



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
INGENIERIA**

**“Implementación de un sistema láser para
detección continua de fluorescencia dentro
de micro gotas”**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN INGENIERIA

INGENIERIA ELECTRICA – SISTEMAS ELECTRONICOS

P R E S E N T A :

BENJAMIN VAZQUEZ SANCHEZ

TUTORA:

DRA. LAURA ADRIANA OROPEZA RAMOS

2012

JURADO ASIGNADO:

Presidente: DR. PEREZ ALCAZAR PABLO ROBERTO

Secretario: DR. PRADO MOLINA JORGE

Vocal: DRA. OROPEZA RAMOS LAURA ADRIANA

1^{er.} Suplente: DR. OLGUIN CONTRERAS LUIS FERNANDO

2^{do.} Suplente: DR. RODRIGUEZ CUEVAS JORGE

Lugar o lugares donde se realizó la tesis:

Laboratorio de Biofísicoquímica, Facultad de Química, UNAM, en el Centro UNAMems de la Facultad de Ingeniería, UNAM, y en el Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico CCADET, UNAM.

TUTORA DE TESIS:

DRA. LAURA ADRIANA OROPEZA RAMOS



FIRMA

Agradecimientos

A mis asesores: A la Dra. Laura Oropeza Ramos por invitarme a trabajar en su equipo, por sus valiosas sugerencias, críticas y comprensión. Por todo el tiempo extra que nos dedica a los alumnos, por motivarnos y ayudarnos a hacer las cosas siempre mejor. Al Dr. Luis Olguín Contreras por la confianza y el apoyo para utilizar su laboratorio y los instrumentos empleados en la realización de esta tesis, por sus invaluable consejos, críticas y correcciones. A ambos los considero además de mentores, amigos, los admiro.

Al Dr. Naser Qureshi por su tiempo, consejos y apoyo en la realización de esta tesis.

Al Ing. Químico Julio Calderón Lumbreras por compartir su experiencia en fabricación de chips microfluidicos y ser un excelente compañero de trabajo.

A toda la pandilla de los “Biofísicoquímicos”, en especial a Enrique Álvarez y Aimee Torres, por compartir el laboratorio y buscar siempre una convivencia muy amena.

A los compañeros del grupo de BioMems de la UNAM, en especial a Jorge Soto por compartir su experiencia y brindar su asesoría.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal ICyTDF, por el financiamiento de proyecto titulado: Tecnología de microgotas en microchips para el descubrimiento de nuevos agentes antivirales, clave PIFUT09-288, con el cual se adquirieron equipos e insumos necesarios para el desarrollo de esta tesis. Adicionalmente se contó con el apoyo del proyecto titulado: Desarrollo de plataformas micro-estructuradas BioMEMS para estudio de cultivo cardiaco, clave PINV11-17.

Al CONACYT por el apoyo parcial proporcionado bajo el proyecto 153353.

A la coordinación de estudios de postgrado de la UNAM (CEP-UNAM), por la beca de maestría otorgada.

Dedicatoria

A Dios por el tiempo y el espacio, mi lugar y momento. A mis padres por ser quienes son y sus logros. A Samuel por ser mi hermano, amigo y cómplice. A Tania por su alegría, su forma de ver la vida y llenar la mía de sentimientos. A Jimena por su llegada. A mi familia, siempre presente y cercana en mi mente. A mis amigos, cercanos o lejanos espacialmente, inmejorables compañeros de viaje.

Índice general

Introducción	5
1. Antecedentes Generales	9
1.1. Sistemas Microfluídicos y Lab on a Chip	11
1.2. Fluorescencia y métodos de detección en sistemas Lab-On-a-Chip . . .	15
1.3. Ensayos enzimáticos	16
2. Fabricación y caracterización del microchip	19
2.1. Método de Litografía suave	19
2.2. Fabricación de los moldes	21
2.2.1. Litografía Óptica	21
2.2.2. Impresión en láminas de poliestireno termoplástico	25
2.3. Fabricación de las réplicas	28
2.4. Sellado del microchip	31
2.5. Caracterización dimensional de réplicas de PDMS	34
3. Arreglo Experimental	43
3.1. Elementos Ópticos	43
3.1.1. Filtros y espejos: principios de funcionamiento	43
3.1.2. Filtros y espejos empleados en el arreglo experimental	47
3.1.3. Lentes	53
3.2. Fuentes de luz	57

3.3. Detector	59
4. Caracterización del arreglo experimental	65
4.1. Consideraciones previas a la caracterización	65
4.2. Metodología para realizar los ensayos fluorescentes	67
4.2.1. Ensayos con flujos continuos	67
4.2.2. Curvas de sensibilidad obtenidas con flujos continuos	71
4.2.3. Discusión de los resultados	83
4.3. Ensayos fluorescentes con microgotas	85
4.3.1. Discusión de los resultados	87
5. Conclusiones y trabajo a futuro	91
6. Apéndices	97
6.1. Apéndice A: Programa de Matlab	97
6.2. Apéndice B: Artículo enviado a la conferencia latinoamericana de óptica y fotónica, LAOP 2012.	101
6.3. Apéndice C: Cartel presentado en el congreso de postgrado UNAM . .	105
6.4. Apéndice D: Fotografías de los soportes y del sistema.	107
Bibliografía	109

Índice de figuras

2.1. Esquema de litografía suave por la técnica molde-réplica. El molde es llenado con un prepolímero, como el PDMS, y después de polimerizar el dispositivo se retira del molde.	20
2.2. Esquema de la fabricación de moldes por fotolitografía. Arriba: exposición selectiva a luz ultravioleta. Abajo: molde después de ser revelado al remover la resina expuesta	22
2.3. Fabricación del molde por fotolitografía. 2.1.A Diseño del dispositivo en CAD, 2.1.B Máscaras para fotolitografía, 2.1.C “spinner” empleado en la generación de la película de resina fotosensible de Su8, 2.1.D Alineadora de mascararas para exposición a luz UV colimada.	23
2.4. Esquema de la vista lateral de una lámina de PST “Shrinky-Dinks” impresa con una impresora láser. Del lado izquierdo observamos la altura original de las microestructuras impresas y del lado derecho las mismas después de que la lámina se encoge en un horno.	26
2.5. Fabricación del molde en láminas de poliestireno termoplástico “Shrinky-Dinks” . 2.2.A Diseño del dispositivo en CAD, 2.2.B Impresión iterada en láminas de poliestireno termoplástico, 2.2.C Limpieza de residuos de tóner en la lámina, 2.2.D Reducción en un horno eléctrico	28
2.6. Efecto de reducción. Dispositivo antes y después de hornearlo	29

2.7. <i>Fabricación de réplicas y sellado del chip microfluídico. 2.4.A Kit de PDMS marca SYLGARD 184 , 2.4.B Campana de vacío para degasificar las réplicas de PDMS, 2.4.C Réplicas extraídas del molde de SU8, 2.4.D Horno de plasma empleado para activar las superficies que sellarán el chip microfluídico.</i>	30
2.8. <i>Esquema fabricación de réplicas y sellado</i>	32
2.9. <i>Activación de la réplica de PDMS y el porta objetos de vidrio que sellará el chip microfluídico.</i>	33
2.10. <i>Sistema Polytec MSA-400 para caracterización de MEMS ubicado en el laboratorio de pruebas y caracterización del centro UNAMems</i>	35
2.11. <i>Franjas de interferencia en un microcanal. Foto tomada desde la ventana de medición del software “Topography Measurement System” del equipo para caracterización de microdispositivos marca Polytec.</i>	37
2.12. <i>Canal microfluídico fabricado en laminas de poliestireno termoplastico .</i>	39
2.13. <i>Microcanal diseñado a 100 μm construido usando un molde fabricado en laminas de poliestireno termoplastico. 2.9.A Representación 3D de los puntos escaneados. 2.9.B Perfil transversal del micronal anchura 350 μm altura 49 μm.</i>	40
2.14. <i>Microcanal diseñado a 100 μm construido con un molde de Su8 . 2.11.B Perfil del canal de la réplica de PDMS, altura 95.76 μm, 2.11.C Perfil del canal de la réplica de PDMS, anchura 101 μm. Del lado izquierdo de los perfiles observamos varias lineas, éstas aparecen debido a la alta transparencia óptica que dificulta la medición para algunas geometrías.</i>	41
3.1. <i>Diagrama general del sistema</i>	44
3.2. <i>Diagrama de un filtro paso banda</i>	47

3.3.	<i>Espectro de transmisión de los filtros empleados en el arreglo. A. Espectro de transmisión del espejo dicroico solo refleja $470\lambda_{\dot{c}}490$ nm, (Semrock, Di01-R488-25x36) B. Espectro del filtro del sistema óptico del microscopio refleja $\lambda_{\dot{c}}660$ nm, (Semrock, FF660-Di02-25x36) C. Espectro de transmisión del filtro paso banda $500\lambda_{\dot{c}}550$ nm, (Semrock, FF03-525/50-25), D. Espectro de transmisión del filtro empleado en el sistema de iluminación $\lambda_{\dot{c}}635$ nm. (Semrock, BLP01-635R-25), (De la hoja de datos del fabricante)</i>	48
3.4.	<i>Divisor de haz. 50 de la luz incidente es reflejada y 50 es transmitida</i>	49
3.5.	<i>Divisor de haz dicroico, también llamado espejo dicroico. La luz cuya longitud de onda es λ_x es reflejada y el resto es transmitida</i>	49
3.6.	<i>Diagrama óptico de un microscopio fluorescente típico</i>	50
3.7.	<i>Diagrama óptico del arreglo fluorescente láser. 1 El espejo dicroico refleja el haz de luz láser, 2 el segundo espejo dicroico refleja el haz de luz láser y la luz emitida por fluorescencia, y permite el paso de la luz del sistema de iluminación del microscopio filtrada, 3 el filtro paso banda solo permite el paso de la luz emitida por fluorescencia, 4 el filtro permite iluminar el experimento con luz que no interfiere con el mismo.</i>	51
3.8.	<i>Diagrama óptico del arreglo fluorescente láser, que permite observar la fluorescencia en el microscopio. A diferencia del diagrama 3.7, en éste el espejo dicroico 1 y 2 son iguales, reflejan el haz láser pero dejan pasar la luz emitida por fluorescencia</i>	52
3.9.	<i>Diagrama óptico del arreglo fluorescente láser. 1 Lente plano-convexa que concentra la luz dispersa de la fluorescencia, 2 Objetivo del microscopio enfoca el haz del láser y captura la luz emitida por fluorescencia, 3 Ocular del microscopio permite observar una imagen virtual de mayor tamaño del experimento</i>	54

3.10. Espectro de transmisión del material del que esta fabricada la lente convergente (Thorlabs, LA-1951 N-BK7) (Tomado de la hoja de datos del fabricante)	54
3.11. Lente convergente usada para concentrar la luz de la fluorescencia	55
3.12. Diagrama de la apertura numérica de un objetivo	57
3.13. Diagrama óptico que muestra el desenfoco del haz del láser cuando se enfoca la muestra	58
3.14. Fotografía del láser empleado en el arreglo experimental	60
3.15. Diagrama óptico del arreglo fluorescente láser	61
4.1. Medición de fluorescencia, en esta se observa un aumento en la frecuencia de las perturbaciones de acuerdo al aumento en el flujo (las gráficas B y C fueron desplazadas verticalmente para observarlas simultáneamente). Condiciones: fluoresceína 5 μM , láser 8 mW, flujos: 50 ($\mu\text{L/h}$), 100 ($\mu\text{L/h}$) y 150 ($\mu\text{L/h}$).	70
4.2. Gráfica de intensidad (V) contra Potencia del Láser (mW), para los flujos de 50 ($\mu\text{L/h}$), 100 ($\mu\text{L/h}$), 150 ($\mu\text{L/h}$), 200 ($\mu\text{L/h}$) y fluoresceína con una concentración de 1 (μM). Abajo se muestra la desviación estándar de las lecturas.	72
4.3. Gráfica de intensidad (V) contra Flujo ($\mu\text{L/h}$), para las potencias de láser de 4 (mW), 6 (mW), 8 (mW) y 10 (mW) y fluoresceína con una concentración 1 (μM). Abajo se muestra la desviación estándar de las lecturas.	73
4.4. Gráfica de intensidad (V) contra Potencia del Láser (mW), para los flujos de 50 ($\mu\text{L/h}$), 100 ($\mu\text{L/h}$), 150 ($\mu\text{L/h}$), 200 ($\mu\text{L/h}$) y fluoresceína con una concentración de 5 (μM). Abajo se muestra la desviación estándar de las lecturas	74

4.5. <i>Gráfica de intensidad (V) contra Flujo ($\mu\text{L/h}$), para las potencias de láser de 4 (mW), 6 (mW), 8 (mW) y 10 (mW) y fluoresceína con una concentración de 5 (μM). Abajo se muestra la desviación estándar de las lecturas.</i>	76
4.6. <i>Gráfica de intensidad (V) contra Potencia del Láser (mW), para los flujos de 50 ($\mu\text{L/h}$), 100 ($\mu\text{L/h}$), 150 ($\mu\text{L/h}$), 200 ($\mu\text{L/h}$) y fluoresceína con una concentración de 10 (μM). Abajo se muestra la desviación estándar de las lecturas.</i>	77
4.7. <i>Gráfica de intensidad (V) contra Flujo ($\mu\text{L/h}$), para las potencias de láser de 4 (mW), 6 (mW), 8 (mW) y 10 (mW) y fluoresceína con una concentración de 10 (μM). Abajo se muestra la desviación estándar de las lecturas.</i>	78
4.8. <i>Gráfica de intensidad (V) contra Potencia del Láser (mW), para los flujos de 50 ($\mu\text{L/h}$), 100 ($\mu\text{L/h}$), 150 ($\mu\text{L/h}$), 200 ($\mu\text{L/h}$) y fluoresceína con una concentración de 50 (μM). Abajo se muestra la desviación estándar de las lecturas.</i>	79
4.9. <i>Gráfica de intensidad (V) contra concentración (μM), para los flujos de 50 ($\mu\text{L/h}$), 100 ($\mu\text{L/h}$), 150 ($\mu\text{L/h}$), 200 ($\mu\text{L/h}$) y potencia de 10 mW. Abajo la desviación estándar de las lecturas</i>	81
4.10. <i>Gráfica de intensidad (V) contra concentración(μM), para los flujos de 50 ($\mu\text{L/h}$), 100 ($\mu\text{L/h}$), 150 ($\mu\text{L/h}$), 200 ($\mu\text{L/h}$) y potencias de láser de 4, 6 y 8 (mW)</i>	83
4.11. <i>Chip microfluídico empleado para formar microgotas. El ancho y la profundidad del microcanal es de 100 μm. En la parte superior se encuentra la entrada de aceite, en medio las entradas de los compuestos a ensayar, en este caso se uso una solución de fluoresceína. Después del serpentín se encuentra la salida.</i>	86

4.12. <i>Ensayos fluorescentes con microgotas. A) Gráfica de intensidad de fluorescencia contra tiempo, condiciones: fluoresceína 100 ($\mu\text{L/h}$), aceite mineral 100 ($\mu\text{L/h}$), láser 8 mW, fluoresceína 10 μM. B) Gráfica del valor promedio de la intensidad para cada una de las microgotas contra microgotas. C) Intensidad de fluorescencia contra tiempo, condiciones: fluoresceína 100 ($\mu\text{L/h}$), aceite mineral 300 ($\mu\text{L/h}$), láser 8 mW, fluoresceína 10 μM. D) Gráfica del valor promedio de la intensidad para cada una de las microgotas contra microgotas.</i>	88
4.13. <i>Ensayos fluorescentes con microgotas. A) Gráfica de intensidad de fluorescencia contra tiempo, condiciones: fluoresceína 300 ($\mu\text{L/h}$), aceite mineral 100 ($\mu\text{L/h}$), láser 8 mW, fluoresceína 10 μM. B) Gráfica del valor promedio de la intensidad para cada una de las microgotas contra microgotas. C) Intensidad de fluorescencia contra tiempo, condiciones: fluoresceína 3000 ($\mu\text{L/h}$), aceite mineral 3000 ($\mu\text{L/h}$), láser 8 mW, fluoresceína 10 μM. D) Gráfica del valor promedio de la intensidad para cada una de las microgotas contra microgotas.</i>	89
6.1. <i>Página 1/3 del código de MatLab empleado.</i>	98
6.2. <i>Página 2/3 del código de MatLab empleado.</i>	99
6.3. <i>Página 3/3 del código de MatLab empleado.</i>	100
6.4. <i>Página 1/3 del artículo enviado a la conferencia latinoamericana de óptica y fotónica</i>	102
6.5. <i>Página 2/3 del artículo enviado a la conferencia latinoamericana de óptica y fotónica</i>	103
6.6. <i>Página 3/3 del artículo enviado a la conferencia latinoamericana de óptica y fotónica</i>	104
6.7. <i>Cartel presentado en congreso de alumnos de posgrado UNAM</i>	106
6.8. <i>SopORTE diseñado y maquinado del filtro paso largas empleado en el sistema de iluminación del microscopio.</i>	107

6.9. <i>Láser fijado a la mesa mediante soportes fabricados a medida.</i>	107
6.10. <i>Fotografía del sistema implementado.</i>	108

Resumen

El desarrollo de sistemas microfluidicos ha conducido a una importante mejora en el rendimiento de los ensayos químicos, biológicos y médicos. Esto crea la necesidad de mejorar, adaptar, desarrollar y caracterizar la tecnología empleada en los actuadores y sensores empleados en dichos sistemas. Por otro lado las técnicas y materiales de fabricación empleados en la construcción de los dispositivos microfluidicos deben ser compatibles con los ensayos realizados y la tecnología para realizar las mediciones.

