386 = 0.8966$$

De tal forma que la probabilidad de encontrar 10 o más bacterias dentro de cada gota es de 0.89.

ANEXO 2. Calculo de resistencia hidráulica de canales microfluídicos.

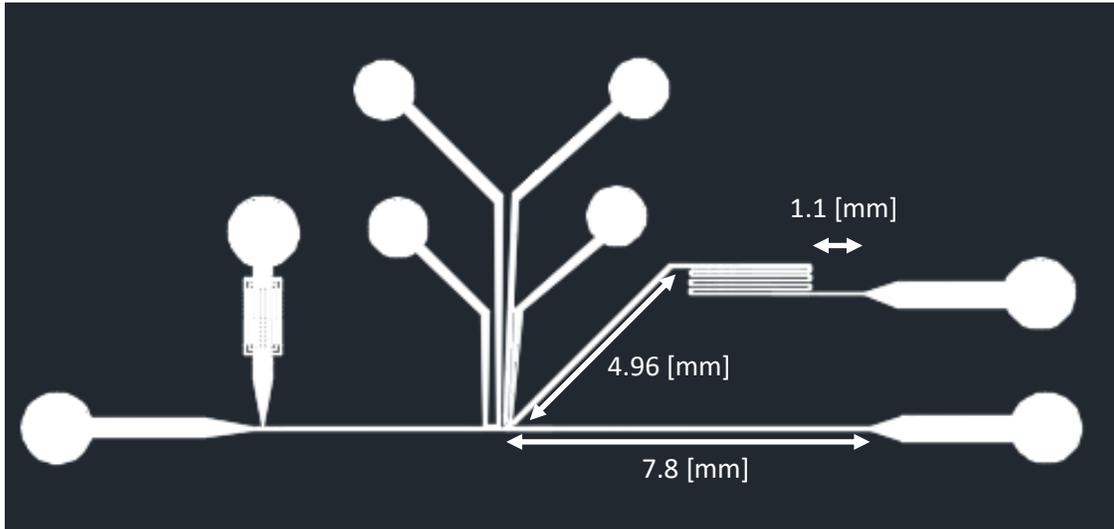


Figura A 1 Mediciones del chip microfluídico

De acuerdo a la figura A.2 mostrada, la longitud total del serpentín es:

$$SL = 2.6 \times 7 + 0.13 \times 6 = 18.98 [mm]$$

Por lo que la longitud total de canal de recolección es:

$$CRL = 4.96 [mm] + 18.98 [mm] + 1.1 [mm] = 25.04 [mm]$$

La longitud del canal de desecho es

$$CDL = 7.8 [mm]$$

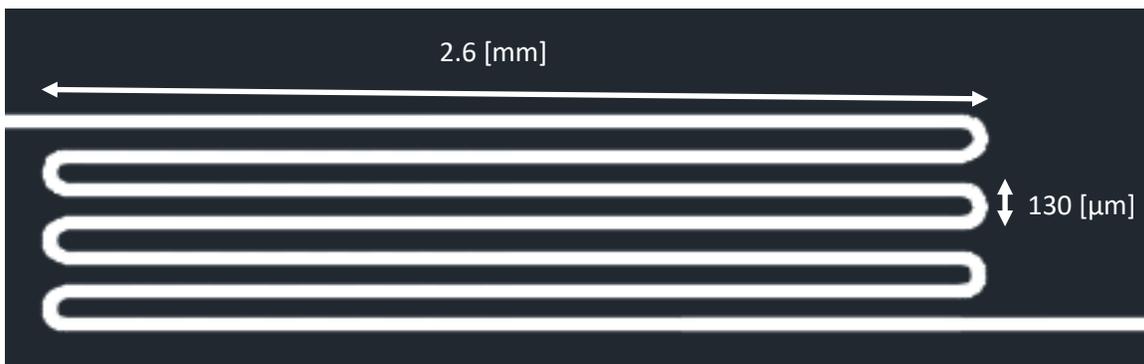


Figura A 2 Medidas del serpentín

El canal de recolección tiene un área de $A = 900 \times 10^{-12} [m^2]$ y un perímetro de $P = 120 \times 10^{-6} [m]$, mientras que el canal de desperdicio tiene un área de $A = 1350 \times 10^{-12} [m^2]$

y un perímetro de $P = 150 \times 10^{-6} [m]$, por lo que usando la ecuación (2.42), calculamos el radio hidráulico de los canales de recolección (r_{hR}) y de desecho (r_{hD}):

$$r_{hR} = \frac{2A}{P} = \frac{(2)(900 \times 10^{-12} [m^2])}{120 \times 10^{-6} [m]} = 15 \times 10^{-6} [m]$$

$$r_{hD} = \frac{2A}{P} = \frac{(2)(1350 \times 10^{-12} [m^2])}{150 \times 10^{-6} [m]} = 18 \times 10^{-6} [m]$$

Para calcular la resistencia hidráulica ocupamos la ecuación (2.41). Sabiendo que la viscosidad dinámica del aceite fluorinado es de $\eta = 0.02 [Pa \cdot s]$, entonces calculamos la resistencia hidráulica del canal de desecho R_{hD} y la resistencia hidráulica del canal de recolección R_{hR} :

$$R_{hD} \cong \frac{8(0.02 [Pa \cdot s])(7.8 \times 10^{-3} [m])}{(18 \times 10^{-6} [m])^2 (1350 \times 10^{-12} [m^2])} = 2.853 \times 10^{15} \left[\frac{Pa \cdot s}{m^3} \right]$$

$$R_{hR} \cong \frac{8(0.02 [Pa \cdot s])(25.04 \times 10^{-3} [m])}{(15 \times 10^{-6} [m])^2 (900 \times 10^{-12} [m^2])} = 19.784 \times 10^{15} \left[\frac{Pa \cdot s}{m^3} \right]$$

Por lo que la resistencia hidráulica del canal de recolección es 6.9 veces mayor que el canal de desperdicio.

ANEXO 3. Simulación numérica del microchip mediante modelado de elemento finito.

Para trazar el comportamiento de las gotas dentro del microchip es necesario poder distinguir cuáles son las principales características que afectarán en su desempeño y uno de los principales factores es la geometría de los electrodos y la de los micro-canales. La simulación de sistemas microfluídicos por medio del modelado de elemento finito es muy recurrida para esto. Así, plantearemos los pasos para poder simular el comportamiento de la micro-gota en el chip con ayuda del software COMSOL Multiphysics 5.0. Los pasos expuestos aquí son basados en la tesis del Ing. Ariel Castillo G. [65].

1. Definición de la geometría en CAD

La geometría a simular será la sección cercana a los micro-electrodos que será tomada del CAD del microchip usado para reinyectar y separar las micro-gotas como se muestra en la figura A3.

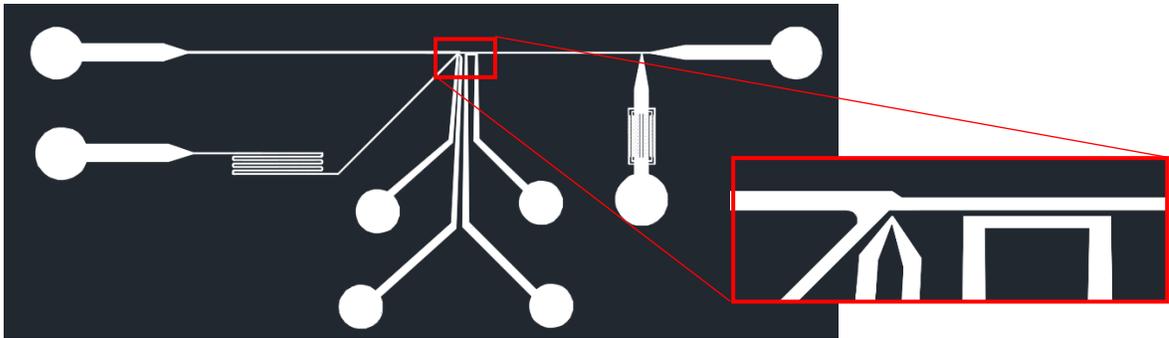


Figura A 3 Microchip de separación

En la figura A4 se muestran las dos geometrías en 3D utilizadas para realizar la simulación en COMSOL Multiphysics 5.0, las cuales se obtuvieron haciendo uso la herramienta extruir en AutoCAD 2015.



Figura A 4 Porción del chip a simular

2. Selección de la física involucrada

Utilizaremos el *Model Wizard* para comenzar el archivo fuente de la simulación.

- En el *Model Wizard* seleccionamos la opción para trabajar con geometrías 3D.
- Añadimos al modelo las interfaces de distribución de la ley de conservación de carga y el flujo de Stokes
 - a) Seleccionar el módulo AC/DC y agregar al modelo la interfaz *Electric Currents (ec)*.
 - b) Seleccionar el módulo *Fluid Flow > Single Phase Flow* y agregar al modelo la interfaz *Creeping Flow (spf)*.
Seleccionamos la opción *Study*.
- Seleccionamos el estudio en estado estacionario y seleccionamos la opción *Done* para finalizar el *Model Wizard*.

3. Definición de parámetros

- Agregar una tabla que contenga los parámetros que se han de usar en la simulación. Para esto damos clic derecho en *Archivo (root) > Global > Definitions* y agregar la opción *Parameters*.
- Abrir un archivo de texto que contiene los parámetros de la tabla A1.

Tabla A 1 Parámetros de simulación

Nombre de Parámetro	Valor [unidad]	Descripción
er_PDMS	2.7	Permitividad R PDMS
er_part	80	Permitividad R Partícula
er_medio	5.8	Permitividad R Medio
cond_PDMS	3.44e-2 [S/m]	Conductividad PDMS
cond_part	0.1 [S/m]	Conductividad Partícula
cond_medio	4.5 [S/m]	Conductividad del Medio
densid_medio	1614 [Kg/m ³]	Densidad del medio
densid_part	2 [kg/m ³]	Densidad de la partícula
densid_PDMS	1000 [kg/m ³]	Densidad del PDMS
visc_PDMS	3.5 [Pa*s]	Viscosidad dinámica PDMS
visc_medio	0.02 [Pa*s]	Viscosidad dinámica medio
diam_part	30e-6 [m]	Diámetro de la partícula

U0	150 [um/s]	Velocidad de entrada al micro-canal
----	------------	-------------------------------------

4. Definición de la geometría.

Para añadir la geometría con la que trabajaremos en la simulación, usar los dos archivos CAD 3D mostrados en el punto 1. Ambos archivos serán correspondientes a dos tipos de materiales diferentes (PDMS y medio).

- Para agregar el CAD del canal microfluídico, dar click derecho en *Archivo (root) > Componente 1 > Geometry 1* y seleccionar la opción *Import*.
- En la opción *Geometry 1 > Import 1* seleccionar las opciones que se muestran en la tabla A2.

Tabla A 2 Parámetros 1

Nombre del parámetro	Valor del parámetro
Geometry import	3D CAD file
Filename	Abrir archivo CAD
Length unit	From CAD document
Objects to import	Solids, Surfaces
Absolute import tolerance	1E-7

- Para agregar el CAD del PDMS hacer los dos pasos anteriores usando el archivo del CAD correcto.

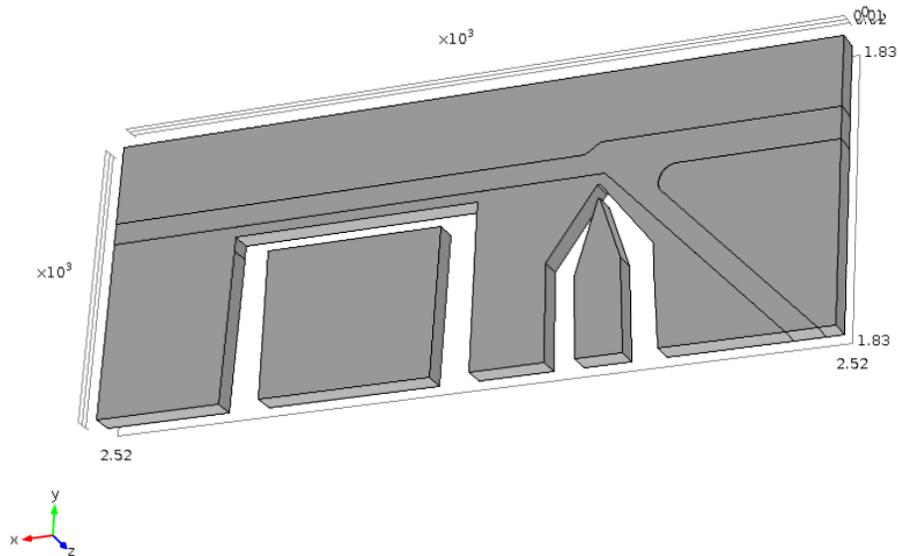


Figura A 5 Inserción de archivo CAD

5. Definición del Material

En este nodo se definen las propiedades del fluido y del PDMS.

- En el nodo *Archivo (root) > Component 1 > Materials* dar click derecho y seleccionar *Blank Material*.
- Dentro de *Material > Material 1* seleccionar el dominio de la figura correspondiente al PDMS como se muestra en la figura A6 y llenar los datos como se muestra en la tabla A3.

Tabla A 3 Parámetros 2

Nombre del parámetro	Valor
Electrical Conductivity	cond_PDMS
Relative Permittivity	er_PDMS
Density	densid_PDMS
Dynamic viscosity	visc_PDMS

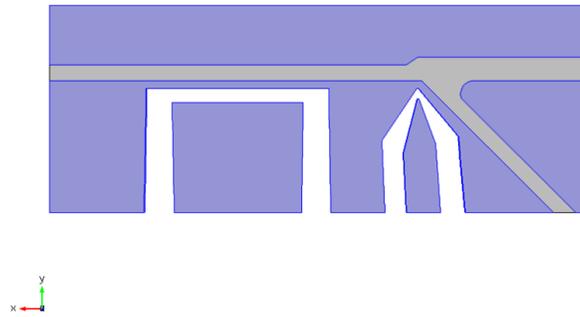


Figura A 6 Dominio PDMS

- Añadir otro material de la misma forma en que se hizo para el PDMS utilizando el dominio mostrado en la figura A7 y llenar los datos requeridos con la tabla A4.

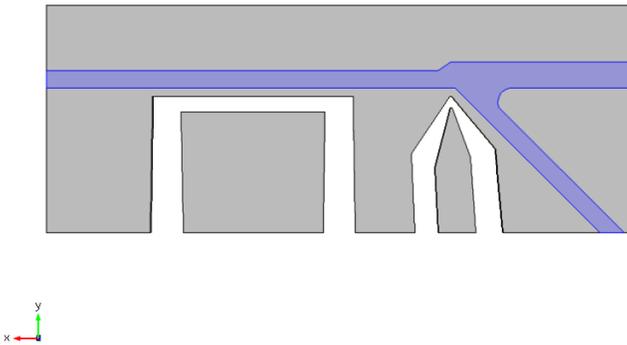


Figura A 7 Dominio micro-canal

Tabla A 4 Parámetros 3

Nombre del parámetro	Valor
Electrical Conductivity	cond_medio
Relative Permittivity	er_medio
Density	densid_medio
Dynamic viscosity	visc_medio

6. Condiciones de frontera.

A continuación se definen las condiciones de frontera necesarias para la solución del transporte de partículas por dielectroforesis por un canal

a) *Electric currents (es)*

En este nodo se definen las relaciones constitutivas, restricciones y condiciones de frontera para la solución de las ecuaciones que modelan la ley de la conservación de la carga.

- *Current Conservation*. Para este nodo se definen las relaciones constitutivas, restricciones y condiciones de frontera para la solución de las ecuaciones que modelan la ley de conservación de carga eléctrica. Lo anterior se define copiando los parámetros de la tabla A5 y seleccionando el dominio de la figura A8 para este nodo.

Tabla A 5 Parámetros 4

Nombre del parámetro	Valor
Material type	Non-Solid
Constitutive relation	Relative permittivity
Relative permittivity	From material

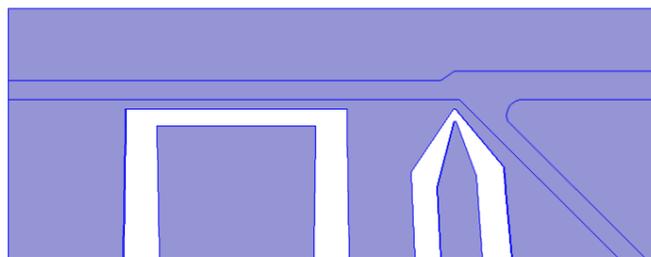


Figura A 8 Dominio conservación de corriente.

- *Electric Potential 1*. En este nodo se define el potencial aplicado al electrodo y así generar un campo eléctrico. Para esto se deberá seleccionar el dominio mostrado en la figura A9 y copiar los valores de la tabla A6.

Tabla A 6 Parámetros 5

Nombre del parámetro	Valor
Electric potential	100

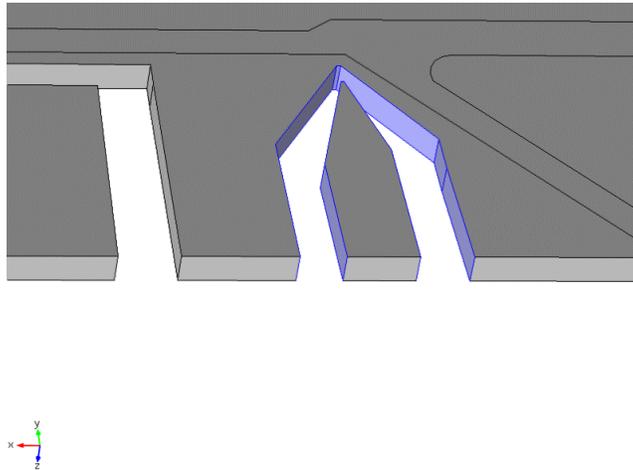


Figura A 9 Electrodo señal

- *Ground 1*. Este es el nodo en donde fijaremos el electrodo de referencia. Para esto, debemos seleccionar el dominio mostrado en la figura A10

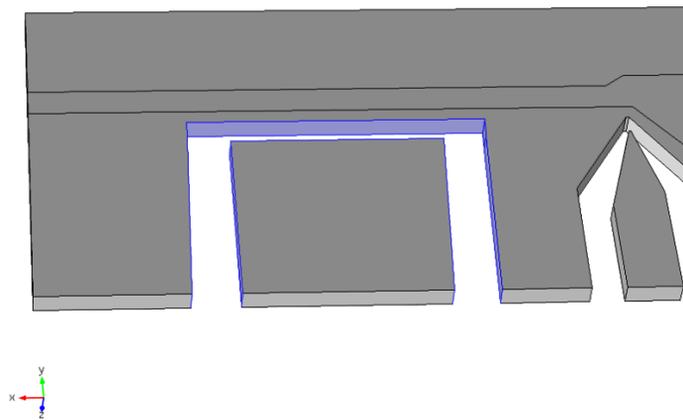


Figura A 10 Electrodo tierra.

b) *Creeping Flow (spf)*

En este nodo se definen las relaciones constitutivas, restricciones y condiciones de frontera para la solución de las ecuaciones que modelan la mecánica de fluidos para un

flujo incompresible y de Stokes. Para esto es necesario indicar que los efectos inerciales de flujo y de cambio densidad del fluido se desprecien.

- *Creeping Flow (spf)*. Para lo anterior, en este nodo se copiarán los valores de los parámetros de la tabla A7 y se seleccionará el dominio mostrado en la figura A11

Tabla A 7 Parámetros 6

Nombre del parámetro	Valor
Compressibility	Incompressible flow
Turbulence model	None
Neglec inercial term (Stokes flow)	YES

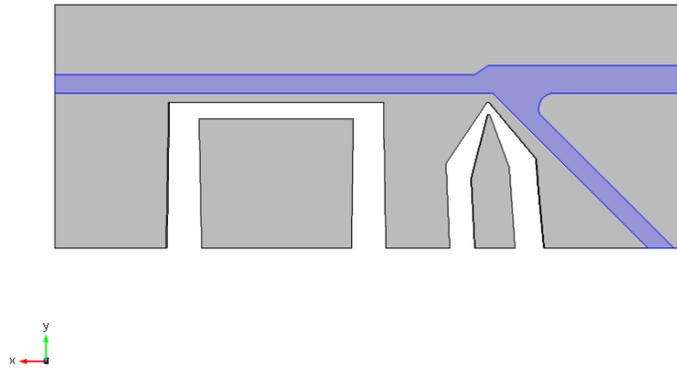


Figura A 11 Dominio Creeping flow

- *Fluid Properties 1*. En este nodo se especifican las relaciones constitutivas para un flujo de Stokes. Para esto se copian los valores de los parámetros de la tabla A8.

Tabla A 8 Parámetros 7

Nombre del parámetro	Valor
Density (ρ)	From material
Dynamic viscosity	From material

- *Wall 1*. En este nodo se establecerá condición de no deslizamiento en las paredes del microcanal copiando el valor del parámetro de la tabla A9.

Tabla A 9 Parámetros 8

Nombre del parámetro	Valor
Boundary Condition	No Slip

- *Inlet 1.* En este nodo se define la frontera de entrada del flujo del microcanal. Para esto seleccionamos el dominio mostrado en la figura A12 y los valores de los parámetros mostrados en la tabla A10.

Tabla A 10 Parámetros 9

Nombre del parámetro	Valor
Boundary condition	Velocity
Velocity	Normal inflow velocity
Uo	U0

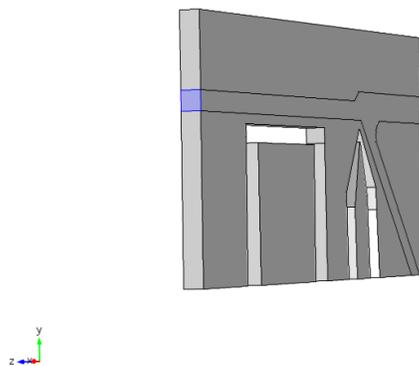


Figura A 12 Dominio de entrada

- *Outlet 1.* En este nodo se especifica la condición de frontera de la salida del flujo del microcanal. Para esto se seleccionan los dominios mostrados en la figura A13 y se copian los valores de la tabla A11.

Tabla A 11 Parámetros 10

Nombre del parámetro	Valor
Pressure	0

Suppress back flow	YES
--------------------	-----

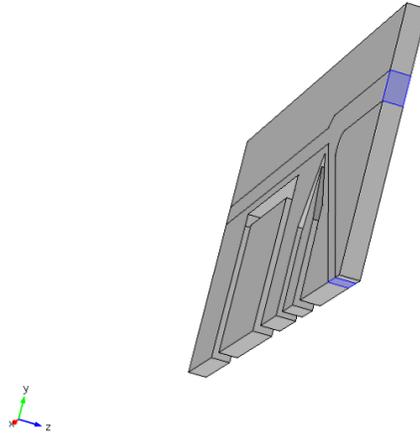


Figura A 13 Dominio de salida

c) *Particle Tracing For Fluid Flow (fpt)*

En este nodo se establecen el seguimiento de las partículas, en las que se ejercen la fuerza de arrastre y la fuerza de dielectroforesis. Para agregar este nodo se realizan los siguientes pasos:

- i) Dar clic derecho en *Archivo (root)* y seleccionar *Add Physics*.
 - ii) Seleccionar *Fluid Flow > Particle Tracing For Fluid Flow* y dar clic en *agregar*.
 - iii) Dar clic derecho en *Archivo (root)* y seleccionar *Add Study*.
 - iv) Seleccionar un *Studio Time dependent* y seleccionar solo que resuelva la física *Particle Tracing For Fluid Flow (fpt)* y dar clic en *Add Study*.
- *Particle Tracing For Fluid Flow (fpt)*. En este nodo copiamos los valores de la tabla A12 y seleccionamos el dominio mostrado en la figura A11.

Tabla A 12 Parámetros 11

Nombre del parámetro	Valor
Formulation	Newtonian
Wall accuracy order	1

- *Wall 1*. En este nodo se define como condición de frontera que cuando una partícula encuentre una pared del micro-canal, esta rebote. Para esto copiamos los valores de la tabla A13.

Tabla A 13 Parámetros 12.

Nombre del parámetro	Valor
Wall condition	Bounce
Primary particle condition	None

- *Particle Properties 1*. En este nodo especificaremos la densidad y el tamaño de las partículas. Para esto copiamos los valores de los parámetros de la tabla A14.

Tabla A 14 Parámetros 13

Nombre del parámetro	Valor
Particle density	densid_part
Particle diameter	diam_part

- *Inlet 1*. En este nodo se especifica que se libere solo una partícula en $t=0$. Para esto se selecciona el dominio de la figura A12 y se copian los valores de la tabla A15.

Tabla A 15 Parámetros 14

Nombre del parámetro	Valor
Release Times	0
Initial position	Density
Number of particles per release	1
Velocity field	Velocity field (spf)

- *Outlet 1*. En este nodo se define la frontera de salida de la partícula. En las salidas, las partículas se congelan para determinar su posición final. Para esto seleccionamos el dominio mostrado en la figura A13 y copiamos los valores de la tabla A16.

Tabla A 16

Nombre del parámetro	Valor
----------------------	-------

Wall condition	Freeze
----------------	--------

- *Drag Force*. En este nodo se define la fuerza hidrodinámica en la partícula generada por arrastre. Para esto se selecciona el dominio mostrado en la figura A11 y se copian los valores de la tabla A17.

Tabla A 17 Parámetros 16

Nombre del parámetro	Valor
Drag law	Stokes
Velocity field	Velocity field (spf)
Dinamic viscosity	From material

- *Dielectrophoretic Force 1*. En este nodo se define la fuerza de dielectroforesis generada en cada partícula. Para esto se copian los valores mostrados en la tabla A18.

Tabla A 18

Nombre del parámetro	Valor
Specify force using	Electric field
Electric field	Electric Field (es/ccn1)
Particle relative permittivity	er_part
Particle electrical conductivity	cond_part
Relative permittivity	From material
Electrical conductivity	

7. Mallado.

En este paso se fijarán las características del mallado utilizado para resolver el modelo. Se realiza el mallado controlado por la física involucrada que está por defecto, por lo que solo se seleccionará la opción *Build all* y tendremos un resultado similar a la figura A14.

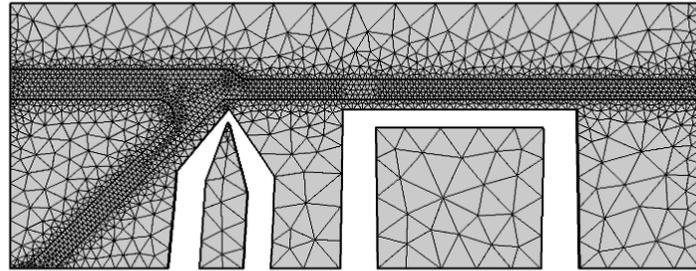


Figura A 14 Mallado del modelo

8. Estudios

Los resultados provienen de dos diferentes estudios: un estudio estacionario que dará como resultado el campo de velocidades y el campo eléctrico dentro del microcanal y un estudio dependiente del tiempo que calculará las fuerzas de arrastre y de dielectroforesis en los distintos nodos del mallado.

a) Estudio 1: *Stationary study*

Para realizar este estudio tenemos que excluir la física *Particle tracing for fluid flow (fpt)*, esto se hace copiando los valores de la tabla A19 y posteriormente dando clic en la opción *Compute*.

Tabla A 19

Nombre del parámetro	Valor
Electric currents (ec)	YES
Creeping flow (spf)	YES
Particle tracing for fluid flow (fpt)	NO

b) Estudio 2: *Time Dependent study*

En este estudio se obtendrá la trayectoria de la partícula dentro del microcanal haciendo uso del campo de velocidades y el campo eléctrico obtenido en el estudio

estacionario. Para esto copiamos los valores de la tabla A20 y después damos clic en *Compute*.

Tabla A 20

Nombre del parámetro	Valor
Time unit	s
Times	Range(0,0.1,7)
Electric Currents (ec)	NO
Creeping flow (spf)	NO
Particle tracing for fluid (fpt)	YES
Values of dependent variables	Select
Values of variables not solved for	YES
Method	Solution
Study	Study 1, Stationary
Selection	Automatic

9) Grupo de gráficas.

- Potencial Eléctrico

Root > Results > Electric potential (es)

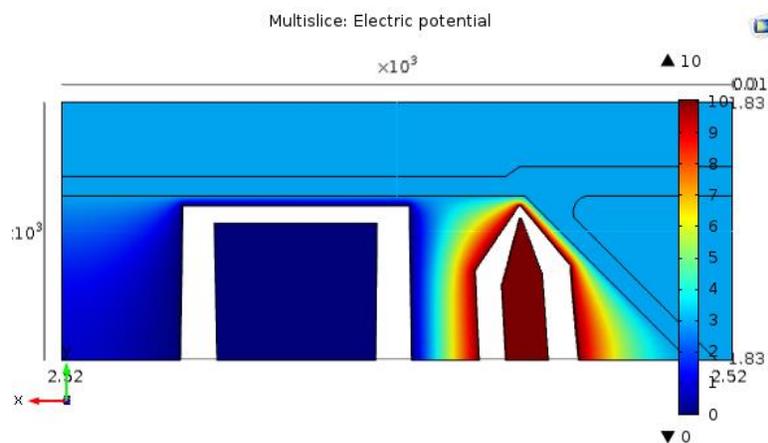


Figura A 15 Potencial Eléctrico

- Campo eléctrico

Root > Results > 3D Plot Group > Streamline 1 > Expression > es.Ex, es.Ey, es.Ez.

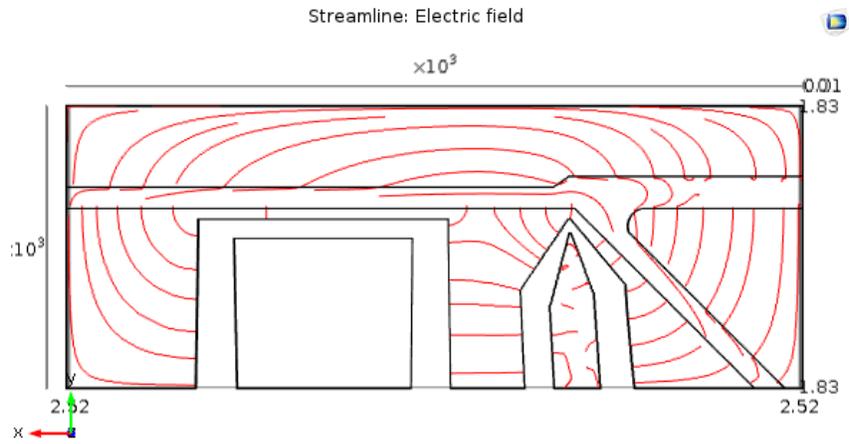


Figura A 16 Campo eléctrico

- Campo de velocidad

Root > Results > Velocity (spf)

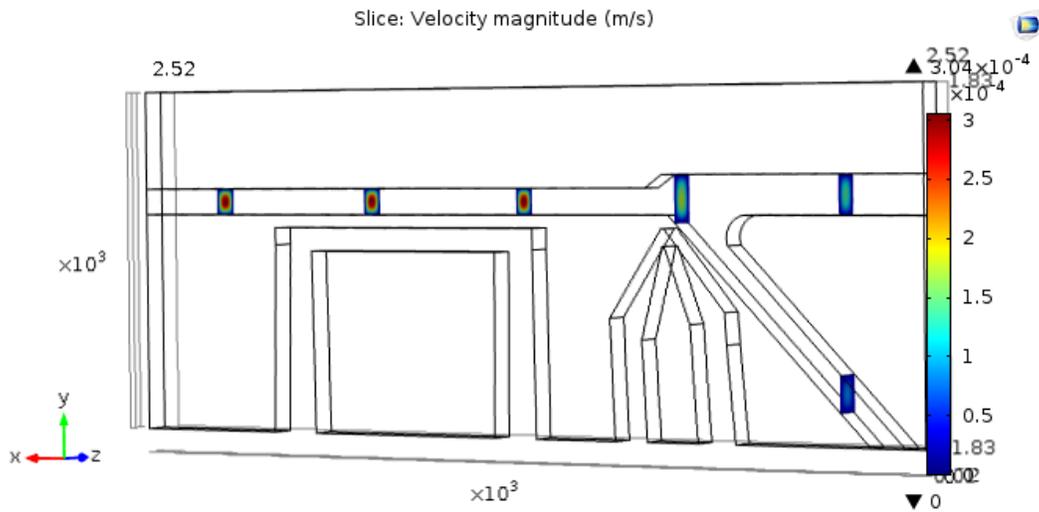


Figura A 17 Campo de velocidades.