En este trabajo se construyó un dispositivo microfluidico de polidimetil siloxano (PDMS) capaz de formar microgotas por la técnica de litografía suave. Los moldes empleados para crear dicho dispositivo fueron construidos usando dos técnicas, en la primera se transfirió un patrón empleando una impresora común en laminas de poliestireno termoplástico, en la segunda se empleó la resina foto sensible SU-8 en la técnica conocida como fotolitografía.

Los moldes y dispositivos fabricados por las dos técnicas fueron caracterizados usando un interferómetro de luz blanca.

Para realizar los ensayos fluorescentes se implementó un sistema de fluorescencia inducida por láser (LIF), que consta de un diodo láser, un arreglo óptico para conducir el haz de luz láser que estimula la fluorescencia y conduce la luz emitida por la muestra fluorescente, un detector, conformado por un fotodiodo de efecto avalancha pre-amplificado, y un sistema de adquisición de datos, que consta de una tarjeta de adquisición que envía la información a una computadora la cual procesa y almacena las señales sensadas por el detector.

Se realizaron ensayos fluorescentes con flujos constantes y en microgotas con la finalidad de caracterizar la respuesta del sistema al modificar parámetros como la concentración de la muestra fluorescente, la velocidad de flujo y la potencia del láser empleada para estimular la muestra.

Abstract

The developments of microfluidic systems have improved the performance of chemical, biological and medical assays. This have lead to new challenges such as, improve, develop and characterize the technology involved in microfluidic systems. Also is important to consider that the materials and fabrication techniques need to be suitable for the assays performed, and compatible with the instrumentation available.

On this thesis a microfluidic chip capable of micro droplet formation was constructed of polydimethyl siloxane (PDMS), by soft lithography. The master molds used were built by two techniques, on the first one, the design was transferred with a common printer over thermoplastic sheets, and on the other one a SU-8 photo resist was used in the technique known as photolithography. The microfluidic chips were dimensionally characterized by white light interferometer.

To perform the fluorescent assays a laser induced fluorescence (LIF) system, was implemented. The system consist of a laser diode, an opticalsetup to conduce the laser beam and collect the fluorescent light and an avalanche photodiode which detect the light and send a voltage signal to an acquisition card, this card finally send the data to a computer where are processed and stored.

To know the system response, assays with continuous flow and microdroplets were performed varying, laser power, fluorophore concentration andflow rate.

Introducción

Esta tesis consiste en la implementación de un sistema láser que permita la detección y cuantificación de la fluorescencia emitida por micro gotas formadas de una solución de fluoresceína dentro de un micro-canal. Dicho trabajo surge de la colaboración en el proyecto del Dr. Luis Olguín de la Facultad de Química de la UNAM, en este se pretende encontrar compuestos potencialmente inhibidores de la enzima neuraminidasa la cual es fundamental en la replicación del virus de la influenza [1] [2].

La identificación de estos compuestos se logra a través de ensayar 3 reactivos (enzima, sustrato e inhibidor) que constituyen una microgota. Como resultado de la reacción se forman residuos y un producto fluorescente cuya existencia e intensidad luminiscente indica la acción y eficiencia del inhibidor sobre la enzima. Dicho producto es cuantificado al medir la intensidad de la fluorescencia inducida por una fuente de luz monocromática [2] .

Planteamiento del problema

Se plantea implementar un sistema que permita detectar la fluorescencia de micro gotas, en respuesta a la necesidad creciente de tener un método eficaz, económico y rápido para el análisis de colecciones de compuestos que son potencialmente útiles en el desarrollo de fármacos [2] [3]. Este sistema de fluorescencia en micro gotas tiene la ventaja de poder realizar ensayos a mayor velocidad y en un espacio pequeño, lo cual reduce la cantidad de reactivos a utilizar. Para llevar a cabo la medición de fluorescencia, se propone implementar un tren óptico que permita la conducción, alineación y enfoque

de un haz láser sobre un micro canal en el cual circularán micro gotas. El haz de luz láser estimulara la fluorescencia y se utilizará un fotodiodo de avalancha para medirla.

Objetivos

Generales:

- Implementar un sistema láser que permita estimular y cuantificar la fluorescencia generada por el producto de reacciones químicas dentro de microgotas, las cuales se generan dentro de un circuito microfluídico y viajan a través de él.

Específicos:

- Fabricar y caracterizar un chip microfluídico para realizar ensayos fluorescentes en flujos constantes y en microgotas.
- Montar un arreglo óptico experimental de fluorescencia estimulada por láser.
- Realizar ensayos fluorescentes con flujos continuos y con microgotas para caracterizar la respuesta del sistema a la variación de los parámetros de concentración de fluoresceína, potencia del láser y velocidad del flujo.

Organización de los capítulos

En el primer capítulo se presenta una reseña de la historia y el estado de arte del la tecnología MEMS y en particular de la microfluidica, así como de su aplicación en los sistemas Lab on a Chip.

En el segundo capítulo se presentan, en forma resumida, las tecnologías de microfabricación comunes en la construcción de moldes y dispositivos microfluídicos; además se describe el proceso de fabricación empleado y se presentan los resultados de la caracterización de los chips microfluidicos empleados.

En el tercer capítulo se describen los principios teóricos de los elementos ópticos que conforman el arreglo experimental usado para estimular y medir fluorescencia y se describe con detalle el arreglo experimental propuesto.

En el cuarto capítulo se presenta la historia y la metodología de los ensayos fluorescentes realizados, así como las curvas de caracterización del arreglo experimental.

En el quinto capítulo se presentan las conclusiones y se propone el trabajo a futuro.

Capítulo 1

Antecedentes Generales

Se considera que el descubrimiento del transistor marcó el inicio de la revolución de las telecomunicaciones y la electrónica, produciendo un acelerado desarrollo tecnológico en dichas áreas [4]. El transistor logró reducir el tamaño de los dispositivos electrónicos al mismo tiempo que disminuyó el consumo de energía y aumentó su capacidad de procesamiento. Este proceso de miniaturización, que se cree inició con el primer transistor de punta de contacto, no se ha visto interrumpido, por el contrario ha creado toda una tendencia que busca usar eficientemente los recursos y el espacio. Para continuar con la miniaturización de los dispositivos electrónicos ha sido necesario desarrollar y emplear técnicas y procesos de fabricación más complejos en su manufactura. Dichos procesos han influido en otras áreas, incluso dieron lugar a conceptos y aplicaciones que no existirían sin ellos. Un ejemplo de lo anterior son los micro sistemas electromecánicos (MEMS). Richard Feynman en su famosa charla de 1959 “Existe mucho lugar en el fondo” fue el primero en notar que por medio de las capas de material de sacrificio, hoy en día fundamentales para la fabricación de dispositivos microelectrónicos de silicio, se podía producir una fuerza electrostática y ésta podía ser usada para accionar motores micrométricos[5][6].

El nombre de MEMS no tienen una definición única. Maluf [7] dice que MEMS puede referirse a:

- Un portafolio de técnicas y procesos para diseñar y crear sistemas miniatura.
- Un producto físico frecuentemente especializado y único para una aplicación.
- “Es una forma de hacer cosas”. Esas “cosas” pueden combinar funciones de sensado, actuación, cómputo y comunicación para controlar en forma local parámetros físicos a micro escala, aunque sus efectos pueden ser a mucho mayor escala.

En general un dispositivo MEMS es un sistema miniatura, embebido, que incluye uno o varios elementos micromaquinados. En la actualidad, los MEMS han alcanzado éxito en el ámbito académico-científico e incluso el comercial, sin embargo, la gran mayoría de estos MEMS son en realidad subsistemas o componentes que realizan una sola función (muchos son sensores) y no sistemas completos como su nombre sugiere. El éxito de los futuros micro sistemas electromecánicos completos (sensor, acondicionador de señal, procesador de señales y actuador) depende del éxito en la capacidad para integrar los MEMS de estos días en sistemas completos[7].

Una de las primeras aplicaciones de los MEMS apareció a finales de la década de los 70 cuando compañías dedicadas a hacer circuitos integrados fabricaron los primeros sensores de presión integrados. A principios de los 80 estos sensores contaban con todo el circuito electrónico de acondicionamiento[8].

Actualmente, los MEMS tienen una gran cantidad de aplicaciones dentro de las que destacan los acelerómetros del circuito de control de las bolsas de aire en los automóviles, los arreglos de micro espejos en los proyectores, los microscopios de escaneo de electrones para observar un átomo y los micro intercambiadores de calor para dispositivos electrónicos[10].

Desde su aparición, los MEMS han evolucionado, separándose en cierta medida de los procesos de la microelectrónica y han cobrado su propia importancia.

En la actualidad, se siguen usando los materiales y procesos propios de la microelectrónica como base, pero también se han explorado nuevos materiales y técnicas de fabricación que han permitido aplicaciones nuevas. Materiales como los polímeros son ahora comunes en la fabricación de MEMS. El funcionamiento y aplicación de estos MEMS salen de su definición original, pues muchos de los MEMS fabricados en políme-

ros no cuentan con elementos eléctricos o mecánicos propiamente, un ejemplo de este tipo de dispositivos son los chips microfluídicos.

1.1. Sistemas Microfluídicos y Lab on a Chip

Como se mencionó, los chips microfluídicos son un tipo de MEMS donde no siempre existen partes electromecánicas. Las principales funciones de la microfluídica son conducir, almacenar, combinar y separar sustancias por medios activos o pasivos. Haciendo una analogía, los chips microfluídicos son el equivalente a los circuitos integrados basados en el transistor, y los laboratorios industriales en el área de bioquímica serían el equivalente de las computadoras constituidas por circuitos electromecánicos y bulbos. De esta forma la revolución de los chips microfluídicos en las áreas de química, biología y medicina es comparable con la que produjeron los circuitos integrados en el procesamiento de señales, el siglo pasado. De hecho, ya se conocen y usan aplicaciones que tienen un impacto importante como es el secuenciado del genoma[4].

Si bien los chips microfluídicos y los circuitos integrados tienen similitudes, también tienen varias diferencias y se enfrentan a problemas diferentes. Los procesos de fabricación que han permitido a la electrónica reducir gradualmente el tamaño de los componentes por más de cuatro décadas, permitieron también reducir el tamaño de los chips microfluídicos, sin embargo, los dispositivos microfluídicos se han aproximado a su límite de funcionamiento en menos de dos décadas. Esto se debe a que los fenómenos físicos que permiten el funcionamiento de los transistores empiezan a afectarse solo cuando el tamaño de los dispositivos es de unos cuantos nanómetros, en cambio en los chips microfluídicos el comportamiento de los fluidos cambia dramáticamente cuando las dimensiones se aproximan a unos micrómetros[4].

Para entender por qué ocurre lo anterior, las leyes de escalamiento nos muestran el cambio o variación de una cantidad física respecto a su longitud, dejando constantes el resto de las variables como pueden ser tiempo, presión, temperatura, etc. Como consecuencia de lo anterior, las fuerzas volumétricas (l^3), como la gravedad y la inercia;

y las de área (l^2), como la tensión superficial y la viscosidad, escalan diferente. De esta forma, las fuerzas volumétricas que tienen un impacto preponderante en nuestra vida diaria, resultan menos importantes conforme reducimos el tamaño de los chips mientras que las fuerzas de superficie cobran importancia[11].

Un ejemplo de lo anterior es el transporte de masa, que en los chips microfluídicos se lleva a cabo principalmente por disipación viscosa, mientras los efectos de inercia son despreciados. La inercia es responsable de fenómenos no lineales, como la inestabilidad y turbulencia, esto hace que la dinámica no lineal de fluidos en microcanales pueda parecer poco interesante pues en general el flujo siempre tiende a ser laminar[4].

Osborne Reynolds descubrió que la razón en las fuerzas inerciales y las viscosas son un buen indicador del régimen que tendrá un fluido. El índice se define como:

$$Re = \frac{\text{Fuerzas inerciales}}{\text{Fuerzas viscosas}} = \frac{\rho V_0 L_0}{\mu} \quad (1.1)$$

Donde :

ρ = Densidad del fluido, V_0 = Velocidad característica, L_0 = Longitud característica, μ = Viscosidad del fluido

Paradójicamente, el índice de Reynolds, uno de los más mencionados en la microfluídica, es de poco interés dentro de ésta, pues virtualmente todos los microfluidos caen en el régimen laminar. Se han hecho reseñas, como la de Purcell "Life at low Reynolds number", donde se presenta que la idea intuitiva de que los flujos son turbulentos, como ocurre en el mundo macro, se debe descartar al trabajar en microfluídica[4].

El índice de Reynolds para un dispositivo microfluídico común, que usa agua como fluido de trabajo, con una velocidad de fluido entre $1 \frac{\mu m}{s}$ y $1 \frac{cm}{s}$, y un canal cilíndrico con un radio entre 1-100 μm , está entre 1×10^{-6} y 10. Esto indica que el flujo es laminar pues el valor del índice de Reynolds en el que un flujo empieza a ser turbulento se encuentra entre 2000 y 3000[4][8].

El hecho de que los fenómenos físicos que rigen a los fluidos en los microcanales

sean tan diferentes a los que observamos en el mundo macro abre la posibilidad a aplicaciones únicas y hace su estudio más relevante. En la actualidad, la mayoría de las aplicaciones de los chips microfluídicos se encuentran en el área médico-biológica; sin embargo, existen aplicaciones en física, en sistemas de control y en transferencia de calor [4]. Un ejemplo de este tipo de dispositivos, que es de uso común hoy en día, es el cartucho de las impresoras de inyección de tinta. Este cartucho consiste de un pequeño dispositivo fabricado en silicio que consta de un contenedor, el cual tiene en una de sus paredes un micro calentador que evapora la tinta cercana a éste formando una burbuja. Así mismo, esta burbuja ejerce una presión sobre la tinta expulsándola por una pequeña abertura[12].

La fabricación de chips microfluidicos inició modificando procesos de la micro electrónica como el resto de los MEMS. Uno de los primeros dispositivos de este tipo fue publicado en diciembre de 1979 por Terry et al. con el título de “A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer” [9] . Se trata de un sistema de análisis de gases basado en los principios de la cromatografía de gases. Fue construido de silicio usando las técnicas de fotolitografía y grabado químico usadas en los dispositivos electrónicos. Dicho método de fabricación permitió que sus dimensiones fueran reducidas cerca de tres órdenes de magnitud en comparación con los sistemas convencionales.