- Magnitud de campo eléctrico

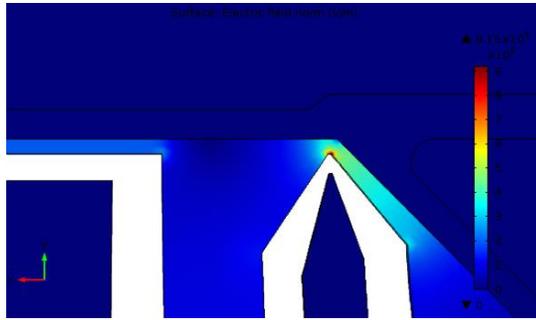


Figura A 18 Norma de campo eléctrico

- Trayectoria de la partícula

Root > Results > Particle Trajectories (fpt) > Particle trajectories 1

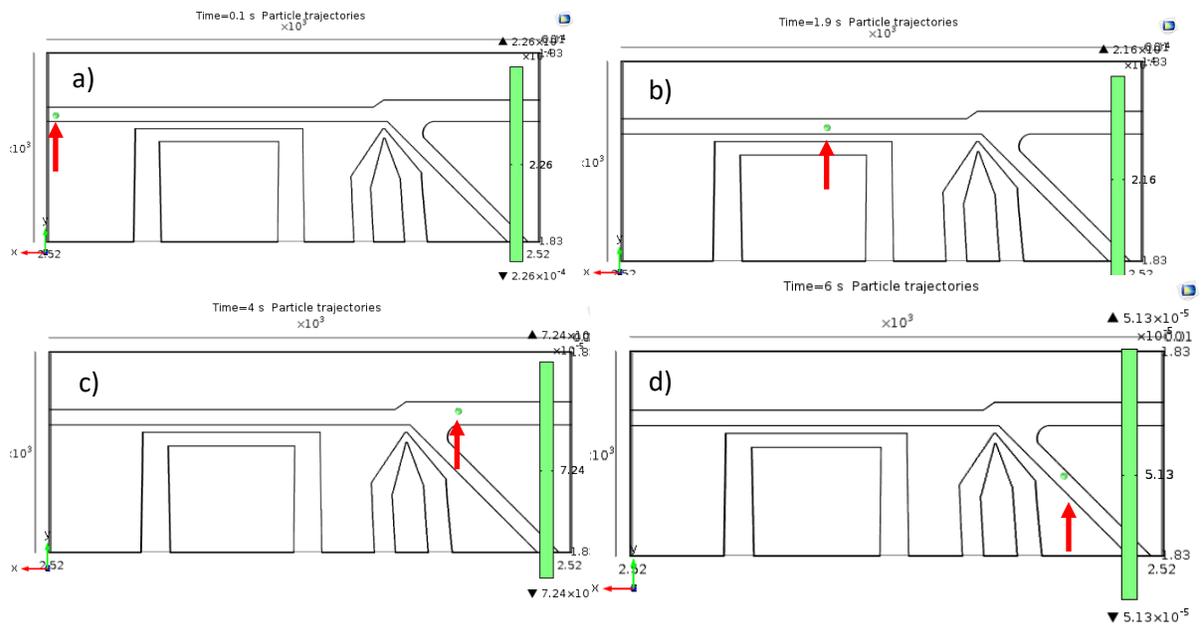


Figura A 19 Trayectoria de las partículas. A), B) y C) con los electrones no polarizados y D con los electrodos polarizados

Anexo 4. Fabricación usando la técnica de fotolitografía

- Preparación de superficie

Para preparar la superficie es necesario limpiar los sustratos que se usarán como molde maestro. Esta limpieza es indispensable en la adherencia de las estructuras al sustrato. El sustrato usado es una oblea de silicio pulida de orientación <100> con un diámetro de 76.2 [mm] El protocolo seguido se describe en el *Anexo 6* y se llevó a cabo a 19 [°C] con una humedad relativa del 45%. Una vez limpia la superficie, se coloca sobre un plato caliente (THERMO Scientific) 15 [min] a 160 [°C].

- Depósito de resina fotosensible

Usando la resina SU82015 (MICRO-CHEM) realizamos el depósito de la resina en un plato giratorio (LAUREL modelo WS-650MZ-23NPP) para lograr un depósito homogéneo a lo largo de todo el sustrato, empleando el siguiente programa, donde el primer paso se emplea para expandir la resina en el sustrato y el segundo para alcanzar el espesor deseado de 30 [µm]:

Programa del plato giratorio: 1. Girar a 500 [rpm] con aceleración de 100 durante 10 [s]
2. Girar a 1300[rpm] con aceleración de 300 durante 30 [s]

- Cocido suave

En este paso la resina adquiere una mayor adherencia al sustrato. Se coloca el sustrato en el plato caliente a 105 [°C] durante 5 [min]. Posterior a este proceso, se coloca el sustrato en una superficie limpia a temperatura ambiente durante 5 [min].

- Exposición

Para transferir el patrón del chip deseado usando el equipo *Intelligent Micro Patterning's SF-100 Maskless Photolithography System*, se utiliza una máscara digital, que es previamente dibujada en algún CAD, la cual es enviada de la PC al sistema *Smart Filter*. Este, con ayuda de una lámpara ultravioleta, proyecta el patrón sobre el sustrato usando micro-espejos (DMD) como se muestra en la figura A20. Modificando el tiempo de exposición de luz sobre la resina fotosensible, modificamos la cantidad de energía irradiada sobre el sustrato. También, se hace uso de un filtro paso altas para eliminar la radiación UV debajo de los 350 [nm]. El tiempo de exposición usado es de 3.1 [s]. Al ser una resina negativa, los enlaces de las partes expuestas a la luz son fortalecidos.

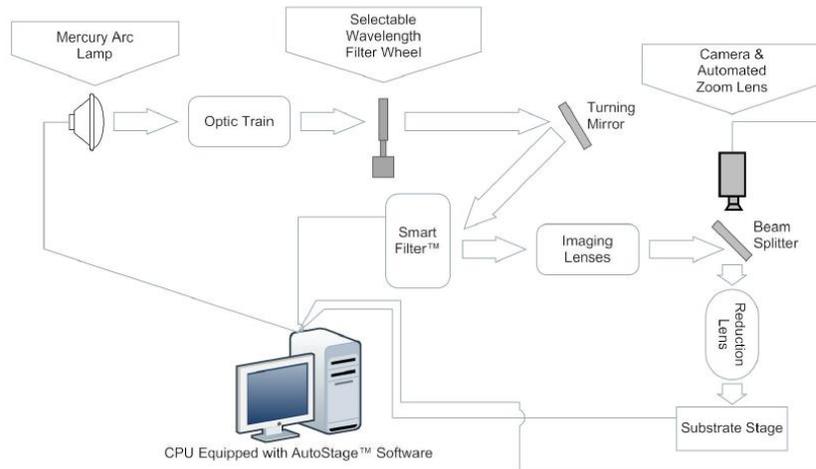


Figura A 20. Diagrama a bloques del sistema de fotolitografía SF-100

- Post Cocido

Este paso se realiza inmediatamente después de la exposición del patrón y sirve para proveer energía a la resina para completar las reacciones comenzadas en la exposición ultravioleta. Se coloca el sustrato en un plato caliente a 105 [°C] durante 5:30 [min].

- Revelado

En este proceso se remueve la resina cuyos enlaces no fueron fortalecidos durante el paso de exposición. Se sumerge la oblea de silicio en revelador SU8 (MICRO-CHEM) y se coloca sobre un agitador (VORTEX GENIE 2) durante 8 [min]. Posteriormente el sustrato es soplado con nitrógeno para quitar residuos de revelador.

- Cocido duro

Para mejorar el fortalecimiento de enlaces del modelo final, se coloca el sustrato en un plato caliente a 200 [°C] por 20 [min].

- Inspección del modelo final

Esta inspección será para corroborar que las estructuras de SU8 2015 no tengan defectos ni mal formaciones y que la altura aproximada de los microcanales sea de 30 [µm]. Para observar que las estructuras no tengan defectos, colocamos la oblea en el equipo SF-100 y con ayuda de la visualización de la cámara del equipo, revisamos que las estructuras se encuentren en buen estado.

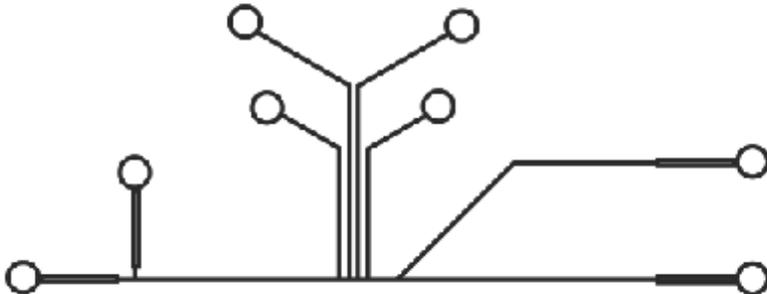
Debido a que no se contaba con el acceso al perfilómetro antes de realizar réplicas de PDMS (ver *Anexo 5*) la medición de la altura de las estructuras de SU8 se midieron indirectamente usando una réplica de PDMS (ver *Anexo 7*), donde la altura fue de 28.32 ± 4.62 [μm].

Anexo 5 Pruebas de perfilometría en réplicas de PDMS Sylgard 184.

	ENTREGA DE RESULTADOS REPORTE	
	TIPO DE SERVICIO CARACTERIZACIÓN	Folio: 2017-02-C-01c
		

Generó	 <hr/> Diego Zamarrón Hernández Operador que realizará el servicio	Aprobó	 <hr/> Mathieu Hautefeuille Responsable del LaNSBioDyT
---------------	---	---------------	---

Fecha: 09-Feb-2017

Descripción del servicio
Caracterizar la profundidad de los canales de una réplica de PDMS sylgard 184 de un molde maestro de SU-80 con profundidad aproximada de 30 μm . Se realizarán 5 mediciones en diferentes lugares de la estructura para obtener un valor promedio de la profundidad.
Muestra/Diseño

Figura 1. Diagrama del diseño de canales del bloque de PDMS recibido.

Página 1 de 3

2017-02-C-02c

	ENTREGA DE RESULTADOS REPORTE	
	TIPO DE SERVICIO CARACTERIZACIÓN	Folio: 2017-02-C-01a
	LaNSBioDyT LABORATORIO NACIONAL DE SOLUCIONES BIOMIMÉTICAS PARA DIAGNÓSTICO Y TERAPIA	
		Formulario LANSBIOF-11-03-0 Fecha de 1° emisión: 09/Nov/2016 No. de Revisión: 6 Fecha de emisión: 12/Septiembre/ 2018

3. Detalles de la muestra/diseño

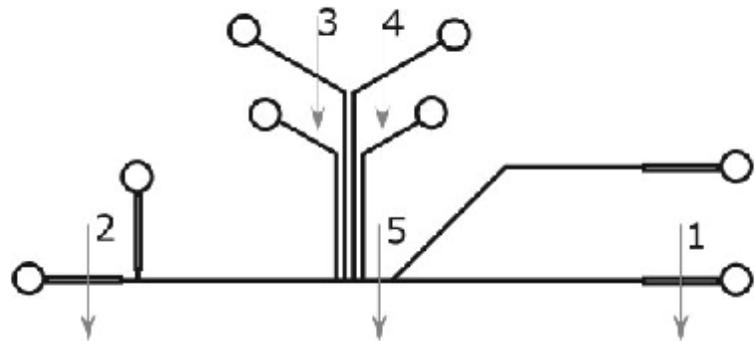


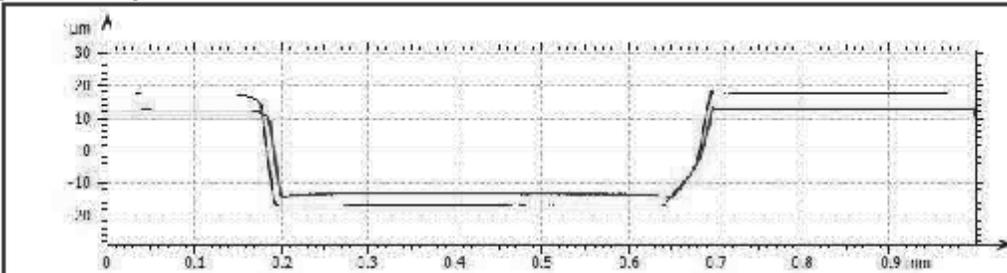
Figura 2. Diagrama de órbita y en qué dirección se tomaron los perfiles.

Se tomaron dos series de perfiles con dos fuerzas diferentes, con la primera (2 mg) la punta apenas llegó a rozar la superficie del fondo de los canales, con la segunda fuerza (5 mg) la punta sí llegó al fondo del canal.

Figura 2

Perfil	Medición 1 [μm]	Medición 2 [μm]
1	23.95	34.44
2	22.88	34.04
3	24.04	34.71
4	25.03	34.85
5	20.81	28.84
Promedio	23.70	32.94

	ENTREGA DE RESULTADOS REPORTE	
	TIPO DE SERVICIO CARACTERIZACIÓN	Folio: 2017-02-C-01e
	LaNSBioDyT LABORATORIO NACIONAL DE SOLUCIONES BIOMIMÉTICAS PARA DIAGNÓSTICO Y TERAPIA	Formas LANBIOF-11-03-c Fecha de 1° emisión: 08/Mar/2016 No. de Revisión: 6 Fecha de emisión: 12/Septiembre/ 2018

Observaciones			
<p>Se tomaron las dos series ya que al entrar en contacto la punta del perfilómetro con el material, éste se deforma y la medición ya no es confiable, entonces al tener una medición spanas rozando la superficie y otra con contacto se pueda asumir que la medida real debe estar entre esos dos valores.</p>			
			
<p>Figura 3. Comparación de dos perfiles tomados en el mismo sitio con diferentes fuerzas.</p>			
<p>Todos los perfiles se obtuvieron con el perfilómetro KLA Tencor D-600 con las siguientes configuraciones:</p>			
Velocidad	0.10 mm/s	Escala	100 μ m
Longitud	1 mm	Fuerza	2 y 5 mg
Modo	Step Up/Step Down	Puntos de promedio	8
<p>En la <u>carpeta de entregables</u> se encuentran todos los perfiles obtenidos en formato .txt y las tablas con los datos obtenidos y las imágenes que se anexaron a este reporte.</p>			

Anexo 6. Limpieza de sustratos para fotolitografía

El siguiente protocolo es utilizado para limpiar los sustratos utilizados en la fabricación por medio de fotolitografía.

- Con ayuda de un nivel de agua, revisar que el plato giratorio (*spin coating*) esté en un nivel adecuado para su uso.
- Colocar el sustrato sobre el chock del plato giratorio y alinear el sustrato con ayuda de un alineador.
- Prender el tanque de nitrógeno, la bomba de vacío y presionar la tecla *Vacío* en el teclado del plato giratorio.
- Verter acetona sobre la superficie del sustrato hasta cubrirlo por completo, cerrar la tapa del plato giratorio y con ayuda del programa de limpieza abajo descrito, dar inicio al proceso de limpieza del sustrato. Una vez terminado el proceso para la acetona, hacer el mismo proceso usando isopropanol.
 1. Duración: 10 [s], Velocidad: 500 [rpm],
Aceleración: 100 [rpm]
 2. Duración: 30 [s], Velocidad: 1500 [rpm],
Aceleración: 300 [rpm]
- Limpiar la superficie del sustrato usando nitrógeno.
- Tomar el sustrato del plato giratorio oprimiendo de nuevo la tecla *Vacío* y colocarlo en una parrilla a una temperatura de 150°C durante 15 min.
- Cerrar tanque de nitrógeno y apagar bomba de vacío.

Anexo 7. Fabricación de réplicas por litografía suave.

La técnica de litografía suave es empleada para la transferencia de patrones desde un molde maestro a polímeros y es contada dentro de las técnicas básicas para la elaboración de chips microfluídicos.

Para la elaboración del chip utilizaremos el polímero PDMS (SYLGARD 184 Silicone elastomer kit) y los pasos a seguir son los siguientes:

1. Limpieza del molde maestro como se describe en el *Anexo 8*.
2. Calcular el volumen de polímero requerido y obtener su equivalente en gramos.
3. Usando una balanza de precisión (PIONER OHAUS), colocar en un vaso de precipitados la masa de polímero base y agente curante, siguiendo una relación de 10 a 1 en ese orden y mezclarlos durante 5 min.
4. Colocar la mezcla dentro de una campana de vacío durante 20 min para desgasificar el ambiente y quitar las burbujas formadas en el polímero.
5. Verter el polímero en el depósito donde está el molde maestro y desgasificarlo nuevamente por 30 [min] para quitar las burbujas del polímero.
6. Colocar el molde maestro en el horno de convección por 2 horas para que el PDMS polimerice.
7. Retirar el PDMS del horno y con ayuda de una hoja de navaja, recortar la porción del chip deseada del molde maestro.
8. Realizar los orificios que servirán como entradas y salidas de los micro-canales en el chip.
9. Limpiar el PDMS usando cinta adherible para remover pelusas y virutas de polímero. Así mismo, para limpiar el porta objetos destinado como sustrato siguiendo los pasos descritos en el *Anexo 6*.
10. Usando la pistola de descarga de efecto corona (BD 20AC Laboratory Corona Treater), aplicar una descarga durante 30 [s] al PDMS y otra de 1 [min] al sustrato e inmediatamente después unir ambas superficies procurando que no formen burbujas de aire entre ambas.

11. Colocar el chip dentro del horno de convección durante 5 horas.
12. Revisar que el chip no tenga fugas.

Anexo 8. Limpieza de sustratos para litografía suave

El siguiente protocolo es para limpiar los portaobjetos usados como sustratos en la litografía suave.

- Tomar un portaobjetos y limpiarlo con aire comprimido en su superficie para quitar entidades sólidas adheridas débilmente a él.
- Tomar un cristalizador limpio y colocar el portaobjetos dentro de este.
- Verter acetona dentro del cristalizador hasta que el portaobjetos quede cubierto por ella.
- Colocar el cristalizador dentro del baño ultrasónico por 5 min.
- Vaciar la acetona del cristalizador en el depósito de desperdicios y llenar el cristalizador con isopropanol hasta cubrir el portaobjetos.
- Colocar el cristalizador dentro del baño ultrasónico por 5 min.
- Vaciar el isopropanol del cristalizador en el depósito de desperdicios y llenar el cristalizador con agua desionizada hasta cubrir el portaobjetos.
- Colocar el cristalizador dentro del baño ultrasónico por 5 min y después vaciar el contenido del cristalizador en el depósito de desperdicios.
- Secar el portaobjetos con aire comprimido para quitar las gotas de su superficie.
- Color el portaobjetos dentro de un horno de convección por 30 min a una temperatura de 60°C.

Anexo 9. Fabricación de electrodos

- Examinar que el chip microfluídico en el cual se formarán los electrodos se encuentre en buen estado (sin fugas, con los micro-canales bien definidos y sin discontinuidades), de lo contrario preparar otra chip.
- Colocar replica en parrilla (CORNING Laboratory Hot Plate, Model PC200) y ajustar perilla en nivel 3.5 (180°C).
- Con ayuda de una jeringa de 1mL (BD Plasticpak) succionar soldadura de bajo punto de fusión (INDALLOY #19 Indium Corporation) con tubería calibre #24.
- Colocar la salida de la tubería a la entrada del micro-canal del electrodo e inyectar lentamente la soldadura hasta que esta salga del otro lado del canal.
- Repetir los dos pasos anteriores haciéndolo esta vez a la salida de los electrodos.
- Quitar el sustrato de la parrilla y dejar enfriar la soldadura.
- Inspeccionar electrodos en el microscopio y revisar la continuidad de ambos electrodos con un multímetro.

Anexo 10 Filtros Analógicos
Circuito *Sallen and Key* [66]

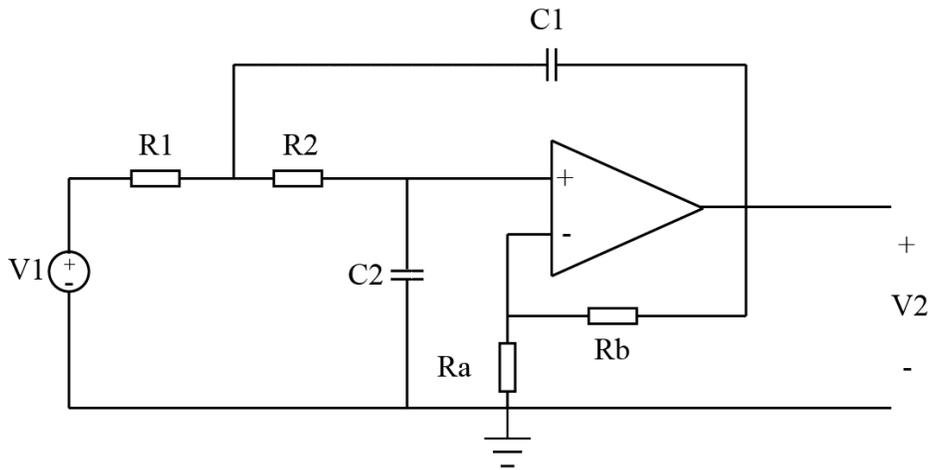


Figura A 21 Circuito *Sallen and Key*

El circuito mostrado en la figura A21 fue descrito en 1955 por *Sallen* y *Key*, en el *MIT's Lincoln Laboratory* y se describe con la siguiente función de transferencia:

$$T(s) = \frac{V_2}{V_1} = \frac{K/R_1R_2C_1C_2}{s^2 + \left(1/R_1C_1 + 1/R_2C_1 + 1/R_2C_2 - K/R_2C_2\right)s + 1/R_1R_2C_1C_2}$$

De forma general, la función de transferencia se escribe como

$$T(s) = \frac{V_2}{V_1} = \frac{Kw_0^2}{s^2 + (w_0/Q)s + w_0^2}$$

El filtro tiene una atenuación de -40dB/década.

- Filtro paso bajas

Se requiere que el filtro sea de segundo orden y en una configuración no inversora. Por lo que se calculará el filtro usando la configuración mostrada en el esquema de la figura A22, con una frecuencia de corte de $f_c = 60$ [KHz].

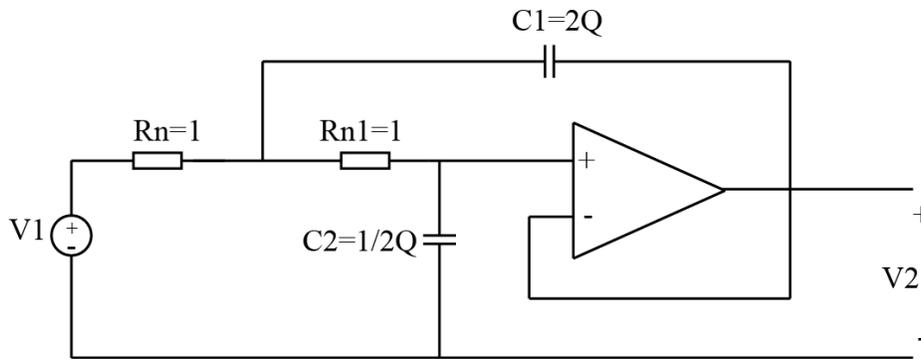


Figura A 22 Filtro paso bajas no inversor.

Normalizamos los valores de tal manera que $w_0 = 1$, lo que reduce la especificación de los valores de los componentes a simplemente el valor del factor de calidad Q . Elegimos que la ganancia sea $K=1$ y que $R_1 = R_2 = 1$. Aplicando estas relaciones a la ecuación de transferencia, surgen dos condiciones:

$$\frac{2}{C_1} = \frac{1}{Q} \quad y \quad C_1 C_2 = 1$$

De estas ecuaciones encontramos que

$$C_1 = 2Q \quad y \quad C_2 = \frac{1}{2Q}$$

Como es un filtro de orden $n=2$, los polos los determinamos de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla A 21 Orden del filtro y los polos relacionados

n=2	n=3	n=4	n=5
-0.7071068	-0.5	-0.3826834	-0.809017
$\pm j0.7071068$	$\pm j0.8660254$	$\pm j0.9238795$	$\pm j0.5877852$
	-1	-0.9238795	-0.309017
		$\pm j0.3826834$	$\pm j0.9510565$
			-1

Así los polos del filtro son:

$$\rho_1, \bar{\rho}_i = -0.7071068 \mp j0.7071068$$

Dado que los polos se representan como

$$\rho_1, \bar{\rho}_i = -\cos\psi \mp j \operatorname{sen}\psi$$

Y además n es par, los ángulos de los polos son:

$$\psi = \mp 45^\circ$$

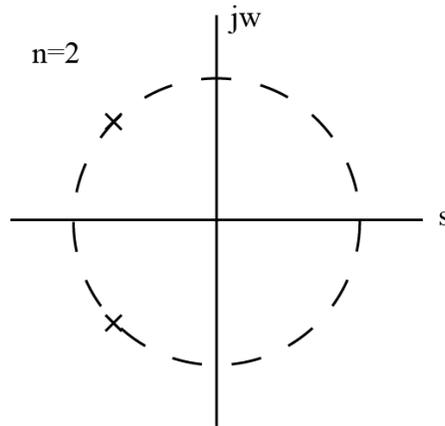


Figura A 23. Localización de polos

Ahora para calcular el factor de calidad del filtro, usaremos

$$Q = \frac{1}{2\cos\psi}$$

$$Q = \frac{1}{2\cos(45^\circ)} = 0.7071068$$

Necesitamos calcular los valores de los factores k_f y k_m como sigue:

$$k_f = 2\pi f_c$$

$$k_f = 2\pi \left[\frac{1}{\text{Hz}} \right] (60[\text{KHz}]) = 376991.1184$$

Si queremos fijar las resistencias a 10[KΩ], entonces:

$$k_m = \frac{R}{1[\Omega]} = 10^4$$

Con los valores de Q, ahora calculamos los valores de los capacitores en la siguiente tabla:

$$C_{new} = \frac{1}{k_f k_m} C_{old}$$

Tabla A 22 Valor de capacitores 1

C_{old}	C_{new}
2Q	375 [pF]
1/2Q	187 [pF]

- Filtro paso altas

Para diseñar el filtro paso altas de segundo orden, se seguirá un procedimiento parecido al del filtro paso bajas, solo que ahora, las resistencias serán cambiadas por capacitores y viceversa. El esquema se muestra a continuación.

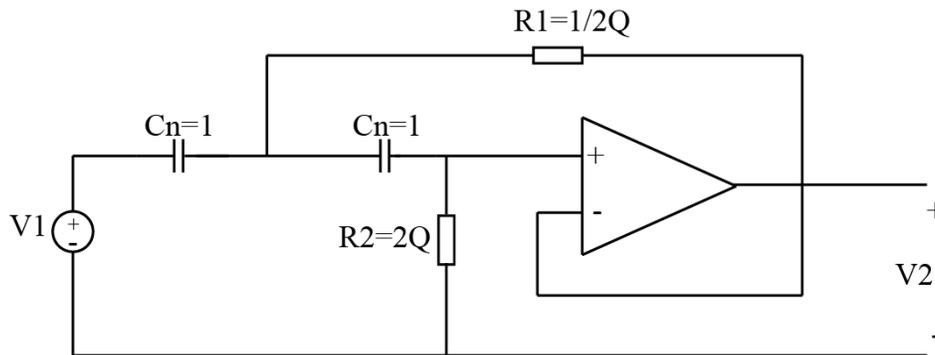


Figura A 24 Filtro paso altas no inversor.

En este caso las capacitancias tomarán el valor de $C_n = 1$ y el factor $k_m = 31830.98$. Además las resistencias se calcularán como:

$$R_{new} = k_m * R_{old}$$

Tabla A 23 valor de resistencias 1

R_{old}	R_{new}
$1/2Q$	2.2[kΩ]
$2Q$	45[kΩ]

Ambos filtros se implementarán usando un amplificador TL084, cuyo ancho de banda se encuentra dentro del rango de frecuencias requerido como se muestra en las gráficas mostradas abajo.

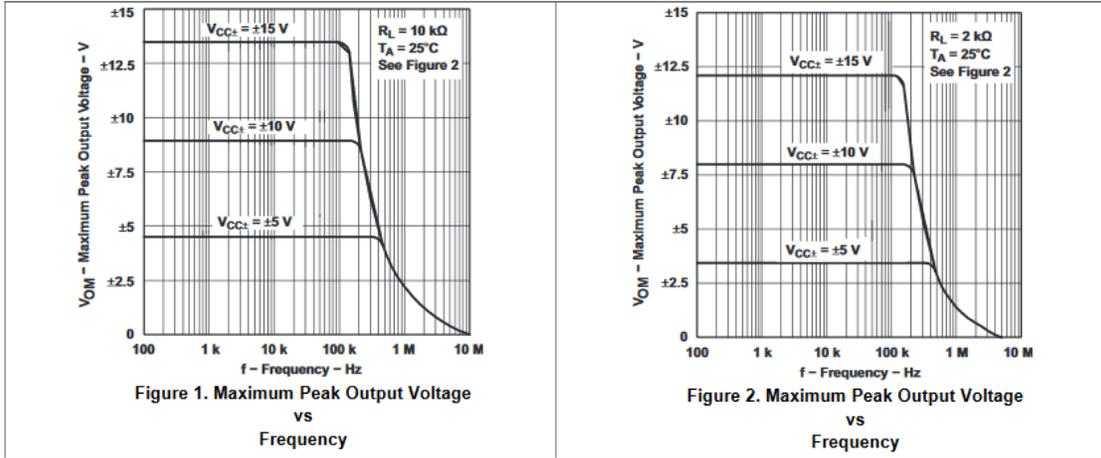


Figura A 25 Gráfica pico máximo de voltaje vs frecuencia del amplificador t1084

Anexo11 Programa de Matlab para generar los diagramas de Bode

Para el filtro paso altas

$$T(s) = \frac{V_2}{V_1} = \frac{s^2}{s^2 + 14.21338s + 101.01}$$

```
H = tf([1 0 0],[1 14.21338 101.01]);  
bode(H)
```

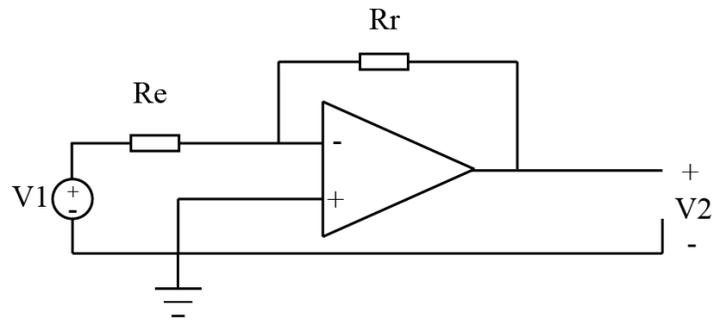
Para el filtro paso bajas

$$T(s) = \frac{V_2}{V_1} = \frac{1.421223034 \times 10^{11}}{s^2 + 533145.9384s + 1.421223034 \times 10^{11}}$$

```
H = tf([1.1421223034e11],[1 533145.9384 1.1421223034e11]);  
bode(H)
```

Anexo 12 Circuito de Amplificación

Para amplificar la señal utilizamos un amplificador operacional TL084 en configuración inversora.