A partir de entonces, se han explorado nuevos materiales, siendo ahora los polímeros los más comunes para fabricar chips microfluídicos. Esto obedece a que en los dispositivos microfluidicos rara vez se buscan las características semiconductoras y mecánicas del silicio. En cambio, los polímeros ofrecen la posibilidad de contar con dispositivos con las siguientes características: se pueden fabricar con técnicas de fabricación más baratas y accesibles; desechables debido a su bajo costo de replicación, que trae consigo la ventaja adicional de evitar la contaminación cruzada; tienen una alta biocompatibilidad; y alta transparencia óptica, lo que permite usarlos en sistemas de detección ópticos[4][12].

Gracias a las mejoras en diseño, técnicas de fabricación y materiales, sus aplicaciones han ido en creciente aumento. La tendencia actual de los chips microfluídicos es

integrar varios módulos funcionales en un dispositivo, como el sensor, el actuador y el acondicionador de la señal dentro de un mismo sistema pero ahora microfluídico. A este tipo de dispositivos se les conoce como “Micro Total Analysis System” o bien, “Lab-on-a-Chip”. Como concepto es relativamente nuevo propuesto por Manz et al [13], sin embargo los primeros esbozos llevan ya un tiempo en desarrollo a nivel investigación. En 1954 Joshua Lederberg publicó “Un método simple para separar individualmente microbios”. Unos años más tarde Rotman publicó un estudio realizado sobre la actividad enzimática en microgotas. Lederberg vislumbró que la aplicación de microgotas para cualquier ensayo que requiriera volúmenes pequeños sería de uso común en los laboratorios, sin embargo a esta visión le tomo casi 50 años convertirse en realidad[14].

Los sistemas Lab-on-a-chip se pueden ver como una generalización de los circuitos electrónicos integrados pues, además de componentes electrónicos, cuenta con elementos mecánicos, ópticos, canales microfluidicos, etc. [11].

Actualmente la tecnología Lab-on-a-chip tiene aplicaciones en diferentes áreas, algunas de estas son: ingeniería de células metabólicas, producción de biocombustibles, biología sintética, muestreo y ensayos enzimáticos, etc. [18]. Sobre esta última giramos nuestra atención.

Las enzimas son moléculas que presentan actividad bioquímica y son muy valiosas en las industrias farmacéutica, de detergentes, bioenergética y alimenticias. Uno de los avances logrados gracias a la tecnología Lab-on-a-chip es la evolución dirigida, que permite imitar la evolución natural de las enzimas. Para ello se parte de una biomolécula conocida e iterando procesos de diversificación mediante mutación y selección se localizan variantes de interés[18].

1.2. Fluorescencia y métodos de detección en sistemas Lab-On-a-Chip

Hoy en día existen dos métodos principales de detección que se han implementado en los sistemas Lab-On-a-Chip, el primero es el eléctrico típicamente basado en fenómenos como la impedancia y el segundo es el óptico comúnmente basado en fluorescencia [15][16]. Ambos métodos tienen la ventaja de ser no invasivos, sin embargo los métodos ópticos presentan la ventaja de tener mayor sensibilidad, selectividad y resolución [15][20].

En particular una de las ventajas de los métodos ópticos basados en fluorescencia es que permiten una disminución en el tamaño de la muestra, incluso usar una sola molécula [20]. La fluorescencia es el proceso por el cual las moléculas de ciertos materiales, llamados fluoróforos, son excitadas por luz de una longitud de onda e inmediatamente dicha molécula emite luz de una longitud de onda diferente. Dicho proceso puede dividirse en 3 etapas. En la primera, un fotón es absorbido por el fluoróforo incrementando su energía y llevándola a un estado excitado. En la segunda etapa el fluoróforo permanece excitado en un estado llamado tiempo de vida de fluorescencia, que dura típicamente entre 1 y 10 ns. Finalmente, en la tercera etapa el fluoróforo regresa a un estado de menor energía emitiendo un fotón de mayor longitud de onda.[17]

Un ejemplo de un fluoróforo típico es la fluoresceína, la cual tiene un máximo de absorción en 490 nm y un máximo de emisión en 513 nm. Este cambio entre la longitud de onda de absorción y emisión se conoce como cambio Stokes y permite con la ayuda de un filtro, separar la luz empleada en la excitación del fluoróforo, de la emitida por la fuente fluorescente. El tiempo de vida de la fluorescencia (típico de 1 a 10 ns), frente a la velocidad de flujo típica de un chip microfluidico (como se menciono entre $1 \frac{\mu m}{s}$ y $1 \frac{cm}{s}$), permite excitar la muestra fluorescente en forma eficaz cuando se encuentra circulando dentro de un chip microfluidico.

Es común que los fluoróforos estén asociados a moléculas “jaula” que los rodean e impiden que emitan fluorescencia. Cuando ocurre una reacción química la molécula jaula

es modificada liberando al fluoróforo, así cuando éste es excitado emite fluorescencia y no antes. De esta forma los fluoroforos pueden ser usados como indicadores de una reacción entre algún reactivo y la molécula fluoroforo-jaula[17].

Un fenómeno indeseado cuando se cuantifica fluorescencia es el foto-blanqueo o “Photobleaching”. Dicho fenómeno se presenta cuando las moléculas del fluoróforo son sobre expuestas a la radiación de excitación pierden su capacidad fluorescente. La sobre exposición ocurre cuando la dosis de radiación que incide en el fluoróforo rebasa el umbral de foto blanqueo. Dicha dosis de radiación depende de la intensidad misma y de su duración, de esta forma una intensidad de radiación baja por periodos demasiado largos o una intensidad muy alta por periodos cortos producirán fotoblanqueo.

Los sistemas fluorescentes que usan como fuente de excitación un haz de luz láser se conocen como sistemas LIF por las siglas en ingles Laser Induced Fluorescence. Estos sistemas permiten combinar la técnica de fluorescencia con los sistemas microfluidicos para realizar ensayos enzimáticos exhaustivos, cristalización de proteínas, expresiones enzimaticas entre otros [22][23].

1.3. Ensayos enzimáticos

Los ensayos enzimáticos son reacciones bioquímicas que ocurren entre una enzima y diversos compuestos, con el propósito de observar su dinámica. Este tipo de pruebas son de gran utilidad en varias áreas, como en el desarrollo de fármacos, de bio-combustibles, de detergentes etc. [18]. En el caso del virus de la influenza, la enzima neuraminidasa es indispensable para su proceso de replicación, de tal forma que la efectividad de los antivirales contra la influenza se pueden encontrar midiendo su actividad enzimática.

Existen varios métodos para evaluar la actividad enzimática. Whetherall realizó ensayos fluorescentes y quimioluminiscentes para evaluar la actividad enzimática de la neuraminidasa [1]. Los ensayos enzimáticos requieren de una enzima, que es una molécula con una región activa y un sustrato que una sustancia cuyas moléculas son compatibles e interactivas con la enzima. La interacción ocurre cuando el sustrato se une al sitio ac-

tivo de la enzima, esta unión genera una reacción química tras la cual ciertas moléculas del sustrato se desprenden formando un producto, ocurrido esto la región activa de la enzima se desprende del producto y queda libre para reaccionar con mas sustrato. Uno de los sustratos mas usado para medir la inhibición enzimática de la enzima neuraminidasa, un motivo de la realización de la presente tesis, es el acido 2-metillumbelliferil- α -D - N- acetilneuraminico[1]. La fluorescencia es uno de los métodos mas frecuentemente usados para visualizar las expresiones proteínicas o las reacciones enzimáticas. [36]Esta técnica es común para la observación de flujos e identificación de sustancias en los dispositivos Lab-on-a-chip. [26] [27]

La exploración de la diversidad molecular en las áreas biológicas y químicas va en aumento. [19]. Desde hace varios años se realizan ensayos bioquímicos automatizados de grandes colecciones de compuestos naturales que permiten encontrar sustancias potencialmente útiles. En enfermedades como el cáncer y las infecciosas, mas del 60 por ciento de los fármacos desarrollados entre 1981 y 2002 tuvieron un origen natural[3]. Sin embargo, los sistemas robóticos para ensayo automatizado de reacciones químicas, presentes en la industria y algunos laboratorios académicos, requieren de una inversión considerable en instalaciones y su mantenimiento es costoso, teniendo como consecuencia un uso limitado [19]. Además de su alto costo, este método presenta limitaciones en dos aspectos. El primero de ellos se refiere a la velocidad para realizar los ensayos bioquímicos, la cual depende principalmente de los elementos mecánicos de los robots. El segundo limitante es que no es posible reducir el volumen de los reactivos empleados debido a la evaporación y las fuerzas capilares. [?] [27]

Por otro lado, la generación y control de micro-gotas dentro de dispositivos micro-fluídicos brinda la posibilidad de realizar ensayos bioquímicos con ventajas frente a los instrumentos de análisis actuales. Entre ellas están: reducir la cantidad de reactivos, realizar los ensayos en ambientes reducidos, fabricar sistemas en paralelo, reducir el tiempo de los ensayos, reducir el costo de los ensayos [37] [27]. Las micro-gotas formadas dentro de micro canales funcionan como biocontenedores artificiales micrométricos [2][27]. Estos micro-biocontenedores reducen la complejidad de un microorganismo vivo

a las dos propiedades básicas necesarias para que se lleve a cabo un ensayo enzimático que son: compartimentalización y expresión proteínica *in vitro*[2]. Lo anterior indica que, además de las ventajas presentadas frente a los sistemas automatizados con robots, las microgotas tienen características clave que las hacen medios ideales para la realización de ensayos bioquímicos[14], entre estas están: proveer un compartimiento aislado donde realizar el experimento [38] [36], tener baja dispersión, lo cual permite realizar ensayos cuantitativos [19], permitir trabajar con una sola célula, requerir cantidades muy pequeñas de reactivos o moléculas[27], esto último abre la posibilidad de realizar grandes cantidades de experimentos[27] manteniendo un bajo costo en los reactivos.

Como se mencionó, la reducción de reactivos es considerable. Las microgotas con diámetros de entre 10 μm y 200 μm corresponden a volúmenes entre 0.5 pL y 4 nL. Esto representa una disminución de hasta 100 000 veces comparado con los robots manipuladores de líquidos usados actualmente, los cuales usan muestras de $\sim 0.1 \mu\text{L}$. [19]. Esta enorme disminución del volumen tiene importantes repercusiones en el costo de un ensayo enzimático, por ejemplo en la evolución dirigida de la enzima “Horseradish peroxidase” se usarían alrededor de 5,000 L de reactivos con la técnica actual, frente a los 150 μL de reactivos que se requieren empleando microgotas[27]. Debido al alto costo que tiene sintetizar el sustrato, la cantidad de materiales usados, el costo del equipo y el tiempo que tarda un ensayo, el costo puede alcanzar 15 millones de dólares frente a los 4 dólares que podría costar un ensayo empleando microfluídica. [27]

Por todo lo anterior es muy importante contar con un arreglo experimental que permita realizar y cuantificar de manera controlada y sistemática la actividad química dentro de microgotas.

Capítulo 2

Fabricación y caracterización del microchip

Como se comentó en la introducción, la construcción de los MEMS comenzó con procesos modificados de la microelectrónica. Los dispositivos microfluídicos no fueron la excepción. El que se considera fue el primer dispositivo microfluídico, fue construido sobre una oblea de silicio. Si bien el silicio exhibe propiedades útiles en los chips microfluídicos, como son: buenas propiedades mecánicas, métodos de fabricación precisos y capacidad para integrar circuitos microelectrónicos; los altos costos de fabricación, la baja biocompatibilidad, la dificultad para sellar los chips y hacer conexiones debido a su rigidez, entre otros, han impulsado la búsqueda de nuevos materiales y procesos de fabricación. Uno de estos nuevos procesos es la fabricación de dispositivos microfluídicos mediante moldes y réplicas conocido como litografía suave.

2.1. Método de Litografía suave

La litografía suave se refiere a un conjunto de técnicas de fabricación de MEMS, que a diferencia de las heredadas de la microelectrónica, las cuales se basan en secuencias de depósito de materiales, fotolitografía y ataque químico; usan la inyección o moldeo de réplicas construidas en materiales flexibles formados por moléculas orgánicas, como

son los polímeros, en lugar de los materiales inorgánicos rígidos como el silicio, metales etc., que son comunes en la microelectrónica y otras áreas.

Dentro de las técnicas que conforman la litografía suave podemos destacar impresión por microcontacto (μ CP por sus siglas en inglés), moldeo de microtransferencia (uTM por sus siglas en inglés) y molde-réplica (REM). Dichas técnicas son llamadas suaves por que tienen en común un elastómero, ya sea que el molde esté construido de este, como en la impresión por microcontacto, o bien obteniendo dispositivos réplica de elastómero, empleando moldes fabricados por otro método, como en el caso de técnica molde-réplica.

La técnica de impresión por micro contacto consiste en el estampado sobre una superficie con una sustancia de interés, utilizando un micro molde fabricado con un polímero elastomérico como el PDMS. La “tinta” o sustancia se transfiere a la superficie por contacto. Usando esta técnica se logran resoluciones de aproximadamente 50 nm. [39]

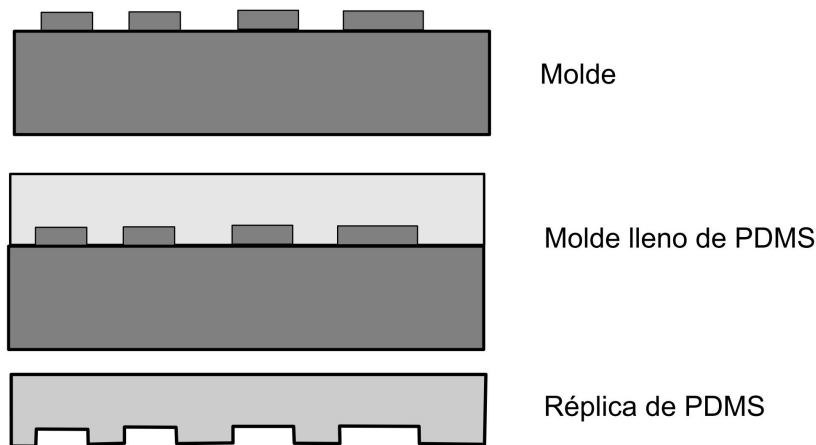


Figura 2.1: Esquema de litografía suave por la técnica molde-réplica. El molde es llenado con un prepolímero, como el PDMS, y después de polimerizar el dispositivo se retira del molde.

El moldeo de microtransferencia consiste en llenar un molde con un pre-polímero en forma líquida y retirar el exceso empleando una superficie plana o un chorro de gas

inerte, como el nitrógeno. Después el molde relleno se pone en contacto con un sustrato, y con ayuda de calor o radiación, se transfiere el polímero ya curado al sustrato.[39]

La técnica de molde-réplica es la más usada en microfluídica [29]. Consiste en fabricar réplicas de un molde vertiendo un pre-polímero en forma líquida y dejándolo curar en el molde. El uso de esta técnica ofrece varias ventajas. La primera de ellas es que no requiere de laboratorios costosos y altamente especializados, como los empleados en la fabricación de microelectrónica. Permite la fabricación de dispositivos en materiales que no son compatibles con los procesos tradicionales. La resolución de la réplica está limitada únicamente por las fuerzas de van der Waals, la viscosidad del fluido y el correcto llenado del molde. La resolución que se consigue es menor que la obtenida en la litografía óptica, que oscila entre 100 nm y 400 nm dependiendo del sistema y la longitud de onda empleada[39]. Una de las principales desventajas es que requiere de un molde hecho con alguna otra tecnología de fabricación, la más común y exitosa es la fotolitografía. [29]

2.2. Fabricación de los moldes

La fabricación de los moldes se puede hacer por varias aproximaciones. Durante el desarrollo experimental de esta tesis se emplearon dos métodos para su obtención: fotolitografía óptica en una resina fotosensible (SU-8) e impresión sobre láminas de poliestireno termoplástico(PST).