La resistencia $R_E = 1[k\Omega]$, pero la resistencia de R_R no será un valor fijo

$$\frac{V_2}{V_1} = -\frac{R_R}{R_E}$$

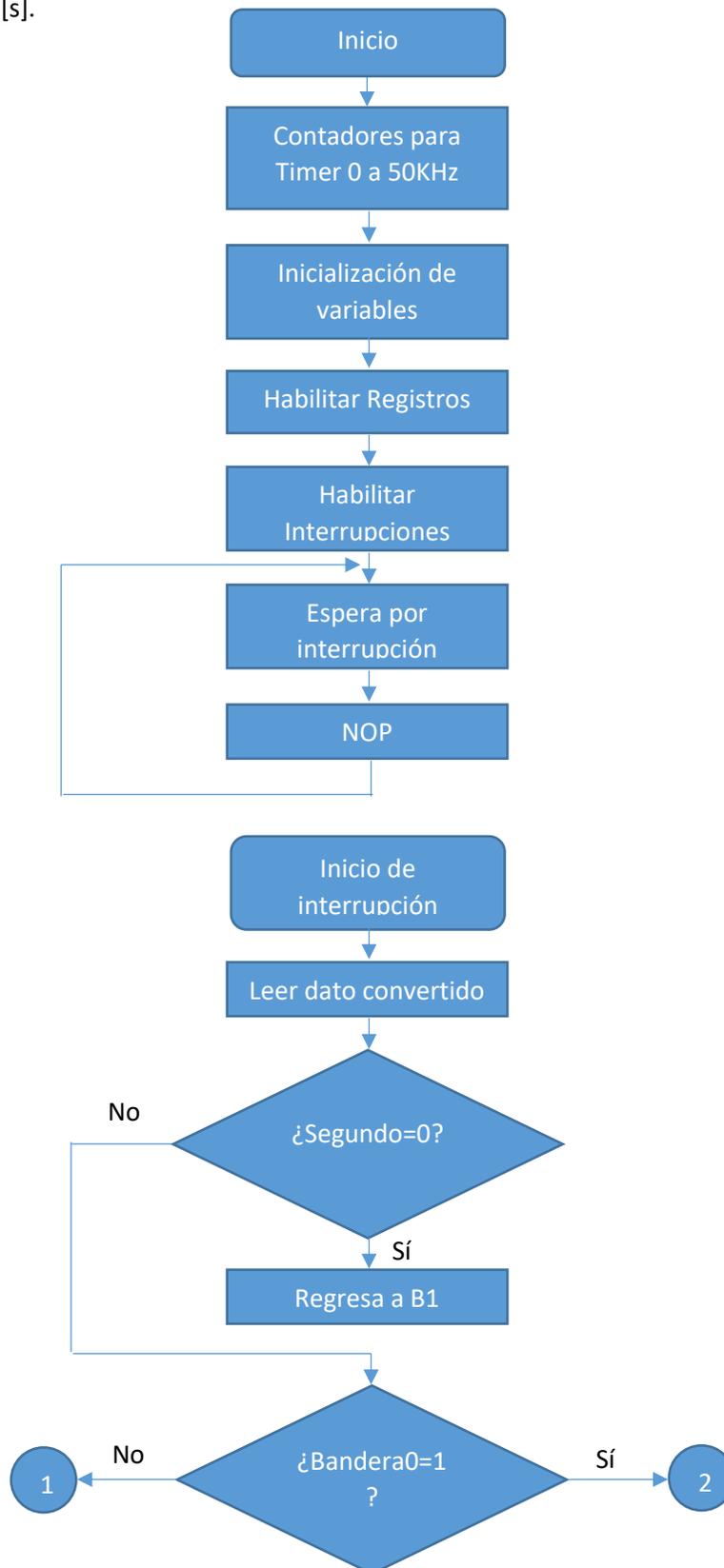
Anexo 13 Etapa de acondicionamiento

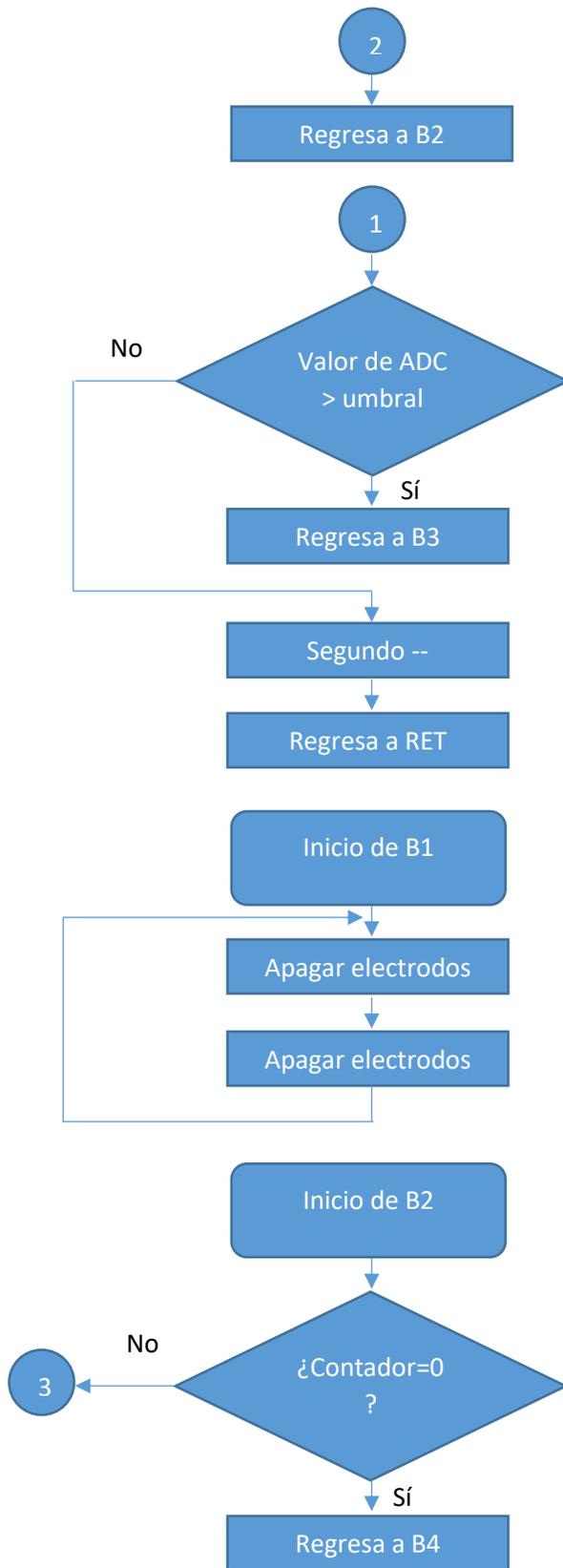
Tabla A 24 Etapa de acondicionamiento

Amplificación x	Voltaje p-p [V]	Amplificación Salida x	Entrada		Salida		(S/R)entrada	(S/R)salida	10log(F)
			Potencia Señal [w]	Potencia Ruido[w]	Potencia Señal [w]	Potencia Ruido [w]			
4.7	0.124	6.2	40120	3085	881600	12200	13.00486224	72.2622951	5.99332247
10	0.2551	12.755	4.00E+04	2797	3.96E+06	3.71E+04	14.30103683	106.627155	5.69744986
330	8.1053	405.265	4.01E+04	6762	4.33E+09	5.87E+07	5.933155871	73.8789429	4.13849185

Anexo 14 Algoritmos del programa en el DSP

Algoritmo para 1[s].

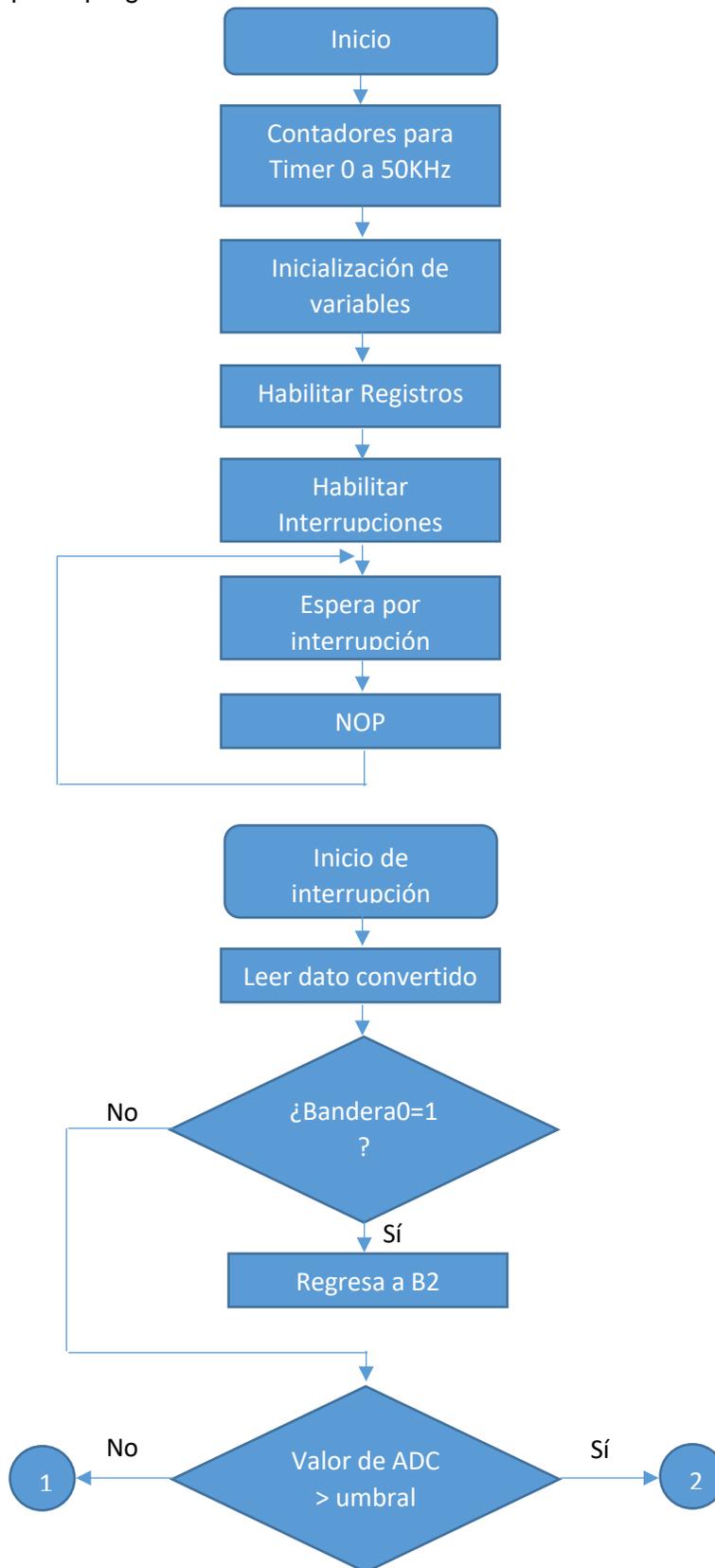


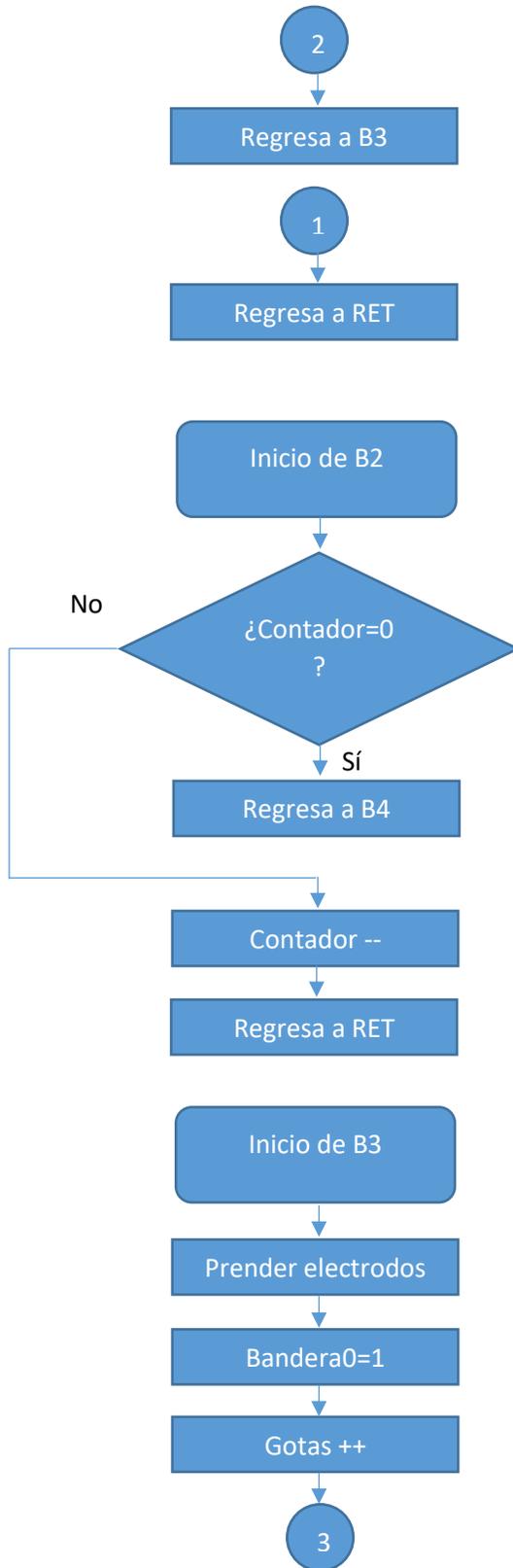






Algoritmo para que el programa funcione indefinidamente hasta ser interrumpido.







Anexo 15 Programas en Code Composer Studio v7 para el DSP C2000 Piccolo MCU F28027

A continuación se presentan los programas utilizados para este trabajo de tesis. El registro utilizado para guardar el número de veces que se prendieron los electrodos es el registro GOTAS. El umbral (H1) y el tiempo de encendido de los electrodos (TIEMPO) son los parámetros que se deberán modificar cada vez que se ejecute el programa acomodándolos de acuerdo a las condiciones del experimento en cuestión.