2.2.1. Litografía Óptica

La litografía óptica es un proceso a través del cual se transfiere un patrón a un sustrato controlando la exposición de luz ultravioleta que incide en una película de resina fotosensible tal como se observa en la figura 2.2. Los pasos generales que conforman el proceso fotolitográfico son:

- Preparación de la superficie

- Formación de la película de resina fotosensible en el plato giratorio (figura 2.3.C)
- Horneado ligero de la película de resina fotosensible
- Alineación del sustrato con la resina fotosensible y la máscara que contiene el patrón de exposición de luz ultravioleta.
- Exposición a una fuente de luz ultravioleta colimada por un tiempo controlado (figura 2.3.D)
- Horneado fuerte de la resina fotosensible.
- Revelado del patrón transferido usando el solvente adecuado.

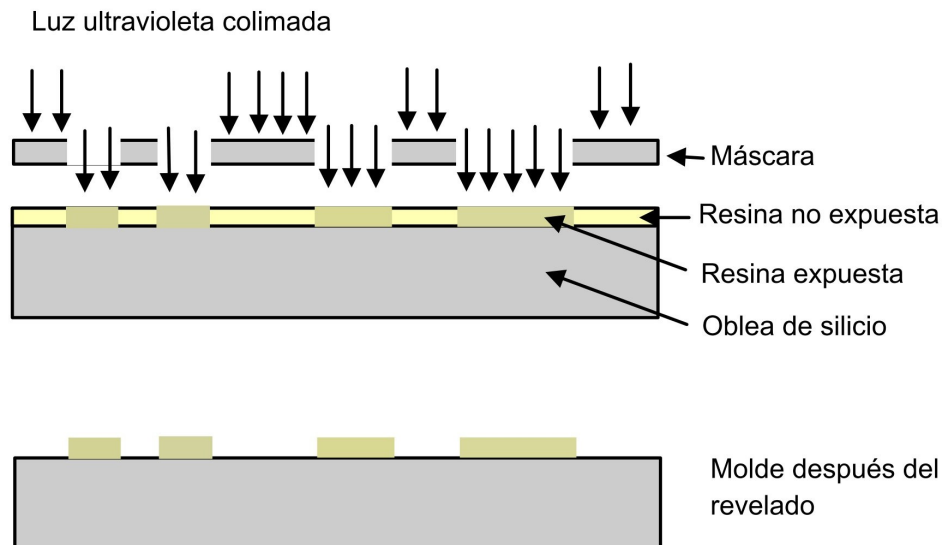


Figura 2.2: *Esquema de la fabricación de moldes por fotolitografía. Arriba: exposición selectiva a luz ultravioleta. Abajo: molde después de ser revelado al remover la resina expuesta*

Dependiendo de las características de la resina foto sensible, la luz ultravioleta puede formar enlaces en la resina endureciéndola y fijándola al sustrato como ocurre en el caso de la resina fotosensible negativa o bien puede romper los enlaces y permitir su fácil

remoción en el caso de la resina positiva.

La exposición de la resina fotosensible a la luz ultravioleta (usualmente en el rango de 200 nm a 450 nm) puede ser de tres tipos: de contacto, de proximidad o de proyección. En la exposición por contacto, la máscara se coloca directamente sobre la resina fotosensible, lo que disminuye la vida útil de la máscara. Sin embargo, es un sistema sencillo y logra una resolución típica de $2 \mu m$ [7]. En la exposición de proximidad, la resolución se ve limitada por la difracción de Fresnel y oscila alrededor de los $5 \mu m$. Por el contrario, en los sistemas de proyección la resolución esta en función de la longitud de onda y la apertura numérica del sistema óptico empleado, logrando resoluciones de menos de $1 \mu m$.

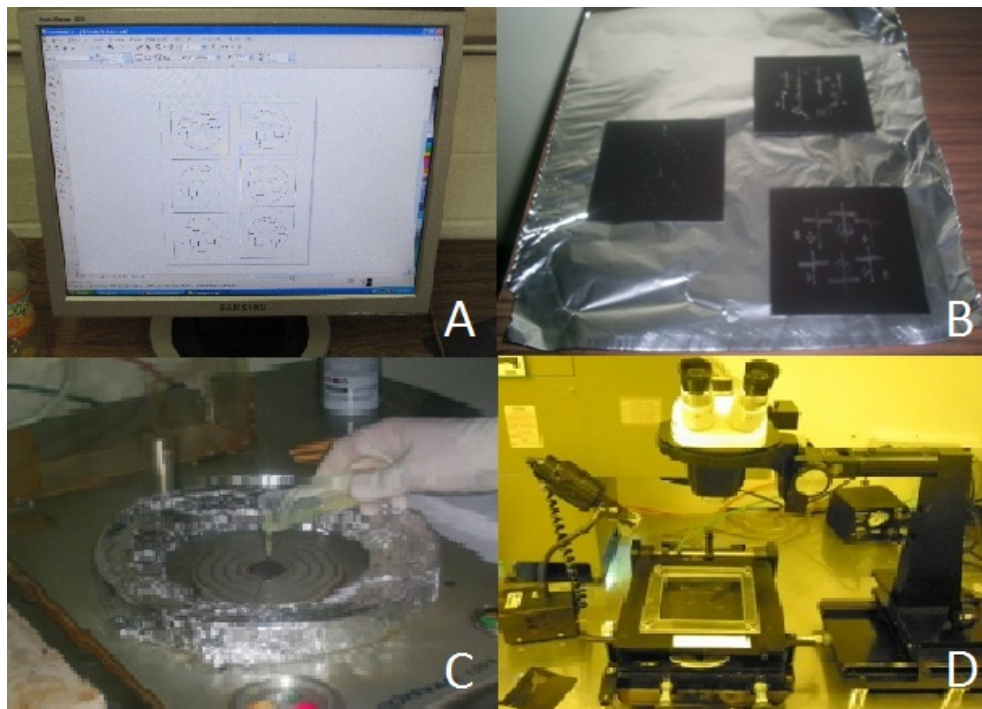


Figura 2.3: *Fabricación del molde por fotolitografía. 2.1.A Diseño del dispositivo en CAD, 2.1.B Máscaras para fotolitografía, 2.1.C “spinner” empleado en la generación de la película de resina fotosensible de Su8, 2.1.D Alineadora de mascarar para exposición a luz UV colimada.*

La construcción de los moldes comenzó con el diseño en CAD, que servirá como el patrón de la máscara, que fue necesario exportarlo en formato PDF para imprimirlo en una imprenta digital. La impresión es en negativo debido a que la resina SU-8 es negativa, así la región expuesta se endurece y se fija a la oblea de silicio.

El proceso de fotolitografía comienza limpiando la oblea de silicio para eliminar, en particular, residuos orgánicos que impidan la correcta adherencia de la resina fotosensible. El proceso de limpieza recomendado consta de sumergir la oblea de 2 a 5 minutos en acetona con agitación ultrasónica. Después se sumerge en metanol de 2 a 5 minutos con agitación ultrasónica, se enjuaga sumergiendo por 30 segundos en agua destilada desionizada. Finalmente se seca con nitrógeno y se deja en un horno a 70°C por espacio de una hora para que seque completamente.

La oblea limpia y seca se coloca en el “spinner” que es un aparato que fija mediante vacío la oblea a un plato giratorio, el cual se puede programar para girar con un patrón de revoluciones que permite el depósito uniforme y de grosor controlado de la película de resina fotosensible. Para nuestros dispositivos, se colocó aproximadamente 5 gr de SU-8 sobre la oblea y se programó el plato para girar por 10 segundos a 500 rpm y por 30 segundos más, a 650 rpm. Los primeros 10 segundos a 500 rpm sirven para distribuir la resina en toda la oblea y el segundo ciclo permite homogeneizar la película y disminuir su grosor.

Con el objeto de evaporar el exceso de solvente de la resina y evitar que esta se pegue a la máscara, se realizó un horneado ligero el cual consiste en colocar la oblea con la capa de resina fotosensible en una parrilla a 65°C durante 5 minutos y posteriormente a 95°C por 15 minutos más.

Una vez transcurrido el tiempo de horneado ligero se deja enfriar unos minutos y se coloca en el alineador de máscaras con cuidado de no bloquear por completo las ventilaciones del sistema de vacío. Justo encima de la oblea se coloca el negativo previamente recortado al tamaño del alineador y se cierra la tapa cuidando que el sistema de vacío ponga en contacto la máscara con la oblea de forma paralela en toda el área y alineada. Con la oblea y el negativo en su lugar, se desliza la platina para

alinearse la fuente de luz y se programa el tiempo de exposición, en este caso fueron 30 segundos.

La oblea se somete a un post-cocido sobre la parrilla por 5 minutos a 95°C , después a 65°C un minuto más. A este paso se le conoce como horneado fuerte y sirve para fijar la resina expuesta. Se deja enfriar un minuto más y se coloca en una caja petri con revelador y se deja alrededor de 5 minutos. Después, la oblea se enjuaga con isopropanol, si la oblea adquiere un tono blanquecino indica que aun existen residuos del SU-8 no expuesto en la oblea y es necesario colocarla nuevamente en el revelador, preferentemente nuevo. Se enjuaga nuevamente con el isopropanol en forma abundante. Finalmente se seca con nitrógeno y se coloca en la caja petri donde se fabricarán las réplicas.

2.2.2. Impresión en láminas de poliestireno termoplástico

La técnica de fabricación de moldes para litografía suave en láminas de poliestireno termoplástico fue introducida por Michelle Khine y su equipo en 2007 [40]. La técnica consiste en imprimir un patrón directamente en una lámina de poliestireno termoplástico, conocidas comercialmente como “Shrinky-Dinks”, utilizando una impresora láser convencional. Estas láminas tienen la peculiaridad de que después de ser calentadas entre 3-5 minutos a 163°C , las impresiones sobre éstas se encogen aproximadamente al 33 % de su tamaño original isotrópicamente en el plano, a dicho fenómeno le corresponde un incremento en la altura del tóner depositado en un 500 %.

Una técnica similar había sido probada por Tan et al.[21] al realizar fotocopias sobre acetatos convencionales. La altura aproximada del tóner con esta técnica está entre 8 y $14\ \mu\text{m}$, lo que permite el funcionamiento de algunos dispositivos microfluídicos. Lago et al. también había propuesto algo parecido al iterar cuatro veces la impresión y cuidando del correcto alineamiento de la impresora sobre un sustrato de vidrio, reportó alturas de $25\ \mu\text{m}$ [40]

La fabricación del molde en láminas de poliestireno termoplástico es un proceso

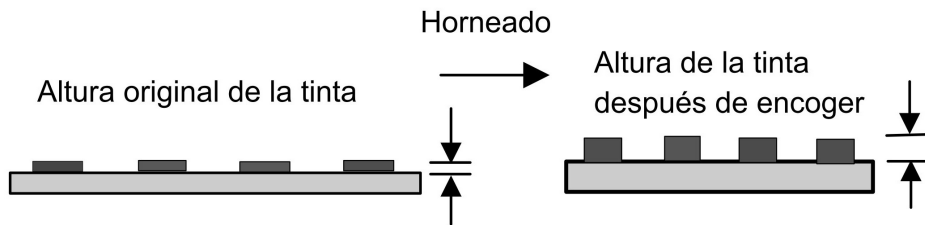


Figura 2.4: Esquema de la vista lateral de una lámina de PST “Shrinky-Dinks” impresa con una impresora láser. Del lado izquierdo observamos la altura original de las microestructuras impresas y del lado derecho las mismas después de que la lámina se encoge en un horno.

completamente diferente al de la fotolitografía, el único paso que comparte es el diseño en CAD del dispositivo y aún este tiene algunas diferencias. El diseño del dispositivo que se fabricará en láminas de poliestireno termoplástico debe ser escalado, pues como se mencionó, las láminas reducen a aproximadamente el 33% de su tamaño original [40][30]. Para nuestro caso se usó un factor de escala de 2.3:1 en lugar de 3:1, esto por que se observó una reducción al 42% del tamaño original. La diferencia que existe entre estos valores se debe a que la temperatura y tiempo a las que se expuso la lámina de poliestireno termoplástico fue distinto al reportado. Se usó el horno a una temperatura de 280°C por un tiempo de alrededor de un minuto, pues si se empleaba la temperatura y tiempo reportados, el molde tendía a curvarse en las orillas lo que afecta el sellado de los chips microfluídicos. Esto porque la réplica del molde, copia esta curvatura y dificulta el pegado con el cobre objetos, que al ser de vidrio es rígido y totalmente plano.

La impresión del patrón se realizó en una impresora convencional como la HP láser jet 2500 mostrada en la figura 2.5.B. Es importante que la resolución sea compatible con el tamaño de los dispositivos que deseamos fabricar, por ejemplo, una impresora con resolución de 1200 puntos por pulgada, forma un punto cada 20 μm . Cualquier diseño que contenga líneas con una anchura igual o por debajo de este tamaño no podrá ser

impreso. Sin embargo, para nuestros diseños, que rondan los $200 \mu m$, encontramos un comportamiento peculiar, si elegimos la mayor resolución posible, 1200 puntos por pulgada, la cantidad de tóner depositada es menor. Como el ancho mínimo de la línea de nuestro diseño no se ve limitado por la resolución de la impresora, la configuramos en 600 puntos por pulgada. Es conveniente configurar la impresora para imprimir “totalmente negro” pues algunas impresoras tienen pre-configurado el modo “ahorrador” y usan una menor cantidad de tóner, en consecuencia el molde tendrá una menor altura. Una vez atendidos estos detalles, se imprime sobre la lámina de poliestireno termoplástico observando su orientación, pues con el fin de aumentar la altura del tóner depositado se puede sobreimprimir el mismo diseño varias veces de forma consecutiva. A partir de la segunda impresión se debe prestar especial atención al alineamiento de la lámina en la entrada de la impresora para que la transferencia del patrón del diseño se realice con la menor pérdida de resolución posible. Se observó que el mejor balance entre altura del tóner depositado y las manchas generadas por el polvo de tóner que no se fijó correctamente durante la impresión, se alcanza con seis impresiones, para esta impresora en particular.

Para retirar los residuos de tóner suspendidos y las manchas generadas por éstos, se limpia la lámina de poliestireno termoplástico con un pedazo de algodón sujetado con unas pinzas y una mezcla de isopropanol y acetona en una proporción aproximada de 65 % y 35 %, como se observa en la figura 2.5.C. Hecho esto, se enjuaga con agua destilada y se seca con aire a presión. Después se recortan los diseños impresos dejando 2 cm entre el diseño y la orilla de la lámina, cuya forma será cuadrada para facilitar que el encogimiento sea proporcional entre el ancho y largo. Posteriormente, se coloca el diseño impreso en un recipiente de vidrio que soporte la temperatura del horno, la cual será por lo menos $160^{\circ}C$. Sin embargo, como se comentó, se observaron mejores resultados a una temperatura mayor, cercana a los $280^{\circ}C$, y dejar la lámina en el horno hasta el momento justo en el que deja de encogerse y ésta se vea plana. Para esto es conveniente que el horno cuente con una ventana para observar el proceso de encogimiento pues el tiempo varía un poco debido al tamaño del molde y la temperatura del horno. En la

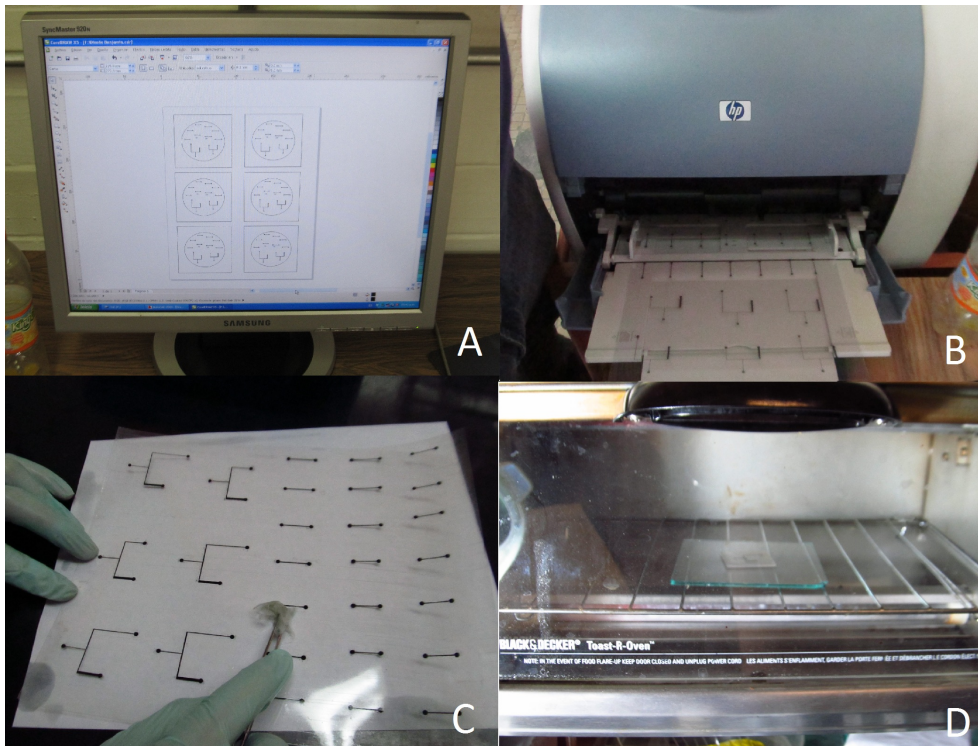


Figura 2.5: *Fabricación del molde en láminas de poliestireno termoplástico “Shrinky-Dinks” . 2.2.A Diseño del dispositivo en CAD, 2.2.B Impresión iterada en láminas de poliestireno termoplástico, 2.2.C Limpieza de residuos de tóner en la lámina, 2.2.D Reducción en un horno eléctrico*

figura 2.3.D observamos una lámina de poliestireno termoplástico dentro de un horno eléctrico convencional en el cual reducirá su tamaño.

Para finalizar, se retira el molde del horno, se deja enfriar unos minutos y se coloca en una caja petri donde se fabricarán las réplicas en PDMS.

2.3. Fabricación de las réplicas

Las réplicas se fabricaron de PDMS, el cual es un polímero elastomérico cuyas propiedades lo hacen muy útil en la fabricación de microcanales [39][41]. La primera de ellas es su capacidad para reproducir estructuras tridimensionales en escalas micrométricas.

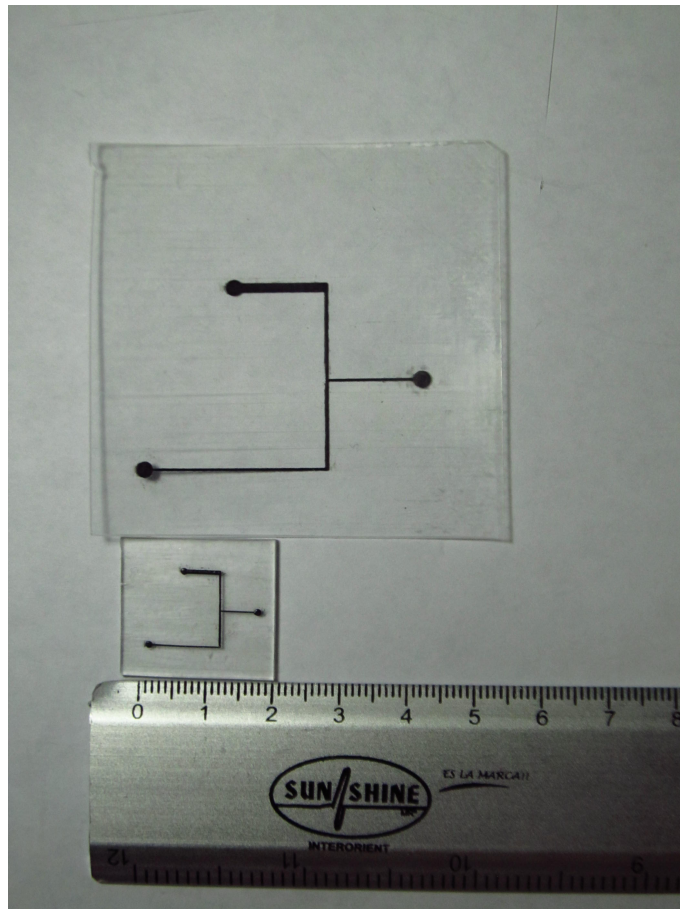


Figura 2.6: *Efecto de reducción. Dispositivo antes y después de hornearlo*



Figura 2.7: *Fabricación de réplicas y sellado del chip microfluídico. 2.4.A Kit de PDMS marca SYLGARD 184 , 2.4.B Campana de vacío para degasificar las réplicas de PDMS, 2.4.C Réplicas extraídas del molde de SU8, 2.4.D Horno de plasma empleado para activar las superficies que sellarán el chip microfluídico.*

Tiene transparencia óptica a partir de longitudes de onda de 300 nm. El PDMS es homogéneo e isotrópico y permite liberar la réplica del molde fácilmente, incluso de estructuras frágiles. [39] El PDMS no tratado es hidrofóbico lo que facilita la formación de gotas en fase acuosa al centro de microcanal. Cuando el PDMS es oxidado con plasma o al ser sumergido en una base fuerte, forma silanos debido a la oxidación de los grupos metil. El PDMS oxidado se adhiere por si mismo a vidrio, silicio o polietileno si dichas superficies también han sido activadas por plasma. [12]

El PDMS empleado en la fabricación de las réplicas de los chips microfluídicos es el kit Sylgard 184 de la marca Dow Corning, cuya presentación es un frasco pre-polímero

y otro de agente curante, como se observa en la figura 2.7A, los cuales se mezclaron en proporción 10 a 1.

La fabricación de las réplicas se inicia colocando el molde en una caja petri. En el caso de los moldes fabricados por fotolitografía se coloca una oblea de silicio que tiene el molde de SU-8 dentro de la caja, normalmente la oblea contiene más de un diseño por lo que es conveniente que la oblea quede lo más centrada posible para poder recortar más cómodamente las réplicas de los dispositivos en forma independiente. En el caso de los moldes fabricados en láminas de poliestireno termoplástico, se pueden colocar más de uno por caja, cuidando que tengan espacio suficiente entre ellos para recortar las réplicas.

El PDMS se prepara midiendo en una balanza analítica las proporciones de prepolímero y agente curante (10:1) en un recipiente desechable y se mezcla cuidadosamente entre 3 y 5 minutos. La cantidad de PDMS preparado debe ser suficiente para cubrir los diseños, en este caso debe tener una altura de aproximadamente 6 mm sobre el nivel del molde. Grosos menores dificultaran la conexiones con la microtubería y mayores, son innecesarios y pueden dificultar la horadación necesaria para hacer las conexiones. El proceso de mezclado forma pequeñas burbujas de aire dentro del PDMS, cuya extracción se realiza colocando las cajas petri que contienen los moldes cubiertos con PDMS en una campana de vacío por media hora.

Transcurrido el tiempo, se extraen las cajas petri y se colocan en un horno a 70°C por 24 horas para acelerar el proceso de polimerización.

2.4. Sellado del microchip

El sellado del microchip se realiza aprovechando las características físico-químicas del PDMS. La adhesión ocurre debido a los enlaces covalentes formados entre el PDMS y otros materiales basados en silicatos como el vidrio y el cuarzo. La oxidación del PDMS enriquece la superficie con grupos siloxilos al oxidar los grupos metil. Cuando

dos superficies tratadas con plasma se ponen en contacto, los oxígenos de los siloxilos de una superficie se combinan con el silicio de la otra y de esta forma comparten enlaces covalentes. [42][44]

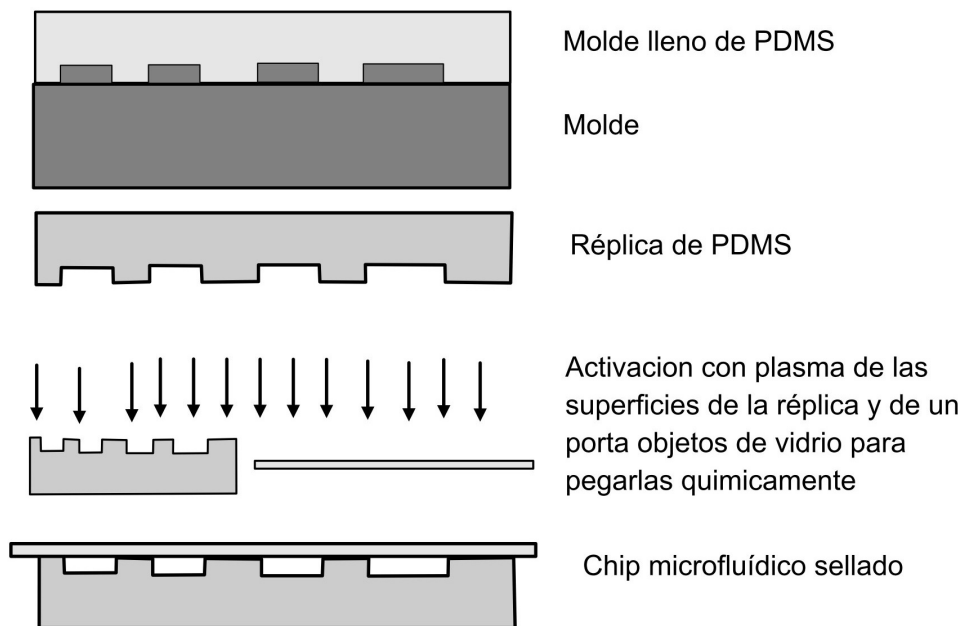


Figura 2.8: *Esquema fabricación de réplicas y sellado*

Las condiciones para un buen pegado del PDMS al vidrio, mediante tratamiento con plasma, han sido reportadas [44] [43]. Es importante oxidar la superficie hasta tener una densidad suficiente de grupos siloxil a fin de lograr un buen sellado permanente. Sin embargo, una exposición demasiado prolongada o intensa al plasma, formará una superficie de óxido de silicio y no se producirá el sellado. [44]

La tapa que sella los chips microfluídicos consiste en un portaobjetos de vidrio, el cual fue limpiado para lograr un buen sellado. El proceso de limpieza consiste en someter el portaobjeto en un baño de agua, seguido de acetona y una vez que ésta se evapora, se enjuaga con abundante agua destilada. Es importante secar el portaobjeto con aire comprimido porque posteriormente debe someterse a un baño de ácido sulfúrico concentrado. El portaobjetos se deja en el ácido por 24 horas, concluidas se

retira con cuidado, se escurre y se enjuaga con abundante agua destilada y se seca con nitrógeno pues tiene menos impurezas que el aire comprimido. Completado el proceso de limpieza se colocan dentro de una caja petri dentro de un horno a 70 °C para disipar la humedad por lo menos por media hora.

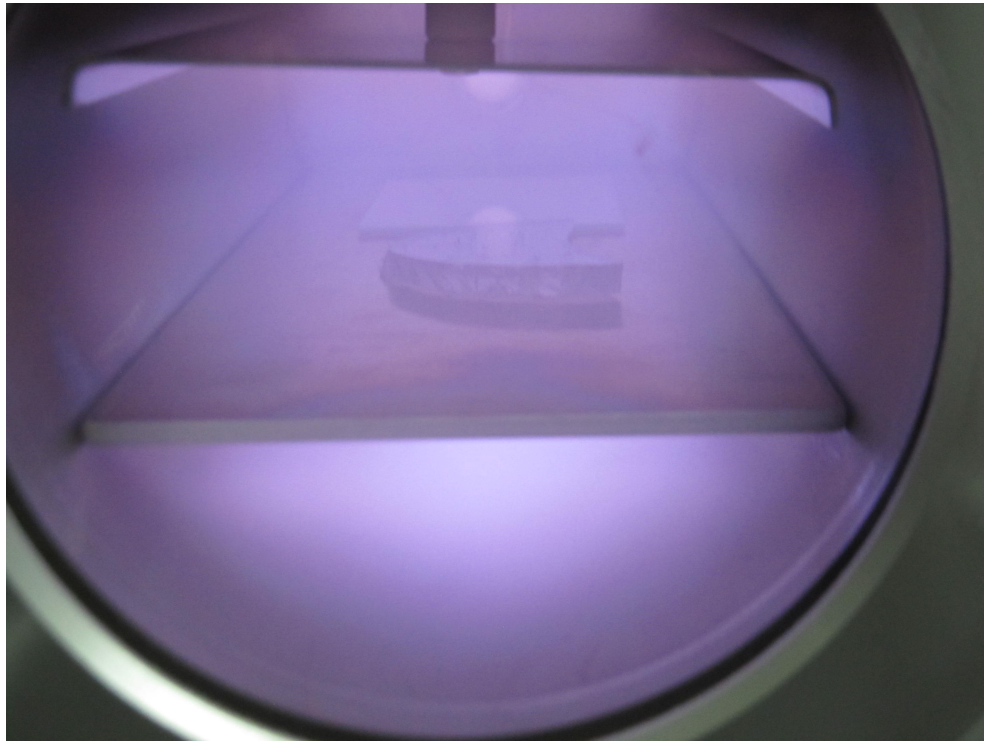


Figura 2.9: *Activación de la réplica de PDMS y el porta objetos de vidrio que sellará el chip microfluídico.*

Las réplicas de PDMS que se encuentran en las cajas petri, se recortan usando un bisturí, procurando dejar un centímetro alrededor del diseño con la finalidad de tener suficiente área de pegado alrededor de los microcanales, pues así se observaron mejores resultados. Hecho esto, se coloca sobre una caja petri de vidrio con los microcanales hacia arriba y se hacen agujeros con ayuda de un sacabocados en las que serán las entradas del chip microfluídico. En la figura 2.8 observamos un esquema general que representa la obtención de réplicas y sellado del chip microfluídico.

Cuando se han completado las perforaciones en la réplica, se limpia con un poco de cinta “mágica” para retirar cualquier fragmento de PDMS que pudiera obstruir los microcanales y se coloca con éstos hacia arriba en la cámara de plasma. En la misma charola se coloca uno de los portaobjetos limpio y perfectamente seco. Se cierra la tapa de la cámara de plasma, se abre el tanque de oxígeno y se genera plasma por 30 segundos a una potencia de 35 Watts, como se observa en la figura 2.9. Una vez que la activación de las superficies se ha completado, se retira la tapa del horno de plasma y se coloca la réplica del dispositivo de PDMS sobre el portaobjetos de vidrio con las caras que estuvieron expuestas al plasma en contacto. Se ejerce un poco de presión con los dedos sobre la réplica y el cubreobjetos con el fin de expulsar cualquier burbuja de aire que pudiera existir entre sus superficies. El chip microfluídico se deja en un horno a 70°C por 24 horas para que la mencionada reacción química de pegado, que ocurre entre las dos superficies activadas con plasma se lleve a cabo.

2.5. Caracterización dimensional de réplicas de PDMS

La caracterización de réplicas se llevó a cabo en el laboratorio del centro UNAMems de la Facultad de Ingeniería, que cuenta con un sistema de caracterización de MEMS de la marca Polytec MSA-400, mostrado en la figura 2.10, el cual dentro de varias funciones, permite la caracterización topográfica de micro estructuras. Esta medición la realiza mediante un interferómetro de luz blanca. [45] La interferencia de luz blanca es un fenómeno óptico que se presenta al interactuar dos frentes de onda. Como resultado de dicha interacción existe un nuevo frente de onda que puede tener una amplitud mínima o máxima relativa dependiendo de si la interferencia fue constructiva o destructiva. La máxima amplitud de modulación ocurre cuando la longitud del camino óptico de la trayectoria de referencia es la misma que la longitud del camino óptico recorrido por

luz reflejada por la muestra. Como la longitud de la trayectoria de la luz de referencia es conocida, se sabe también la distancia a la que se encuentra la muestra cuando la modulación es máxima. Esto ocurre para cada uno de los pixeles de la cámara CCD que incorpora el interferómetro. De esta forma, al realizar un barrido preciso mediante un actuador piezo eléctrico sobre el eje "z", el sistema determina la profundidad que tiene la micro estructura en el área definida por cada uno de los pixeles.[45] Por lo tanto, una buena caracterización de la topografía de la microestructura requiere una adecuada selección del área a caracterizar y de establecer adecuadamente el punto de inicio del barrido en el eje "z" pues el piezoeléctrico tiene un recorrido máximo de $500\mu\text{m}$.