- Programa 1

Este primer programa tiene una duración de un segundo, después de ese tiempo, entra en un ciclo infinito de espera. Este programa está basado en el algoritmo 1 mostrado en el *Anexo 14*.

```
; Programa para Piccolo F28027
; Adquisición de canal 1 del ADC (Pin J5.6)
; Salida en GPIO0 (Pin J6.1)
; Para el SOC utilizar interrupción de TIMER0
; El programa ejecutara sus instrucciones normales durante 1 s
; después entrará en un ciclo infinito de espera

                .global _c_int00      ;
; Direcciones de registros

DIR_WDCR        .set 07029h          ; Dir. de registro de control de WatchDog
DIR_SP          .set 00600h          ; parte alta del stack
DIR_PIECTRL     .set 0x00CE0         ; Registro de control de PIE
DIR_PIEACK      .set 0x00CE1         ; Registro de reconocimiento de PIE
DIR_PIEIER1     .set 0x00CE2         ; Registro habilitador de interrupciones
; de PIE
; Grupo INT1
DIR_PIEIFR1     .set 0x00CE3         ; Registro de banderas de interrupciones
; de PIE
; Grupo INT1
DIR_PIEIER10    .set 0x0CF4          ; Registro habilitador de interrupciones
; de PIE
; Grupo INT10 (INTADC1-8)
DIR_PIEIFR10    .set 0x0CF5         ; Registro de banderas de interrupción de
; PIE
; Grupo INT10
DIR_GPAMUX1     .set 0x06F86         ; GPIO A MUX 1 (GPIO0-15)
DIR_GPAMUX2     .set 0x06F88         ; GPIO A MUX 2 (GPIO16-31)
DIR_GPADIR      .set 0x06F8A         ; GPIO A Dirección (GPIO0-31)
DIR_GPADAT      .set 0x06FC0         ; GPIO A Dato (GPIO0-31)

; Registros para establecer frecuencia de trabajo
```

```

DIR_PCLKCR3      .set 0x07020
DIR_ITIMO        .set 0x0D4C
DIR_TIMPRDL     .set 0x0C02
DIR_TIMPRDH     .set 0x0C03
DIR_TIMOTCR     .set 0x0C04
DIR_TIM1PRDL    .set 0x0C0A
DIR_TIM1PRDH    .set 0x0C0B
DIR_TIM1TCR     .set 0x0C0C

C_WDCR          .set 0068h      ; Máscara de WD
PER_H           .set 0000h      ; Para PRD H
PER_L           .set 05DBh      ; Para PRD L 20khz BB7, 05DB 40Khz

DIR_PCLKCR0     .set 0701Ch      ; Dir. Registro de control CLK
                                   ; de periféricos
DIR_ADCCTL1     .set 07100h

DIR_ADCSOCFOR   .set 0711Ah      ;
DIR_ADCSOC0CTL  .set 07120h      ;
DIR_ADCMODE     .set 07112h      ; Modo secuencial=0, simultáneo=1
DIR_INTSEL1N2   .set 07108h      ; Selección de INT ADC1
DIR_ADCRESULT0  .set 00B00h      ;
DIR_V_ADCINT10  .set 00DD0h      ; Vector de interrupción 10.1

                                   .data                               ; Sección de datos

P0              .word 0h          ; Bandera1
H1              .word 05D1h       ; umbral .2V
TIEMPO         .word 00C8h       ; Tiempo ON 7ms
GOTAS          .word 0000h       ; Conteo de gotas
CONT           .word 0000h       ; Contador regresivo
SEGUNDOS       .word 09C40h      ; Duración del programa 1s para un
                                   ; muestreo de 40khz

                                   .text

_c_int00
    SETC INTM                    ; Deshabilita toda interrupción enmascarable
    MOV SP, #DIR_SP              ; Localiza el Stack
    AND IFR, #0FFFFh            ; Limpia cualquier interrupción pendiente
    EALLOW                       ; Deshabilita escritura a registros protegidos
    MOVL XAR1, #DIR_WDCR
    MOV *AR1, #C_WDCR            ; Desactiva el WatchDog
    ***** PIE
; Habilitar PIE
    MOVL XAR0, #DIR_PIECTRL
    MOV AL, *AR0
    OR AL, #0x0001
    MOV *AR0, AL
; Activar las interrupciones de INT10.1 con el bit 1 (Grupo 1 int 10 de PIE)

```

```

        MOVL  XAR0, #DIR_PIEIER10
        MOV   AL, *XAR0
        OR    AL, #0x0001
        MOV   *XAR0, AL
; Ligar la subrutina con el vector de interrupciones PIE
        MOVL  XAR2, #DIR_V_ADCINT10
        MOV   ACC, #_MI_ADCINT
*        MOV   AH, #03Fh
        MOVL  *XAR2, ACC
***** GPIO
; Configura el GPAMUX1 para poner los pines como GPIO
        MOVL  XAR0, #DIR_GPAMUX1
        MOV   ACC, #0x0000
        MOVL  *XAR0, ACC
; Salidas, LED en GPIO0,1,2,3, DIR = 1
; Switch en GPIO12 como entrada DIR = 0
        MOVL  XAR0, #DIR_GPADIR
        MOV   AL, #000Fh
        MOV   *XAR0, AL
***** TIMER 0
; Carga el periodo de TIEMPO
        MOVL  XAR1, #DIR_TIMPRDH
        MOV   AL, #PER_H           ; Carga el ACC con el valor de periodo
        MOV   *XAR1, AL           ;
        MOVL  XAR1, #DIR_TIMPRDL   ;
        MOV   AL, #PER_L           ; Carga el ACC con el valor de periodo PRD
        MOV   *XAR1, AL           ; Pasa el valor el PRD bajo
; Activar TIE en TIMER0TCR 0x0C04, habilita interrupción de TIMER0
        MOVL  XAR0, #DIR_TIM0TCR
        MOV   AL, *XAR0
        OR    AL, #0x4000
        MOV   *XAR0, AL

***** ADC
; Habilitar el reloj del ADC, vía el registro PCLKCR0 bit 3
        MOVL  XAR1, #DIR_PCLKCR0
        MOV   AL, *XAR1
        OR    AL, #0008h
        MOV   *XAR1, AL
        NOP                   ; Retardos
        NOP
        NOP
; Registro ADCCTL1 bit14=adcenable bit7=powerdown (activo bajo)
        MOVL  XAR1, #DIR_ADCCTL1
        MOV   AL, *XAR1
        OR    AL, #40E0h
        MOV   *XAR1, AL
; Configuración del ADC Piccolo
        MOVL  XAR0, #DIR_ADCMODE
        MOV   AL, #00           ; Modo secuencial
        MOV   *XAR0, AL
; Escribir al registro ADCSOC0CTL, los campos ACQPS, CHSEL y TRIGSEL
; - El campo ACQPS (5..0) de 6b, ventana de muestreo y retención (S/H)
; - CHSEL (9..6): Selecciona el canal a convertir
; - TRIGSEL (15..11): Selecciona la fuente de disparo SOC para el canal

```

```

    MOVL  XAR1, #DIR_ADCSOC0CTL
    MOV   AL, #0806h           ; TRIGSEL=TIMER0, CHSEL=Ch1, ACQPS=6+1
    MOV   *XAR1, AL
; Asocia EOC1 a ADCINT1
    MOVL  XAR1, #DIR_INTSEL1N2
    MOV   AL, #0060h           ; Habilita canal 1 (EOC0) para ADCINT1
    MOV   *XAR1, AL
EDIS
*****
; Habilita INT1.X grupo x=10 de PIE en IER
    OR    IER, #0x0200         ; Habilita INT10
; Habilita INT globales
    CLRC  INTM                 ; Listo para recibir interrupciones

```

***** CICLO INFINITO

```

FIN_R  NOP
      B    FIN_R, UNC
***** Subrutina de
interrupción

```

```

_MI_ADCINT
    MOVL  XAR0, #DIR_ADCRESULT0 ; Lee dato convertido
    MOV   AL, *XAR0              ; |
    MOVL  XAR1, #SEGUNDOS        ; ¿segundos=1?
    CMP   *XAR1, #0001h
    B     b1, EQ
    MOVL  XAR1, #P0              ; ¿P0=1?
    CMP   *XAR1, #0001h
    B     b2, EQ
    MOVL  XAR0, #H1
    CMP   AL, *XAR0              ; ¿V1>H1?
    B     b3, GT
    MOVL  XAR0, #SEGUNDOS        ; segundos--
    MOV   AL, *XAR0              ; |
    SUB   ACC, #0001h           ; |
    MOV   *XAR0, AL              ; |
    B     RET, UNC

```

```

b1    NOP
      MOV   AL, #0000h           ; Electrodo OFF
      MOVL  XAR0, #DIR_GPADAT
      MOV   *AR0, AL
      B     b1, UNC              ; Ciclo infinito

```

```

b2    MOVL  XAR1, #CONT          ; ¿CONT=1?
      CMP   *XAR1, #0001h
      B     b4, EQ
      MOV   AL, *XAR1           ; Cont--
      SUB   ACC, #0001h         ; |
      MOV   *XAR1, AL           ; |
      MOVL  XAR0, #SEGUNDOS     ; segundos--
      MOV   AL, *XAR0           ; |

```

```

SUB    ACC, #0001h           ; |
MOV    *XAR0, AL             ; |
B      RET, UNC

b3     MOV    AL, #000Fh      ; Electrodos ON
      MOVL   XAR0, #DIR_GPADAT ; |
      MOV    *AR0, AL        ; |
      MOVL   XAR1, #P0       ; P=1
      MOV    *XAR1, #0001h   ; |
      MOVL   XAR1, #GOTAS    ; GOTAS++
      MOV    AL, *AR1        ; |
      ADD    ACC, #0001h     ; |
      MOV    *AR1, AL        ; |
      MOVL   XAR1, #CONT     ; CONT=TIEMPO
      MOVL   XAR2, #TIEMPO
      MOV    AL, *AR2
      MOV    *AR1, AL
      MOVL   XAR0, #SEGUNDOS ; segundos--
      MOV    AL, *XAR0
      SUB    ACC, #0001h     ; |
      MOV    *XAR0, AL       ; |
      B      RET, UNC

b4     MOVL   XAR1, #P0       ; P0=0
      MOV    *XAR1, #0000h   ; |
      MOV    AL, #0000h      ; Electrodos OFF
      MOVL   XAR0, #DIR_GPADAT ; |
      MOV    *AR0, AL        ; |
      MOVL   XAR0, #SEGUNDOS ; segundos--
      MOV    AL, *XAR0
      SUB    ACC, #0001h     ; |
      MOV    *XAR0, AL       ; |
      B      RET, UNC

RET    EALLOW
      MOVL   XAR0, #DIR_PIEACK ; 0x0000-0CE10x0CE1
      MOV    AL, #0x0200
      MOV    *XAR0, AL
      EDIS
      IRET    ; Retorno de interrupción
      .end

```

- Programa 2

Este programa se ejecuta por tiempo indefinido hasta que el usuario pausa o detiene su ejecución, además, está basado en el algoritmo 2 mostrado en el *Anexo 14*.

```

; Programa para Piccolo F28027
; Adquisición de canal 1 del ADC (Pin J5.6)
; Salida en GPIO0 (Pin J6.1)
; Para el SOC utilizar interrupción de TIMER0
; Este programa se ejecuta indefinidamente hasta que

```

```

;     el usuario lo detenga

;     .global _c_int00 ;
;     Direcciones de registros
DIR_WDCR      .set 07029h ; Dir. de registro de control de WatchDog
DIR_SP        .set 00600h ; parte alta del stack
DIR_PIECTRL   .set 0x00CE0 ; Registro de control de PIE
DIR_PIEACK    .set 0x00CE1 ; Registro de reconocimiento de PIE
DIR_PIEIER1   .set 0x00CE2 ; Registro habilitador de interrupciones
; de PIE
; Grupo INT1
DIR_PIEIFR1   .set 0x00CE3 ; Registro de banderas de interrupción de
; PIE
; Grupo INT1
DIR_PIEIER10  .set 0x0CF4 ; Registro habilitador de interrupciones
; de PIE
; Grupo INT10 (INTADC1-8)
DIR_PIEIFR10  .set 0x0CF5 ; Registro de banderas de interrupción de
; PIE
; Grupo INT10
DIR_GPAMUX1   .set 0x06F86 ; GPIO A MUX 1 (GPIO0-15)
DIR_GPAMUX2   .set 0x06F88 ; GPIO A MUX 2 (GPIO16-31)
DIR_GPADIR    .set 0x06F8A ; GPIO A Dirección (GPIO0-31)
DIR_GPADAT    .set 0x06FC0 ; GPIO A Dato (GPIO0-31)

DIR_PCLKCR3   .set 0x07020
DIR_ITIMO     .set 0x0D4C
DIR_TIMPRDL   .set 0x0C02
DIR_TIMPRDH   .set 0x0C03
DIR_TIM0TCR   .set 0x0C04
DIR_TIM1PRDL  .set 0x0C0A
DIR_TIM1PRDH  .set 0x0C0B
DIR_TIM1TCR   .set 0x0C0C

C_WDCR        .set 0068h ; Máscara de WD
PER_H         .set 0000h ; Para PRD H
PER_L         .set 05DBh ; Para PRD L 20khz 0BB7, 05BD para 40KHz

DIR_PCLKCR0   .set 0701Ch ; Dir. Registro de control CLK
; de periféricos
DIR_ADCCTL1   .set 07100h ;

DIR_ADCSOCFOR .set 0711Ah ;
DIR_ADCSOC0CTL .set 07120h ;
DIR_ADCMODE   .set 07112h ; Modo secuencial=0, simultáneo=1
DIR_INTSEL1N2 .set 07108h ; Selección de INT ADC1 y ADC2
DIR_ADCRESULT0 .set 00B00h ;
DIR_V_ADCINT10 .set 00DD0h ; Vector de interrupción 10.1

.data ; Sección de datos

P0 .word 0h ; Bandera1

```

```

H1                .word 05D1h           ; umbral 1
TIEMPO            .word 00C8h           ; Tiempo ON 7ms
GOTAS             .word 0000h           ; Conteo de gotas
CONT              .word 0000h           ; Contador regresivo

                .text

_c_int00
    SETC INTM                ; Deshabilita toda interrupción
enmascarable
    MOV SP, #DIR_SP          ; Localiza el Stack
    AND IFR, #0FFFFh        ; Limpia cualquier interrupción pendiente
    EALLOW                  ; Deshabilita escritura a registros
protegidos
    MOVL XAR1, #DIR_WDCR
    MOV *AR1, #C_WDCR        ; Desactiva el WatchDog
***** PIE
; Habilitar PIE
    MOVL XAR0, #DIR_PIECTRL
    MOV AL, *AR0
    OR AL, #0x0001
    MOV *AR0, AL
; Activar las interrupciones de INT10.1 con el bit 1 (Grupo 1 int 10 de PIE)
    MOVL XAR0, #DIR_PIEIER10
    MOV AL, *XAR0
    OR AL, #0x0001
    MOV *XAR0, AL
; Ligar la subrutina con el vector de interrupciones PIE
    MOVL XAR2, #DIR_V_ADCINT10
    MOV ACC, #_MI_ADCINT
*    MOV AH, #03Fh
    MOVL *XAR2, ACC
***** GPIO
; Configura el GPAMUX1 para poner los pines como GPIO
    MOVL XAR0, #DIR_GPAMUX1
    MOV ACC, #0x0000
    MOVL *XAR0, ACC
; Salidas, LED en GPIO0,1,2,3, DIR = 1
; Switch en GPIO12 como entrada DIR = 0
    MOVL XAR0, #DIR_GPADIR
    MOV AL, #000Fh
    MOV *XAR0, AL
***** TIMER 0
; Carga el periodo de TIEMPO
    MOVL XAR1, #DIR_TIMPRDH
    MOV AL, #PER_H           ; Carga el ACC con el valor de periodo
    MOV *XAR1, AL           ;
    MOVL XAR1, #DIR_TIMPRDL ;
    MOV AL, #PER_L         ; Carga el ACC con el valor de periodoPRD
    MOV *XAR1, AL         ; Pasa el valor el PRD bajo
; Activar TIE en TIMER0TCR 0x0C04, habilita interrupción de TIMER0
    MOVL XAR0, #DIR_TIM0TCR
    MOV AL, *XAR0
    OR AL, #0x4000