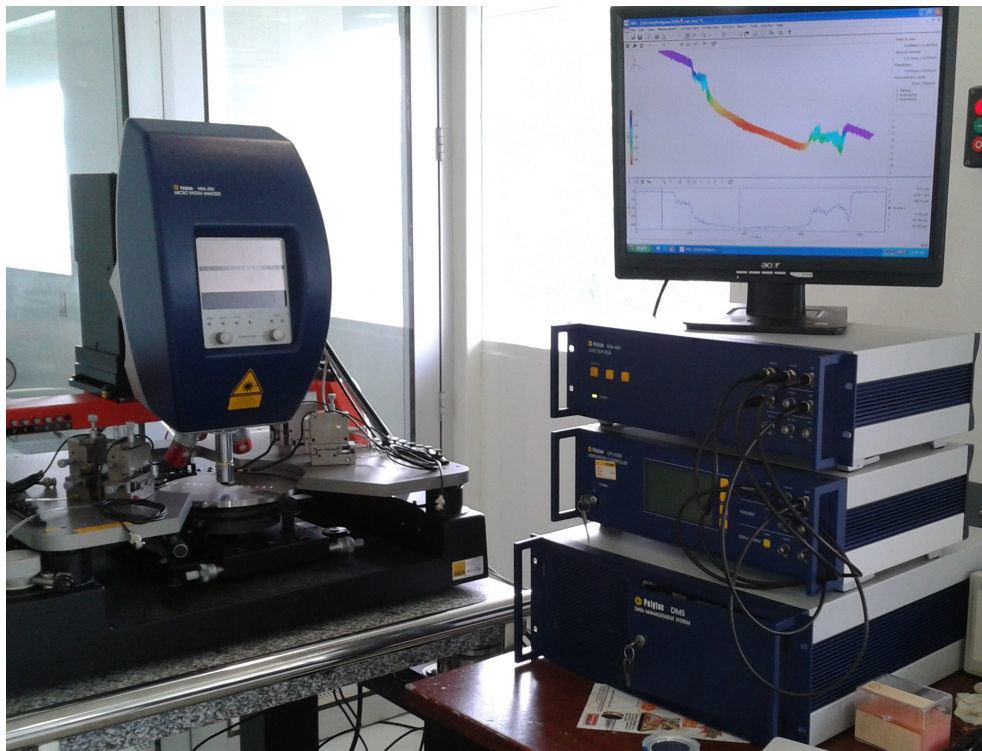


Figura 2.10: Sistema Polytec MSA-400 para caracterización de MEMS ubicado en el laboratorio de pruebas y caracterización del centro UNAMems

Para comenzar la caracterización topográfica se realiza el siguiente procedimiento. Primero se coloca la muestra en la platina del microscopio. Alrededor de ésta se encuentran las puntas de prueba usadas para excitar microdispositivos, las cuales hay

que manejar cuidadosamente para no golpearlas ni rayar los oculares con ellas. Para visualizar la micro estructura se utiliza el software Topography Measurement System (TMS), que permite ajustar los valores de exposición de la cámara y de la intensidad de la lámpara. Se disminuye el tiempo de exposición o la intensidad de la lámpara para que la imagen no se sature, bajo esta condición ésta aparece totalmente blanca. Tampoco debe tener poca iluminación o poco tiempo de apertura, pues la imagen se verá totalmente oscura. Cuando se han alcanzado tonos grises se empieza a enfocar usando las perillas del microscopio. Es mejor empezar de un punto próximo al ocular e irse alejando hasta lograr el enfoque, ya que de esta forma se evita golpear el ocular con la micro estructura, lo cual dañaría a ambos. Debido a la distancia del punto focal de los oculares, un buen lugar para iniciar el enfoque, es aproximadamente a un centímetro de distancia entre el ocular y el chip microfluídico.

Cuando se ha logrado enfocar alguna región del chip, con el ajuste manual se enfoca ahora con ayuda del actuador piezo eléctrico buscando enfocar la parte más baja del microcanal o de la micro estructura que nos interesa caracterizar. Se ha logrado enfocar esta región cuando cualitativamente se ve nítida y cuando aparecen franjas de interferencia en la región de interés como se muestra en la figura 2.11. La cantidad de franjas de interferencia indica lo perpendicular que se encuentra el dispositivo respecto a la fuente de luz. Es conveniente tener la menor cantidad de franjas de interferencia, sin embargo, dicha cantidad está limitada por la geometría del dispositivo, entre más plano sea menos franjas se observarán. Hecho lo anterior, se define este punto como inicio para el escaneo y usando el piezo eléctrico se enfoca ahora la región superior del chip microfluídico, si se ha hecho todo el recorrido que permite el actuador y no se logra enfocar el punto más alto del chip es necesario enfocar manualmente para desplazar la región que logra enfocar el actuador. Para ello se recorre nuevamente el piezo eléctrico hacia el punto más bajo y se empieza a subir manualmente con la perilla de ajuste fino del microscopio, hasta encontrar nuevamente las franjas de interferencia. Se define este nuevo punto como el inicio del escaneo y nuevamente se intenta enfocar la región superior del chip. Cuando se ha logrado enfocar esta región se define ahora el punto

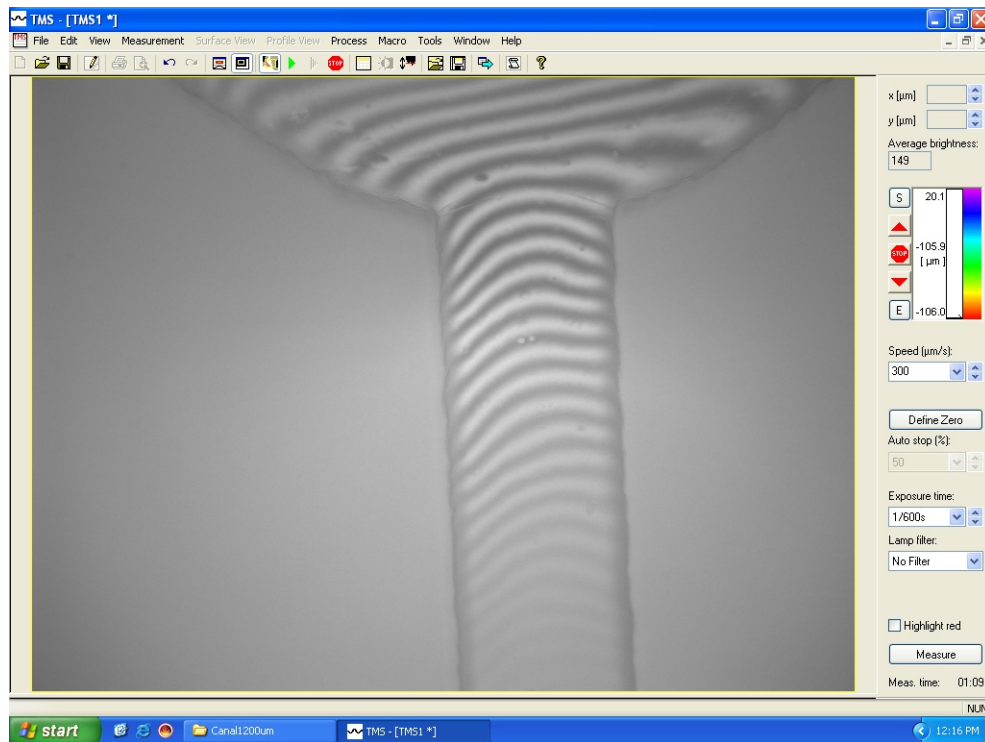


Figura 2.11: *Franjas de interferencia en un microcanal. Foto tomada desde la ventana de medición del software “Topography Measurement System” del equipo para caracterización de microdispositivos marca Polytec.*

final del escaneo.

El siguiente paso es seleccionar el área sobre la cual se realizará el escaneo. De acuerdo a las características de funcionamiento del equipo, conviene hacer las mediciones en forma horizontal, de tal forma que los microcanales queden en forma vertical y las mediciones se realicen en forma transversal. Esto debido a que realiza el barrido de arriba hacia abajo de izquierda a derecha y optimiza el uso de memoria. Cuando se ha elegido el área de interés se inicia el escaneo. Si se eligió un área demasiado grande es posible que se agote la memoria RAM del equipo y entre en un error crítico que obligue a reiniciar la aplicación y seleccionar una región mas pequeña. Cuando se ha completado el escaneo el software abre la ventana de análisis, en ella se observa en la parte superior, una gráfica que indica, por medio de colores, las diferentes alturas

que tiene la micro estructura en la región de interés. Esta gráfica también puede ser presentada como modelo 3D, lo que permite observar su geometría. En la parte de abajo de la ventana se observa una gráfica que representa un perfil o corte transversal del escaneo, en la que es posible identificar fácilmente la altura máxima y mínima que tiene el microcanal, así como su ancho, en cierto punto localizado por el usuario a lo largo del mismo.

El software cuenta con herramientas para el post procesamiento de los datos adquiridos. Entre estas herramientas se encuentran los filtros de mediana y promedio que ayudan a corregir errores de medición para algunos píxeles. El primero escoge el valor de la mediana dentro de un grupo de píxeles y lo asigna al píxel de lectura. El segundo calcula aritméticamente el promedio de los píxeles vecinos al de interés y éste toma dicho valor.[45] Dichos filtros permiten suavizar las curvas de los perfiles eliminando el ruido sal pimienta. Este ruido es causado en parte a errores en las lecturas debido a que el PDMS tiene una alta transparencia óptica y esto dificulta la medición por interferometría.

Se caracterizaron micro canales construidos empleando las dos técnicas de fabricación presentadas en las secciones 2.2.1 y 2.2.2, con dimensiones de $100\ \mu m$ y $200\ \mu m$ de ancho del microcanal.

En las figuras 2.12 y 2.13 observamos micro canales fabricados a partir de moldes hechos en láminas de poliestireno termoplástico. El micro canal diseñado a $100\ \mu m$ tiene una anchura real de $350\ \mu m$. También se diseñaron y caracterizaron microcanales de $200\ \mu m$, con un ancho real de $310\ \mu m$. La diferencia entre la anchura de diseño y la real se debe a varios factores. El primero de ellos y de mayor importancia es que la línea se imprimió varias veces sobre la lámina de poliestireno termoplástico y, debido a que es difícil lograr una alineación perfecta entre las impresiones consecutivas, la línea perdió resolución y aumentó de grosor. El segundo factor es que la línea se imprime a un grosor mayor, considerando el encogimiento del material tal como se comentó en la explicación del método en la sección 2.2.2, y el factor de encogimiento no siempre es constante. Un tercer factor son los residuos de tóner que pueden quedar

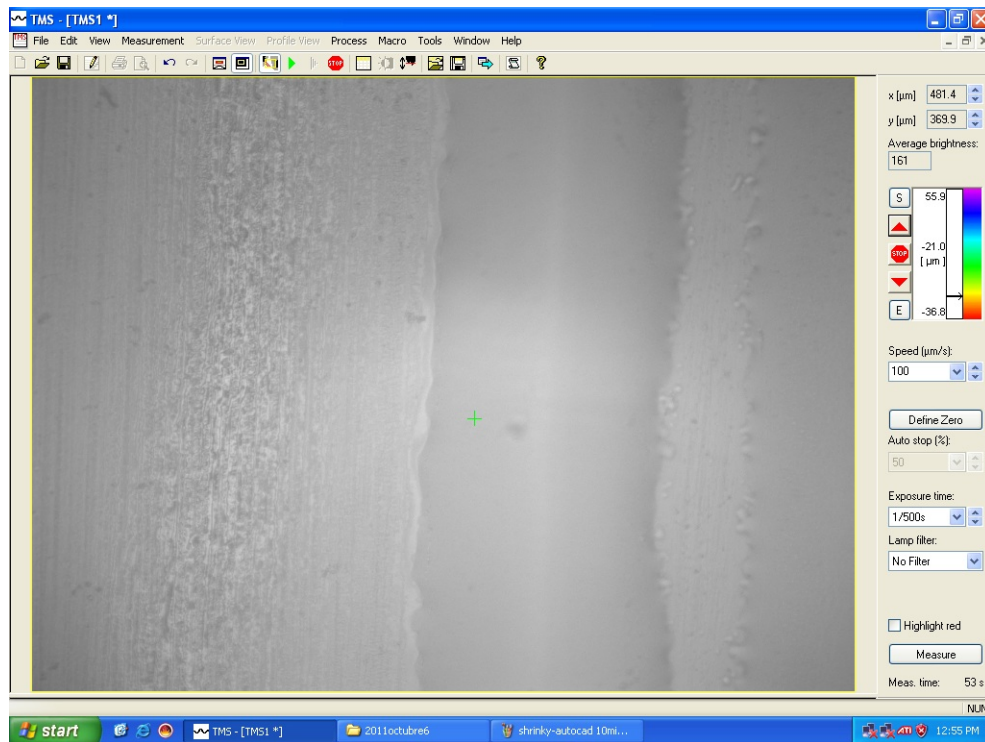


Figura 2.12: *Canal microfluídico fabricado en laminas de poliestireno termoplástico*

en los microcanales. Lo anterior explica por qué el diseño de $200\ \mu\text{m}$ resultó tener una anchura menor que el de $100\ \mu\text{m}$.

Los dispositivos fabricados en láminas de poliestireno termoplástico mostraron canales con el fondo semicilíndrico. Esta geometría es ventajosa para la dinámica de los fluidos; sin embargo, al tener poca profundidad, $50\ \mu\text{m}$ frente a más de $300\ \mu\text{m}$ de anchura, las gotas que se forman tienden a aplanarse y ser inestables.

Los moldes fabricados en SU8 mostraron una mayor repetibilidad. La anchura real fue muy cercana a la del diseño $101\ \mu\text{m}$ frente a los $100\ \mu\text{m}$ esperados, como se observa en la figura 2.14. Al igual que en el caso de los moldes fabricados en laminas de poliestireno termoplástico, se diseñaron canales de $200\ \mu\text{m}$; en este caso la anchura real fue de $203\ \mu\text{m}$. Ambos microcanales comparten una geometría rectangular y con una relación de aspecto más cuadrada. La altura fue cercana a los $100\ \mu\text{m}$ lo que forma un canal cuadrado para el diseñado a $100\ \mu\text{m}$ y un canal rectangular con relación de

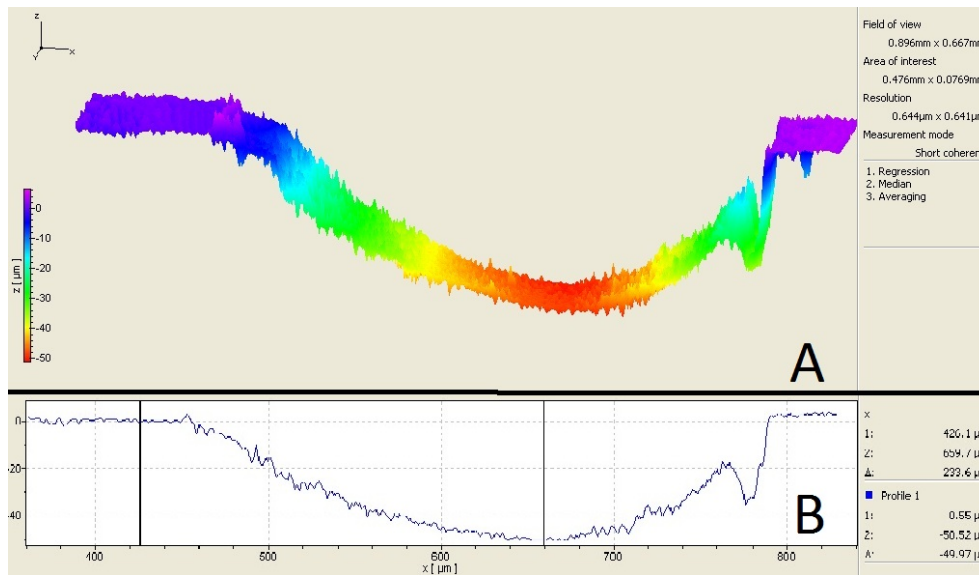


Figura 2.13: Microcanal diseñado a $100\ \mu\text{m}$ construido usando un molde fabricado en laminas de poliestireno termoplastico. 2.9.A Representación 3D de los puntos escaneados. 2.9.B Perfil transversal del micronal anchura $350\ \mu\text{m}$ altura $49\ \mu\text{m}$.

aspecto 2:1 en el caso del diseñado a $200\ \mu\text{m}$. Esta relación de aspecto es mejor que la que se obtuvo con los moldes hechos en láminas de poliestireno termoplástico cuyas alturas oscilaron los $50\ \mu\text{m}$, con esa altura la relación de aspecto sería aproximadamente 6:1 para el microcanal de $310\ \mu\text{m}$ y de 7:1 para el de $350\ \mu\text{m}$. Un canal más cuadrado permite que se formen gotas esféricas que son más fáciles de formar y estables.