```

```

MOV          *XAR0, AL

***** ADC
; Habilitar el reloj del ADC, vía el registro PCLKCR0 bit 3
MOVL  XAR1, #DIR_PCLKCR0
MOV    AL, *XAR1
OR     AL, #0008h
MOV    *XAR1, AL
NOP
NOP          ; Retardos
NOP

; Registro ADCCTL1 bit14=adcenable bit7=powerdown (activo bajo)
MOVL  XAR1, #DIR_ADCCTL1
MOV    AL, *XAR1
OR     AL, #40E0h
MOV    *XAR1, AL

; Configuración del ADC Piccolo
MOVL  XAR0, #DIR_ADCMODE
MOV    AL, #00          ; Modo secuencial
MOV    *XAR0, AL

; Escribir al registro ADCSOC0CTL, los campos ACQPS, CHSEL y TRIGSEL
; - El campo ACQPS (5..0) de 6b, ventana de muestreo y retención (S/H)
; - CHSEL (9..6): Selección el canal a convertir
; - TRIGSEL (15..11): Selección la fuente de disparo SOC para el canal
MOVL  XAR1, #DIR_ADCSOC0CTL
MOV    AL, #0806h      ; TRIGSEL=TIMER0, CHSEL=Ch1, ACQPS=6+1
MOV    *XAR1, AL

; Asocia EOC1 a ADCINT1
MOVL  XAR1, #DIR_INTSEL1N2
MOV    AL, #0060h      ; Habilita canal 1 (EOC0) para ADCINT1
MOV    *XAR1, AL

EDIS
*****
; Habilita INT1.X grupo x=10 de PIE en IER
OR     IER, #0x0200    ; Habilita INT10
; Habilita INT globales
CLRC  INTM             ; Listo para recibir interrupciones
***** CICLO INFINITO
FIN_R  NOP
      B    FIN_R, UNC

***** Subrutina de
interrupción

_MI_ADCINT
MOVL  XAR0, #DIR_ADCRESULT0 ; Lee dato convertido
MOV    AL, *XAR0             ; |
MOVL  XAR1, #P0              ; ¿P0=1?
CMP   *XAR1, #0001h
B     b2, EQ
MOVL  XAR0, #H1
CMP   AL, *XAR0              ; ¿V1>H1?
B     b3, GT
B     RET, UNC

b2    MOVL  XAR1, #CONT       ; ¿CONT=1?

```

```

    CMP    *XAR1, #0001h
    B      b4, EQ
    MOV    AL, *XAR1                ; Cont--
    SUB    ACC, #0001h            ; |
    MOV    *XAR1, AL              ; |
    B      RET, UNC

b3    MOV    AL, #000Fh            ; Electrodos ON
    MOVL   XAR0, #DIR_GPADAT      ; |
    MOV    *AR0, AL               ; |
    MOVL   XAR1, #P0              ; P=1
    MOV    *XAR1, #0001h         ; |
    MOVL   XAR1, #GOTAS           ; GOTAS++
    MOV    AL, *AR1               ; |
    ADD    ACC, #0001h           ; |
    MOV    *AR1, AL              ; |
    MOVL   XAR1, #CONT            ; CONT=TIEMPO
    MOVL   XAR2, #TIEMPO
    MOV    AL, *AR2
    MOV    *AR1, AL
    B      RET, UNC

b4    MOVL   XAR1, #P0            ; P0=0
    MOV    *XAR1, #0000h         ; |
    MOV    AL, #0000h            ; Electrodos OFF
    MOVL   XAR0, #DIR_GPADAT     ; |
    MOV    *AR0, AL              ; |
    B      RET, UNC

RET    EALLOW
    MOVL   XAR0, #DIR_PIEACK      ; 0x0000-0CE10x0CE1
    MOV    AL, #0x0200
    MOV    *XAR0, AL

EDIS
    IRET                            ; Retorno de interrupción
.end

```

Anexo 16 Circuito Esquemático

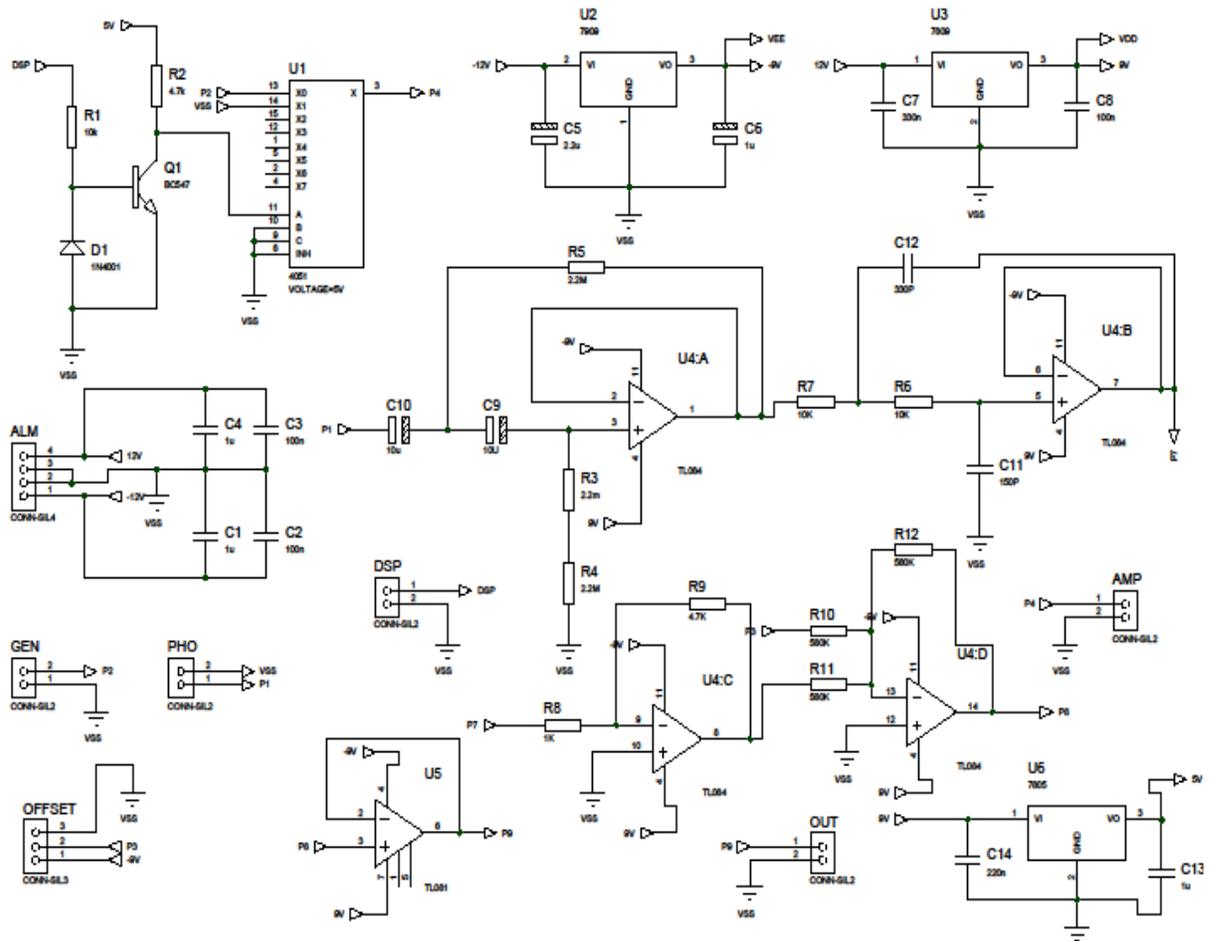


Figura A 26. Circuito esquemático hecho en Proteus 7

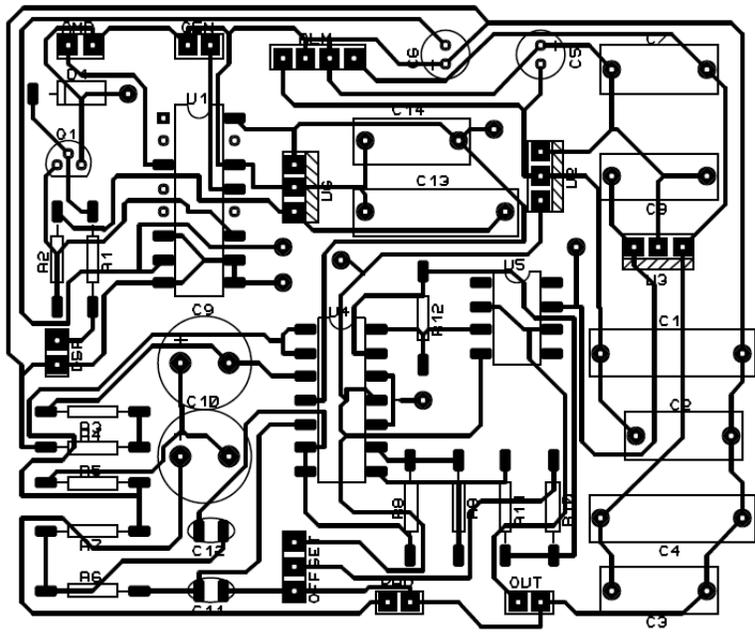


Figura A 27 Circuito esquemático de la placa fenólica

Anexo 17. Programa en Matlab para adquirir señales

%Copiar las primeras 3 líneas en la ventana de comando (command Window)

%Ejecutar programa (EDITOR -> RUN)

```
%s = daq.createSession('ni')
%s.addAnalogInputChannel('Dev1',0,'Voltage')
%s.Channels(1).InputType='SingleEnded'
s.DurationInSeconds= 1
s.Rate=40000
data=s.startForeground();
plot (data)
```

Anexo 18. Resultados: Datos para diferentes concentraciones de fluoresceína

Tabla A 25 Datos para diferentes concentraciones de fluoresceína 1

Concentración [μM]	Voltaje _{2p-p} [V]	Frecuencia [Hz]	Número de picos
1	0.1493	54.001	53
	0.1502	45.995	47
	0.1477	44.993	43
5	0.6159	46.998	47
	0.6041	50.006	54
	0.6041	42	47
10	1.2999	44.993	44
	1.2841	40.998	39
	1.2818	37.003	35
15	1.7273	50.993	51
	1.6973	66.001	66
	1.6644	52.998	50
20	2.0998	91.004	92
	2.0953	85.004	84
	2.0756	79.004	78

Tabla A 26 Desviación estándar de la tabla A 25

Concentración [μM]	Voltaje _{p-p} [V]
1	0.001266228
5	0.006812733
10	0.009853426
15	0.03146114
20	0.012871027

Tabla A 27 Datos para diferentes concentraciones de fluoresceína 2

Concentración molar [μM]	Gotas separadas video	Encendido de electrodos	Electrocoalescencia
1	41	55	4
	39	50	10
	41	48	10
5	48	58	8
	50	58	2
	55	71	29
10	35	35	0
	36	36	0
	38	38	3
15	47	58	0
	81	98	67
	80	108	80
20	69	82	49
	60	69	28
	57	66	34

Tabla A 28 Valores promedio de la tabla A27

Concentración Molar [μM]	Gotas separadas Video	Encendido de electrodos	Electrocoalescencia	Error %
1	40.33333333	51	8	20.6792929
5	51	62.33333333	13	17.8565647
10	36.33333333	36.33333333	1	0
15	69.33333333	88	49	20.7461273
20	62	72.33333333	37	14.1778335

Tabla A 29 Desviación estándar de la tabla A28

Concentración Molar [μM]	Electrocoalescencia	Error
1	3.464101615	5.55463893
5	14.17744688	4.40340233
10	1.732050808	0
15	42.93017587	4.55825452
20	10.81665383	1.48127327

Anexo 19. Resultados: Variación de potencia para una concentración de fluoresceína de 50[μ M]

Tabla A 30 Datos para la variación de potencia del diodo láser

Potencia [mW]	Voltaje _{1-p-p} [V]	Voltaje _{2-p-p} [V]	Frecuencia [Hz]	Número de picos	Fotodiodo		Circuito		$\left(\frac{S}{R}\right)$ entrada	$\left(\frac{S}{R}\right)$ salida	Factor de ruido
					Potencia de Señal [w]	Potencia de ruido [w]	Potencia de Señal [w]	Potencia de ruido [w]			
4	0.0419	0.9524	115.005	117	14.46	341.7	8.12E+05	3.85E+05	0.042317823	2.108543236	0.020069696
	0.0409	0.9447	111.99	113	3.322	327.4	4.40E+05	4.53E+05	0.01014661	0.972375691	0.010434866
	0.0445	0.9137	113	110	0.5531	275.2	2.64E+05	4.26E+05	0.002009811	0.618667917	0.00324861
5	0.0403	1.0936	105.9971	108	6.169	334.2	8.52E+05	7.63E+05	0.018459007	1.117461982	0.016518689
	0.0432	1.021	104.9945	107	9.117	269.9	8.88E+05	5.08E+05	0.033779177	1.748719968	0.019316516
	0.0449	1.023	100.99	101	4.908	357.4	5.30E+05	6.41E+05	0.013732513	0.826439831	0.01661647
6	0.0432	1.0075	103.005	103	11.48	279.5	7.99E+05	4.23E+05	0.041073345	1.889493611	0.021737753
	0.0425	1.1184	99.997	101	12.92	709.4	1.61E+06	6.88E+05	0.018212574	2.342002034	0.007776498
	0.0412	1.072	104.9945	104	7.776	302	1.14E+06	1.05E+06	0.025748344	1.085959885	0.023710217
7	0.0435	1.1461	103.005	103	19.44	297.7	1.59E+06	1.59E+06	0.065300638	0.998740554	0.065382985
	0.0419	1.2525	103.005	102	5.409	258.5	7.49E+05	5.79E+05	0.020924565	1.294158313	0.016168474
	0.0403	1.0662	102.002	103	18.09	269.2	1.17E+06	5.55E+05	0.067199108	2.114553314	0.03177934
8	0.0451	1.1193	102.002	103	18.58	1089	2.20E+06	9.33E+05	0.017061524	2.358490566	0.007234086
	0.0399	1.1523	98.9943	99	8.335	262.4	9.52E+05	8.33E+05	0.031764482	1.142565703	0.027801011
	0.0397	1.3169	104.007	103	9.583	285.3	1.00E+06	5.62E+05	0.033589204	1.784062611	0.018827369
9	0.0448	1.2835	109.005	110	10.36	729.8	1.08E+06	7.19E+06	0.01419567	0.150389538	0.09439267
	0.0429	1.1796	108.002	108	27.93	431.9	1.96E+06	6.51E+05	0.064667747	3.013362003	0.021460331
	0.0386	1.1423	106.99	106	2.631	225.4	1.17E+06	1.11E+06	0.011672582	1.050405041	0.011112458
10	0.0416	1.2132	105.997	106	14.99	264.9	2.10E+06	9.10E+05	0.056587391	2.305494505	0.024544579
	0.0455	1.2212	115.992	115	18.53	338.8	2.43E+06	1.25E+06	0.054693034	1.937749401	0.02822503
	0.0455	1.3218	114.002	111	15.75	288.7	1.19E+06	7.33E+05	0.054554901	1.61756683	0.033726521

Tabla A 31 Valores promedio de la tabla A30

Potencia [mW]	Voltaje _{p-p} [V]	Frecuencia [Hz]	Número de picos	Factor de ruido	10logF dB
4	0.936933333	113.3316667	113.333333	0.01125106	-19.4880666
5	1.045866667	103.9938667	105.333333	0.01748389	-17.573619
6	1.065966667	102.6655	102.666667	0.01774149	-17.5100993
7	1.154933333	102.6706667	102.666667	0.03777693	-14.2277331
8	1.196166667	101.6677667	101.666667	0.01795416	-17.4583502
9	1.2018	107.999	108	0.04232182	-13.7343567
10	1.252066667	111.997	110.666667	0.02883204	-15.4012458

Tabla A 32 Desviación estándar de la tabla A31

Potencia [mW]	Voltaje _{p-p} [V]
4	0.02048569
5	0.04135037
6	0.05569563
7	0.09346359
8	0.10585204
9	0.07317096
10	0.06052316

Anexo 20 Separación gotas de diferentes concentraciones de fluoresceína

Prueba 1

Tabla A 33 Separación gotas de diferentes concentraciones de fluoresceína duración 1 [s]

Encendido de electrodos	Gotas separadas video	Total de gotas
128	79	582
83	33	319
65	30	480

Prueba 2

Tabla A 34 Separación gotas de diferentes concentraciones de fluoresceína duración 13.1 [s]

Encendido de electrodos	Gotas separadas video	Total de gotas
89	35	900
92	49	1115
121	54	900

Bibliografía

- [1] S. J. Martin, J. P. Godschalx, M. E. Mills, E. O. Shaffer, and P. H. Townsend, "Development of a Low-Dielectric-Constant Polymer for the Fabrication of Integrated Circuit Interconnect," *Adv. Mater.*, vol. 12, no. 23, pp. 1769–1778, 2000.
- [2] T. a Johnson, R. W. Knepper, V. Marcello, and W. Wang, "Chip Substrate Resistance Modeling Technique for Integrated Circuit Design," *Comput. Des. Integr. Circuits Syst. IEEE Trans.*, vol. 3, no. 2, pp. 126–134, 1984.
- [3] Q. Xia *et al.*, "Memristor-CMOS hybrid integrated circuits for reconfigurable logic," *Nano Lett.*, vol. 9, no. 10, pp. 3640–3645, 2009.
- [4] G. K. Fedder, "Mems fabrication," *Int. Test Conf. 2003. Proceedings. ITC 2003.*, vol. 1, 2003.
- [5] W. Bogaerts *et al.*, "Basic structures for photonic integrated circuits in Silicon-on-insulator.," *Opt. Express*, vol. 12, no. 8, pp. 1583–1591, 2004.
- [6] M. J. Madou, *Fundamentals of Microfabrication and nanotechnology. Volume 1*, Third Edit. New York, NY: CRC Press. Taylor and Francis Group, 2012.
- [7] J. W. Judy, "Microelectromechanical systems (MEMS): fabrication, design and applications," *Smart Mater. Struct.*, vol. 10, pp. 1115–1134, 2001.
- [8] N. Maluf and K. Williams, *An Introduction to Microelectromechanical Systems Engineering*, Second Edi. Artech House Inc., 2004.
- [9] E. Y. Basova and F. Foret, "Droplet microfluidics in (bio)chemical analysis.," *Analyst*, vol. 140, no. 1, pp. 22–38, 2015.
- [10] J. Rossier, F. Reymond, and P. E. Michel, "Polymer microfluidic chips for electrochemical and biochemical analyses," *Electrophoresis*, vol. 23, no. 6, pp. 858–867, 2002.
- [11] M. Yan and A. Kapua, "Fabrication of molecularly imprinted polymer microstructures," *Anal. Chim. Acta*, vol. 435, no. July 2000, pp. 163–167, 2001.
- [12] M. Hecke and W. K. Schomburg, "Review on micro molding of thermoplastic polymers," *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 14, no. 3, pp. R1–R14, 2003.
- [13] K.-H. Lee, Y.-D. Su, S.-J. Chen, F.-G. Tseng, and G.-B. Lee, "Microfluidic systems integrated with two-dimensional surface plasmon resonance phase imaging systems for microarray immunoassay.," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 23, no. 4, pp. 466–472, 2007.
- [14] D. Figeys and D. Pinto, "Lab-on-a-Chip: A Revolution in Biological and Medical Sciences.," *Anal. Chem.*, vol. 72, no. 9, p. 330 A-335 A, 2000.
- [15] C. H. Ahn *et al.*, "Disposable smart lab on a chip for point-of-care clinical diagnostics," *Proc. IEEE*, vol. 92, no. 1, pp. 154–173, 2004.
- [16] D. R. Link *et al.*, "Electric control of droplets in microfluidic devices," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 45, no. 16, pp. 2556–2560, 2006.
- [17] E. Brouzes *et al.*, "Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 34, pp. 14195–14200, 2009.
- [18] S.-Y. Teh, R. Lin, L.-H. Hung, and A. P. Lee, "Droplet microfluidics.," *Lab Chip*, vol. 8, no. 2, pp. 198–220, 2008.

- [19] S. L. Anna, “Droplets and Bubbles in Microfluidic Devices,” *Annu. Rev. Fluid Mech.*, vol. 48, pp. 285–309, 2016.
- [20] A. M. Klein *et al.*, “Droplet Barcoding for Single-Cell Transcriptomics Applied to Embryonic Stem Cells,” *Cell*, vol. 161, no. 5, pp. 1187–1201, 2015.
- [21] M. Leman, F. Abouakil, A. D. Griffiths, and P. Tabeling, “Droplet-based microfluidics at the femtolitre scale,” *Lab Chip*, vol. 15, no. 3, pp. 753–765, 2015.
- [22] L. Rao *et al.*, “A microfluidic electrostatic separator based on pre-charged droplets,” *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 210, pp. 328–335, 2015.
- [23] K. a. Hill, C. M. Collier, and J. F. Holzman, “Dielectrophoresis microjets: a merging of electromagnetics and microfluidics for on-chip technologies”, *Proceedings* vol. 9129, p. 912931, 2014.
- [24] C. W. Shields, C. D. Reyes, and G. P. López, “Microfluidic cell sorting: a review of the advances in the separation of cells from debulking to rare cell isolation.,” *Lab Chip*, vol. 15, no. 5, pp. 1230–49, 2015.
- [25] I. Leibacher, P. Reichert, and J. Dual, “Microfluidic droplet handling by bulk acoustic wave (BAW) acoustophoresis,” *Lab Chip*, vol. 15, pp. 2896–2905, 2015.
- [26] A. A. Nawaz *et al.*, “Acoustofluidic Fluorescence Activated Cell Sorter,” *Anal. Chem.*, p. 12051-12058, 2015.
- [27] T. P. Lagus and J. F. Edd, “A review of the theory, methods and recent applications of high-throughput single-cell droplet microfluidics,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 46, no. 11, p. 114005, 2013.
- [28] B. Teste, N. Jamond, D. Ferraro, J.-L. Viovy, and L. Malaquin, “Selective handling of droplets in a microfluidic device using magnetic rails,” *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 19, no. 1, pp. 141–153, 2015.
- [29] P. Sajeesh, S. Manasi, M. Doble, and a. K. Sen, “A microfluidic device with focusing and spacing control for resistance-based sorting of droplets and cells,” *Lab Chip*, vol. 15, no. 18, pp. 3738–3748, 2015.
- [30] A. Mitchell, K. Khoshmanesh, R. Node, and A. R. C. Centre, “Dielectrophoresis for particle and cell trapping in microfluidic systems: Principles and Applications Part 1: Fundamental Principles of Dielectrophoresis,” *RMIT University*, 2012.
- [31] P. R. C. Gascoyne and Jody Vykoukal, “Review Particle separation by dielectrophoresis,” *Electrophoresis*, vol. 23, pp. 1973–1983, 2002.
- [32] J.-C. Baret *et al.*, “Fluorescence-activated droplet sorting (FADS): efficient microfluidic cell sorting based on enzymatic activity.,” *Lab Chip*, vol. 9, no. 13, pp. 1850–1858, 2009.
- [33] K. Ahn, C. Kerbage, T. P. Hunt, R. M. Westervelt, D. R. Link, and D. a. Weitz, “Dielectrophoretic manipulation of drops for high-speed microfluidic sorting devices,” *Applied Physics Letters*, vol. 88, no. 2. pp. 1–3, 2006.
- [34] O. D. Velev, S. Gangwal, and D. N. Petsev, “Particle-localized AC and DC manipulation and electrokinetics,” *Annu. Reports Sect. “C” Physical Chem.*, vol. 105, p. 213, 2009.
- [35] S.-M. Yang, H. Yao, D. Zhang, W. J. Li, H.-F. Kung, and S.-C. Chen, “Droplet-based dielectrophoresis device for on-chip nanomedicine fabrication and improved gene delivery efficiency,” *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 19, no. 1, pp. 235–243, 2015.

- [36] N. Crews, J. Darabi, P. Voglewede, F. Guo, and a. Bayoumi, "An analysis of interdigitated electrode geometry for dielectrophoretic particle transport in micro-fluidics," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 125, no. 2, pp. 672–679, 2007.
- [37] Y. Wakizaka, M. Hakoda, and N. Shiragami, "Effect of electrode geometry on dielectrophoretic separation of cells," *Biochem. Eng. J.*, vol. 20, no. 1, pp. 13–19, 2004.
- [38] D. Das, K. Biswas, and S. Das, "A microfluidic device for continuous manipulation of biological cells using dielectrophoresis," *Med. Eng. Phys.*, vol. 36, no. 6, pp. 726–731, 2014.
- [39] X. Wang, J. Yang, and Y. Huang, "Cell separation by dielectrophoretic field-flow-fractionation," *Anal. Chem.*, vol. 72, no. 4, pp. 832–839, 2000.
- [40] A. Wolff *et al.*, "Integrating advanced functionality in a microfabricated high-throughput fluorescent-activated cell sorter," *Lab Chip*, vol. 3, no. 1, p. 22, 2003.
- [41] L. M. Barrett, A. J. Skulan, A. K. Singh, E. B. Cummings, and G. J. Fiechtner, "Dielectrophoretic manipulation of particles and cells using insulating ridges in faceted prism microchannels," *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 21, pp. 6798–804, 2005.
- [42] H. Morgan, M. P. Hughes, and N. G. Green, "Separation of submicron bioparticles by dielectrophoresis," *Biophys. J.*, vol. 77, no. 1, pp. 516–525, 1999.
- [43] J. S. Giulio Maier, Franz G. Rammerstorfer, *Electrokinetics and Electrohydrodynamics in Microsystems*, vol. 530. Spain: Springer Wien New York, 2011.
- [44] R. Díaz and S. Payen, "Biological cell separation using dielectrophoresis in a microfluidic device," *Www-Bsac.Eecs.Berkeley.Edu*, pp. 1–4, 2013.
- [45] C. Luo *et al.*, "Picoliter-volume aqueous droplets in oil: Electrochemical detection and yeast cell electroporation," *Electrophoresis*, vol. 27, no. 10, pp. 1977–1983, 2006.
- [46] X. Guo and R. Zhu, "A biocompatible microchip and methodology for efficiently trapping and positioning living cells into array based on negative dielectrophoresis," *J. Appl. Phys.*, vol. 117, no. 21, p. 214702, 2015.
- [47] Y.-L. Deng, M.-Y. Kuo, and Y.-J. Juang, "Development of flow through dielectrophoresis microfluidic chips for biofuel production: Sorting and detection of microalgae with different lipid contents," *Biomicrofluidics*, vol. 8, no. 6, p. 64120, 2014.
- [48] A. B. Theberge *et al.*, "Microdroplets in microfluidics: An evolving platform for discoveries in chemistry and biology," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 49, no. 34, pp. 5846–5868, 2010.
- [49] S. Joo, K. H. Kim, H. C. Kim, and T. D. Chung, "A portable microfluidic flow cytometer based on simultaneous detection of impedance and fluorescence," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 25, no. 6, pp. 1509–1515, 2010.
- [50] M. Nickkova, J. Feng, F. Sanchez-Baeza, M.-P. Marco, B. D. Hammock, and I. M. Kennedy, "Competitive quenching fluorescence immunoassay for chlorophenols based on laser-induced fluorescence detection in microdroplets," *Anal. Chem.*, vol. 75, no. 1, pp. 83–90, 2003.
- [51] B. Vazquez, N. Qureshi, L. Oropeza-Ramos, and L. F. Olguin, "Effect of velocity on microdroplet fluorescence quantified by laser-induced fluorescence," *Lab Chip*, vol. 14, no. 18, pp. 3550–5, 2014.
- [52] T. Mu, S. Chen, Y. Zhang, H. Chen, P. Guo, and F. Meng, "Portable Detection and Quantification of Olive Oil Adulteration by 473-nm Laser-Induced Fluorescence," *Food Anal. Methods*, vol. 9, no. 1, pp. 275–279, 2016.

- [53] R. Cole, N. de Lange, Z. Gartner, and A. R. Abate, "Compact and modular multicolor fluorescence detector for droplet microfluidics," *Lab Chip*, vol. 15, pp. 2754–2758, 2015.
- [54] A. Sciambi and A. R. Abate, "Accurate microfluidic sorting of droplets at 30 kHz," *Lab Chip*, vol. 15, no. 1, pp. 47–51, 2015.
- [55] L. Mazutis, J. Gilbert, W. L. Ung, D. a Weitz, A. D. Griffiths, and J. a Heyman, "Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics.," *Nat. Protoc.*, vol. 8, no. 5, pp. 870–891, 2013.
- [56] B. El, R. Utharala, I. V Balyasnikova, A. D. Griffiths, and C. a Merten, "Functional single-cell hybridoma screening using droplet-based microfluidics," *Proceedings of the National Academy of Science*, pp. 1–6, 2012.
- [57] L. M. Fidalgo, G. Whyte, D. Bratton, C. F. Kaminski, C. Abell, and W. T. S. Huck, "From microdroplets to microfluidics: Selective emulsion separation in microfluidic devices," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 47, no. 11, pp. 2042–2045, 2008.
- [58] B. Vazquez Sanchez, "Implementación de un sistema láser para la detección continua de fluorescencia dentro de micro gotas," Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, México, p. 126, 2012.
- [59] C. David K., *Fundamentos de electromagnetismo para ingeniería*. Naucalpan de Juarez, Edo. de México: Addison Wesley Longman México, 1998.
- [60] J. W. Lichtman and J. A. Conchello, "Fluorescence microscopy," *Nat. Methods*, vol. 2, no. 12, pp. 910–919, 2005.
- [61] B. K. Kirby, *Micro and nanoscale fluid mechanics: Transport in microfluidic devices*. New York, NY: Cambridge University, 2010.
- [62] H. Hu, D. Eustace, and C. a. Merten, "Efficient cell pairing in droplets using dual-color sorting," *Lab Chip*, vol. 15, no. 20, pp. 3989–3993, 2015.
- [63] K. Khoshmanesh and C. Zhang, "Dielectrophoretic-activated cell sorter based on curved microelectrodes," *Microfluid. Nanofluidics*, pp. 411–426, 2010.
- [64] L. Wang, L. A. Flanagan, L. Jeon, and A. P. Lee, "Dielectrophoresis switching with vertical sidewall electrodes for microfluidic flow cytometry," *Lab Chip*, pp. 1114–1120, 2007.
- [65] G. A. Castillo García, "Manual de Simulación Numérica de los principios empleados en sistemas Lab On a Chip mediante modelado de elemento finito," Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 2015.
- [66] V. Van, *Analog Filter Design*. New York, NY: Oxford University Press, 1982.