No. de molde y tipo	Anchura de diseño μm	Anchura real μm	Altura μ
1 lámina PSTP	100	350	~ 49
2 lámina PSTP	200	310	~ 50
3 SU-8	100	101	103
4 SU-8	200	203	106

Cuadro 2.1: Caracterización dimensional de microcanales construidos usando moldes fabricados con dos diferentes técnicas y diseños de 100 y $200\ \mu\text{m}$.

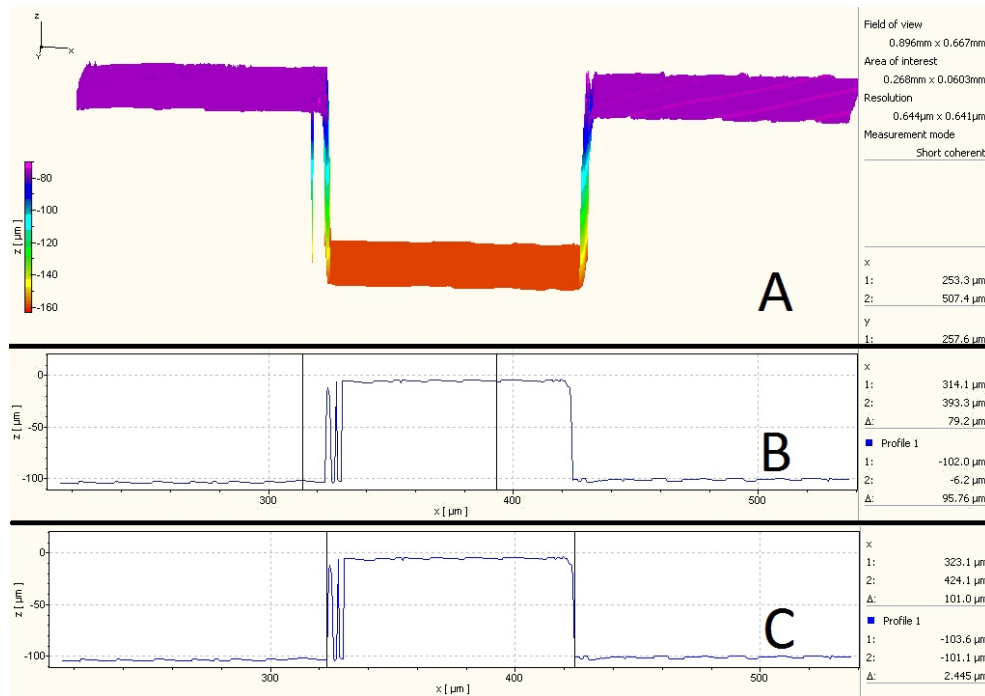


Figura 2.14: Microcanal diseñado a $100 \mu\text{m}$ construido con un molde de *Su8*. 2.11.B Perfil del canal de la réplica de PDMS, altura $95.76 \mu\text{m}$, 2.11.C Perfil del canal de la réplica de PDMS, anchura $101 \mu\text{m}$. Del lado izquierdo de los perfiles observamos varias líneas, éstas aparecen debido a la alta transparencia óptica que dificulta la medición para algunas geometrías.

Con el objeto de averiguar qué tan uniforme es el microcanal, se caracterizó en anchura y profundidad uno diseñado a $200 \mu\text{m}$ de ancho y 1 cm de largo en tres puntos. El primero próximo a la entrada, el segundo aproximadamente a la mitad y el tercero cercano a la salida. Para el primer punto, la anchura y la altura fueron $205.3 \mu\text{m}$ y $100.5 \mu\text{m}$ respectivamente; para el segundo punto fueron $203.4 \mu\text{m}$ y $106.7 \mu\text{m}$; y para el tercero la anchura fue de $205.3 \mu\text{m}$ y la altura de $110.5 \mu\text{m}$. En el caso de la anchura se observa que el valor medido en el primer y tercer punto fue exactamente el mismo $205.3 \mu\text{m}$. La anchura del micro canal en el punto intermedio fue $1.9 \mu\text{m}$ menor, que en porcentaje representa un error de 0.92% . En el caso de la altura se mostró un fenómeno totalmente distinto, el primer valor fue de $100.5 \mu\text{m}$ y los subsecuentes fueron

Medición No.	Anchura μm	Altura μm
1	205	100
2	203	106
3	205	110

Cuadro 2.2: *Características dimensionales de un micro canal en tres diferentes puntos.*

más grandes, el segundo $6.2 \mu\text{m}$ y el tercero $10 \mu\text{m}$. Se puede inferir que la película de la resina foto sensible no tuvo un grosor uniforme. La variación en un centímetro fue del 10 % la cual es significativa. Se cree que la temperatura de la resina foto sensible al momento de usarla no fue la adecuada, pues se conserva en refrigeración para mantener sus propiedades pero debe ser expuesta a la temperatura ambiente unas horas antes de ser usada con el objeto de disminuir su viscosidad. Otra posibilidad es que no se usaran las revoluciones adecuadas en el plato giratorio pues al modificar los patrones de revoluciones para buscar el máximo grosor posible quizá no se alcanzaron las revoluciones necesarias para formar una capa homogénea de resina fotosensible. Por otro, lado se caracterizó un dispositivo cercano a la orilla de la oblea y es posible que esta haya influido pues se observó que el mecanismo de sujeción por vacío del *spinner* puede deformar un poco la oblea en esta región. Después de la caracterización podemos decir que el método de fabricación de moldes en láminas de poliestireno termoplástico es viable para nuestra aplicación pero requiere mejorar algunas etapas del proceso. La primera de ellas es la alineación de la hoja en la impresora. Quizá se pueda adaptar un accesorio en la entrada de la impresora que permita que las láminas sean impresas exactamente en el mismo punto. Otra alternativa es hacer una limpieza ligeramente diferente que no remueva demasiado tóner del molde y así queden los microcanales mas profundos. Los moldes de SU-8, por su parte, lograron mejores resultados sin embargo la fabricación de cada uno de estos es más costosa y lenta. Además, no siempre está disponible el cuarto limpio donde se encuentran los dispositivos necesarios para la fabricación de los moldes.

Capítulo 3

Arreglo Experimental

En éste capítulo se presentan los elementos ópticos y optoelectrónicos empleados en el arreglo experimental implementado en esta tesis. Este arreglo tiene por objeto estimular y cuantificar fluorescencia en microgotas que circulan en un microcanal, las cuales están formadas por disoluciones en las cuales se incluye un marcador fluorescente cuya luces de excitación y de emisión son iguales o equivalentes a las de la fluoresceína. Las funciones del arreglo son estimular fluorescencia mediante un haz de luz láser, recoger la luz emitida por la muestra fluorescente y sensarla con un fotodiodo.

En la figura 6.7 se muestra un esquema del arreglo experimental. En el se observa un microscopio invertido de fluorescencia y los principales elementos ópticos que conforman dicho arreglo y las cuales se detallaran a lo largo del capítulo.

3.1. Elementos Ópticos

3.1.1. Filtros y espejos: principios de funcionamiento

Los filtros y espejos son dispositivos diseñados con la intención de modificar una o más regiones del espectro óptico. Estas modificaciones pueden ser en la distribución de la intensidad del espectro, o bien, en la polarización de la radiación electromagnética que incide en dichos filtros y espejos. El funcionamiento de los filtros puede estar basado en

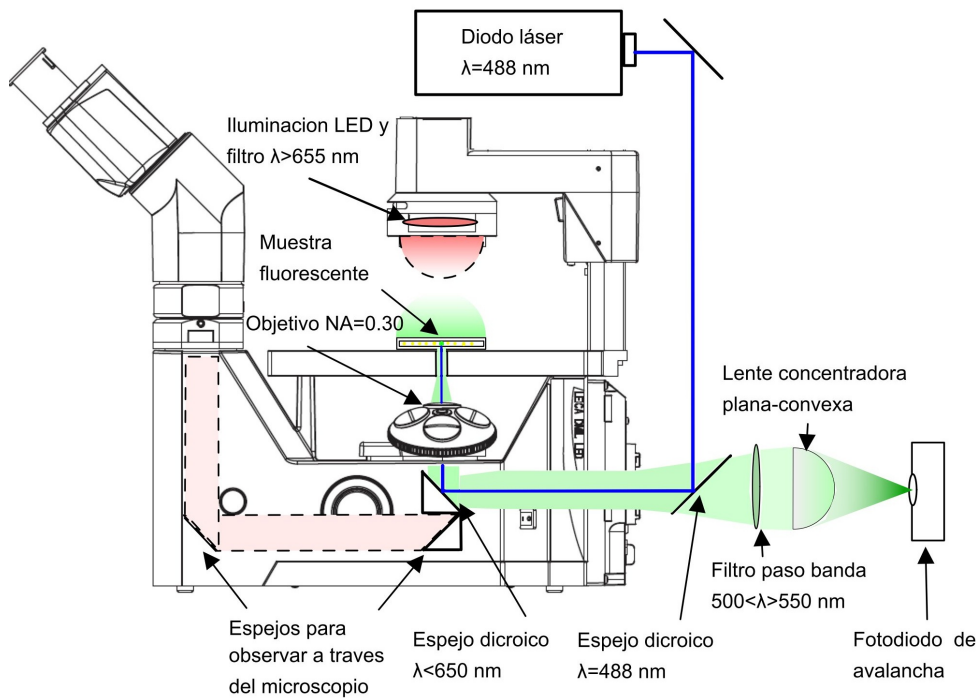


Figura 3.1: *Diagrama general del sistema*

uno ó varios fenómenos físicos, entre éstos; absorción, reflexión, difracción, polarización e interferencia [47]. Existen varias formas de describir el comportamiento de los filtros. Cuando se trata de transmisión y reflexión usados en aplicaciones visuales como en la fotografía, es común que se les clasifique simplemente por el color. Sin embargo, cuando se trata de filtros que serán usados en aplicaciones cuantitativas, las características más importantes a considerar son: los espectros de transmisión, reflexión, absorción y la densidad óptica [47]. Las expresiones que describen estos parámetros en torno a la longitud de onda λ se presentan a continuación.

La transmisión o transmitancia, de un filtro para una longitud de onda $T(\lambda)$, que se encuentra entre dos medios, se define como la relación entre la intensidad de la luz transmitida $I_T(\lambda)$ y la intensidad de la luz incidente $I_0(\lambda)$ [47].

$$T(\lambda) = \frac{I_T(\lambda)}{I_0(\lambda)} \quad (3.1)$$

En forma análoga, la reflexión o reflectancia es la relación entre la intensidad de luz reflejada $I_R(\lambda)$ y la intensidad de la luz incidente $I_0(\lambda)$ y se define como:

$$R(\lambda) = \frac{I_R(\lambda)}{I_0(\lambda)} \quad (3.2)$$

La absorción se presenta cuando un material transforma la energía recibida en forma de luz en alguna otra forma de energía, por ejemplo, en calor, como sucede en los calentadores solares, o en una corriente eléctrica, como ocurre en las celdas fotoeléctricas. La absorción es la causa principal del daño en los filtros, cuando incide en ellos una luz láser, ya que en los filtros la forma típica de transformar la energía es en calor. Este daño ocurre cuando la conductividad del calor en el elemento óptico es baja, entonces el haz de luz láser genera un punto de calor que se eleva hasta un valor que daña al elemento óptico. Para contrarrestar este efecto, algunos espejos de alta reflexión se construyen sobre materiales con una alta conductividad térmica o que pueden ser enfriados con agua. La absorción es una característica intrínseca del material y varía de acuerdo con la longitud de onda de la radiación incidente. Dicha propiedad se expresa en la ley de Beer-Lambert, que relaciona la intensidad de la luz transmitida, con la intensidad de la luz incidente, cuando se considera que el medio absorbió parte de dicha intensidad[47].

$$A(\lambda) = \alpha l c \quad (3.3)$$

Donde:

l es la longitud del camino óptico en el medio recorrido por la luz

c es la concentración del material absorbente

α es el coeficiente de absorción y se define como:

$$\alpha = \frac{4\pi K_\lambda}{\lambda} \quad (3.4)$$

en esta:

λ es la longitud de onda de la luz absorbida

K_λ es el coeficiente de extinción

Otra expresión que permite calcular la absorción cuando se conoce la transmisión es:

$$A(\lambda) = -\ln \frac{I_T(\lambda)}{I_0(\lambda)} \quad (3.5)$$

La densidad óptica $DO(\lambda)$ es un parámetro que relaciona la absorción $A(\lambda)$ de un elemento óptico para una longitud de onda (λ) por unidad de distancia l [47]. Algunos fabricantes expresan la transmisión que tiene un filtro para una longitud de onda λ de acuerdo a su absorción; por ejemplo, un filtro con densidad óptica o absorción de 1 tendrá una transmisión de un 10 %, un filtro con una densidad óptica de 3 tendrá una transmisión del 1 %. La expresión que permite calcularla es:

$$DO_\lambda = \frac{A_\lambda}{l} \quad (3.6)$$

El diseño y manufactura de los filtros ópticos y espejos son procesos complejos, debido a que involucran las características ópticas de los materiales con los que se fabrican. Dichas características se modifican de acuerdo a los espesores de las películas, la forma en como se depositan y como interaccionan entre ellas. A continuación se presenta una breve introducción con objeto de entender mejor las propiedades de los filtros.

Como se mencionó, las propiedades de mayor interés para un filtro o espejo son la transmisión, reflexión y absorción para la longitud o longitudes de onda de interés. Para lograr estas características normalmente se requiere de varias películas delgadas de materiales cuyas propiedades ópticas logran el efecto deseado. Cada una de estas películas delgadas modifican la luz que incide en ella de acuerdo al grosor de la capa, el índice de refracción y a su coeficiente de extinción[47]. Por ejemplo, los filtros que se diseñan para bloquear una región de banda angosta se fabrican agregando pares de capas de materiales con índices de refracción altos y bajos con un grosor igual a un cuarto de la longitud de onda de interés[48].

La forma en que se depositan las películas delgadas depende del material del que

se constituya, pero como se comentó, también afecta sus propiedades y su durabilidad. Dicho de otro modo, dos películas del mismo material y grosor tendrán propiedades ópticas y durabilidades diferentes según la técnica usada para depositarlas. Algunos de los métodos más comunes son evaporación, el chisporroteo y deposición de una solución.

3.1.2. Filtros y espejos empleados en el arreglo experimental

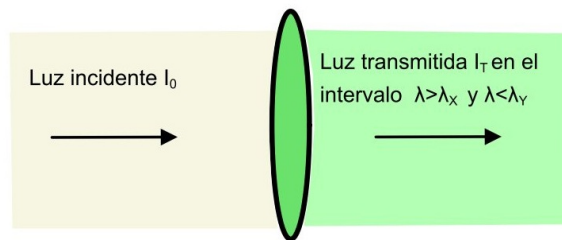


Figura 3.2: Diagrama de un filtro paso banda

En el arreglo experimental se usa un filtro paso banda, el cual permite el paso de la luz cuya longitud de onda está dentro del intervalo de 500 nm y 550 nm. En el arreglo experimental presentado desempeña un papel importante, pues es el encargado de permitir únicamente el paso de la luz emitida por la muestra fluorescente. En la figura 3.3 se observa el espectro de transmisión de los filtros empleados.

El divisor de haz es un filtro que está diseñado para reflejar un haz de luz con la misma composición espectral en dos direcciones diferentes. Para un divisor de haz neutro, las intensidades del haz transmitido y el reflejado son iguales para ángulos de incidencia cercanos a la normal, como el que se muestra en la figura 3.4. Existen divisores de haz que son selectivos en el color, por lo cual a este tipo de filtros también se les llama espejos dicróicos, como el que se presenta en la figura 3.5.

En el arreglo experimental se usan cinco filtros, dos de ellos se usan para la estimulación y detección de la fluorescencia, otros dos en el sistema de iluminación que permiten observar el experimento a través del microscopio, sin interferir en el ensayo

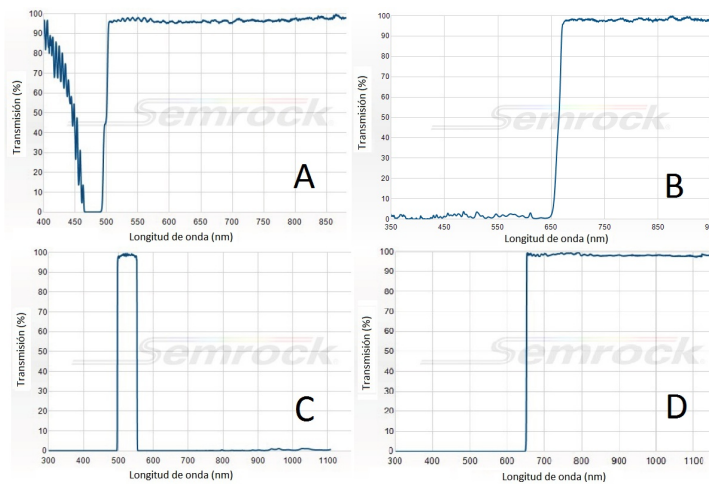


Figura 3.3: *Espectro de transmisión de los filtros empleados en el arreglo. A. Espectro de transmisión del espejo dicróico solo refleja $470\text{nm} \leq \lambda < 490\text{ nm}$, (Semrock, Di01-R488-25x36) B. Espectro del filtro del sistema óptico del microscopio refleja $\lambda < 660\text{ nm}$, (Semrock, FF660-Di02-25x36) C. Espectro de transmisión del filtro paso banda $500\text{nm} \leq \lambda < 550\text{ nm}$, (Semrock, FF03-525/50-25), D. Espectro de transmisión del filtro empleado en el sistema de iluminación $\lambda < 635\text{ nm}$. (Semrock, BLP01-635R-25), (De la hoja de datos del fabricante)*

fluorescente y uno más que permite estimular la fluorescencia y observarla a través del microscopio.

A continuación se presenta un arreglo fluorescente típico con la finalidad de compararlo con el implementado en esta tesis y así apreciar sus diferencias. La figura 3.6 presenta un arreglo óptico típico para observar fluorescencia. Esta constituido por una fuente de luz de amplio espectro que es filtrada para la longitud de onda de mayor absorción del compuesto fluorescente. Esta luz es transmitida por el espejo dicróico y el objetivo del microscopio, e ilumina todo el campo visual del ocular. La muestra absorbe esta luz y, debido al fenómeno de fluorescencia, emite en otra longitud de onda. La luz emitida por la muestra es recogida por el objetivo del microscopio y enviada al espejo dicróico, el cual la refleja hacia un tercer filtro que permite el paso de luz en una banda

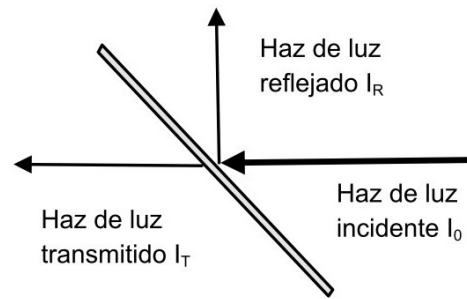


Figura 3.4: *Divisor de haz. 50 de la luz incidente es reflejada y 50 es transmitida*

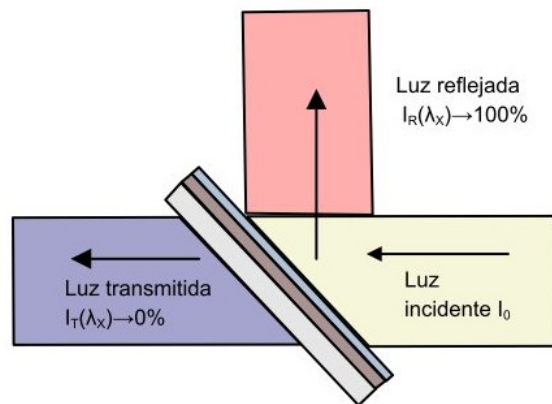


Figura 3.5: *Divisor de haz dicroico, también llamado espejo dicroico. La luz cuya longitud de onda es λ_x es reflejada y el resto es transmitida*

entorno a la longitud de onda de la luz emitida por la muestra fluorescente.

En la figura 3.7 se presenta el arreglo fluorescente experimental propuesto, cuyas regiones de excitación y de emisión, como ya se comentó, coinciden con las de la fluorescencia. En éste, la luz proviene de un diodo láser que tiene una longitud de onda $\lambda = 488nm$ (Coherent, Shapphire. El haz de luz láser incide en un espejo dicroico (Semrock, Di01-R488-25x36) (mostrado en 3.7.1) que al ser de banda angosta permite el paso de luz y únicamente refleja el haz del láser hacia un segundo espejo dicroico (Semrock, FF660-Di02-25x36) (3.7.2) el cual refleja tanto el haz de luz láser como la luz emitida por la muestra fluorescente y solo permite el paso de la luz con longitud onda

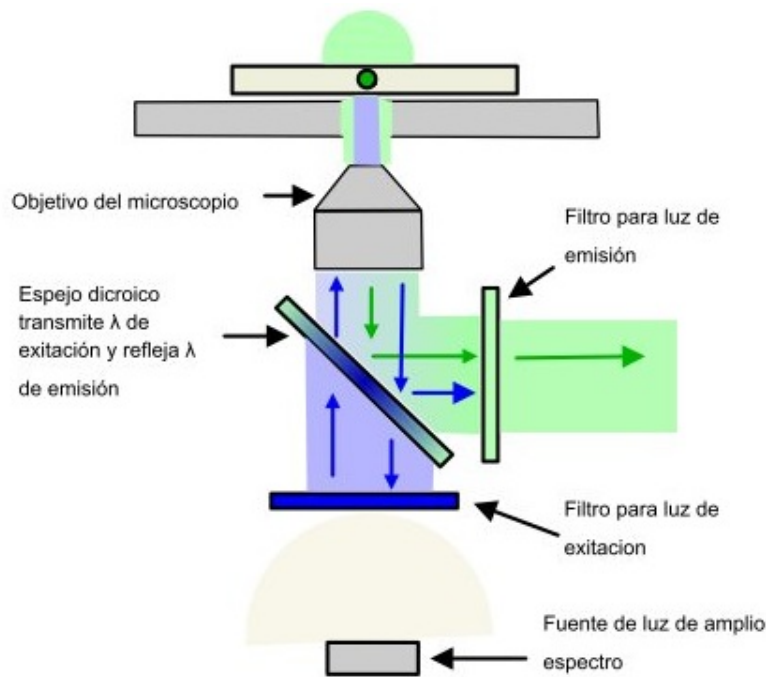


Figura 3.6: *Diagrama óptico de un microscopio fluorescente típico*

$\lambda > 650nm$. El haz de luz láser reflejado por el espejo dicroico número 2 (3.7.2) es transmitido y enfocado por el objetivo del microscopio e incide en la muestra (en la microgota en este caso) y como se explicó en el arreglo fluorescente típico, la microgota o material fluorescente bajo estudio emite luz en una longitud de onda diferente a la que absorbe. Esta luz es recogida por el objetivo del microscopio y enviada al espejo dicroico 2 (3.7.2), este refleja toda la luz con $\lambda < 650 nm$ y la envía hacia el espejo dicroico número 1 (3.7.1) el cual la transmite hacia un tercer filtro paso banda (Semrock, FF03-525/50-25) (3.7.3), cuya función es transmitir únicamente la luz emitida por fluorescencia en una región específica. Una vez que esta luz atraviesa este último filtro se dirige a una lente concentradora (ThorLabs, LA1951-A, N-BK7) que se enfoca sobre un fotodiodo de avalancha (Hinds Instruments, APD-100).

Vale la pena indicar que el espejo dicroico mostrado en (3.7.2) permite el paso de la luz cuya longitud de onda es mayor a $\lambda > 650$ que corresponde a luz roja dentro del espectro visible que puede ser captada por una cámara con la finalidad de observar

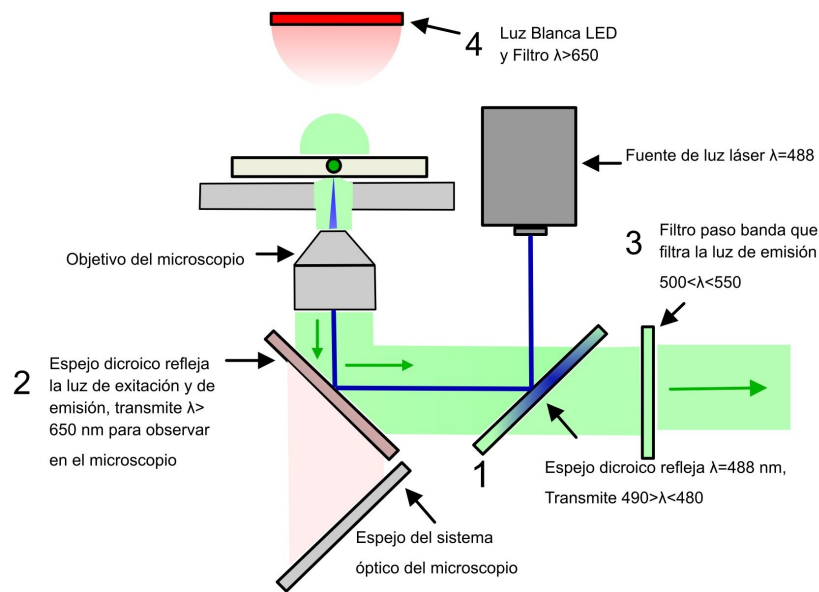


Figura 3.7: *Diagrama óptico del arreglo fluorescente láser. 1 El espejo dicroico refleja el haz de luz láser, 2 el segundo espejo dicroico refleja el haz de luz láser y la luz emitida por fluorescencia, y permite el paso de la luz del sistema de iluminación del microscopio filtrada, 3 el filtro paso banda solo permite el paso de la luz emitida por fluorescencia, 4 el filtro permite iluminar el experimento con luz que no interfiere con el mismo.*

la posición del chip y de las microgotas sin interferir con el ensayo fluorescente. Para poder iluminar con luz cuya longitud de onda $\lambda > 650nm$ se recurre al sistema de iluminación del microscopio el cual consiste en un diodo de alta luminosidad de 5[W] y a un filtro paso largas mostrado en la figura (3.7.4).

Una diferencia con respecto al arreglo fluorescente típico es que debido a las características de la luz láser (coherente, monocromática y direccional) puede ser usada sin la necesidad del filtro por el que pasa la luz de excitación del diagrama de fluorescencia típico. Además el láser emite un haz de luz colimado y de diámetro menor a un milímetro, lo cual permite enfocarlo en un punto de la muestra y no en todo el campo visual. Esta diferencia es fundamental en la medición de fluorescencia de microgotas pues si la luz estimulaba simultáneamente varias microgotas no se podría distinguir el resultado

de la reacción que se lleva acabo dentro de cada una de ellas.

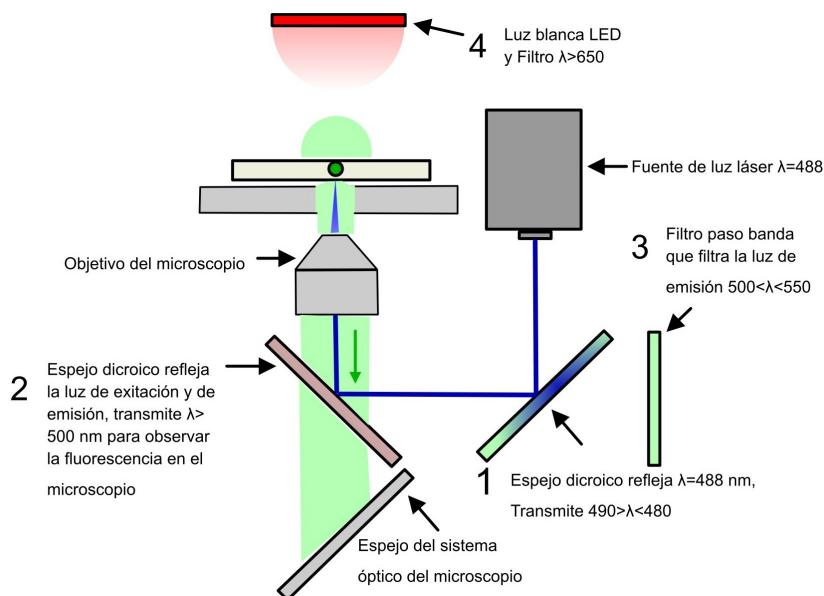


Figura 3.8: *Diagrama óptico del arreglo fluorescente láser, que permite observar la fluorescencia en el microscopio. A diferencia del diagrama 3.7, en éste el espejo dicroico 1 y 2 son iguales, reflejan el haz láser pero dejan pasar la luz emitida por fluorescencia*

Una variante del sistema experimental se observa en la figura 3.8 donde el espejo dicroico numero 2 del arreglo experimental mostrado en 3.7.2 es remplazado por otro espejo dicroico (3.8.2) idéntico al dicroico numero uno (Semrock, Di01-R488-25x36), el cual unicamente refleja la luz del láser y permite el paso del resto, incluyendo la de fluorescencia emitida por las muestras. Lo anterior es importante por que nos permite observar directamente la fluorescencia a través de los oculares del microscopio. Sin embargo, al transmitirse y no reflejarse, la luz no sigue la trayectoria que lo conduce al sensor, en consecuencia no se puede observar por los oculares y tener una lectura de la intensidad de la fluorescencia simultáneamente.

3.1.3. Lentes

Los lentes son probablemente el elemento óptico más común y más antiguo pues su origen se puede rastrear desde los vidrios quemadores empleados para encender fuego[49]. En la definición más simple, una lente óptica es un dispositivo refractor, es decir, un material de índice de refracción distinto al del medio que lo rodea y cuya geometría modifica la trayectoria de los rayos de luz que lo atraviesan.

La configuración y geometría de la lente obedece a las modificaciones que se buscan en el frente de onda que incide en la lente. Algunos de los efectos comunes que se buscan, es formar un frente de ondas planas en lugar de las divergentes como las emitidas por las fuentes de luz puntuales. Un ejemplo de lo anterior son las lentes que se ponen al frente de los proyectores para evitar que el haz de luz que contiene la imagen se disperse. Otro efecto comúnmente buscado es el de concentrar los rayos paralelos que inciden en la lente desde una fuente puntual remota este efecto está presente por ejemplo en el objetivo de un telescopio[49].

En el arreglo experimental existen tres elementos ópticos constituidos por lentes como se muestra en la figura 3.9. El primero de ellos es una lente plano-convexa que concentra la luz dispersa emitida por la muestra fluorescente (3.9.1), el segundo es el objetivo del microscopio (3.9.2) y el tercero es el ocular del microscopio (3.9.3). Los primeros dos influyen directamente en la estimulación y cuantificación de la fluorescencia, mientras el tercero permite observar el fenómeno en el microscopio.

La lente concentradora empleada en el arreglo experimental es una lente plano convexa de BK7 (Thorlabs, LA-1951 N-BK7) el cual es uno de los materiales más usados en la fabricación de óptica de alta calidad. Su espectro de transmisión va de 350 nm a $2 \mu\text{m}$ como se observa en la figura 3.10. La lente plano convexa refracta los rayos provenientes de una fuente de luz puntual que está suficientemente lejos como para considerarlos paralelos en un punto [49] como se muestra en la figura 3.11.

El segundo elemento óptico, de acuerdo al diagrama 3.9, es el objetivo del microscopio que, como se mencionó, es muy importante en la cuantificación de la fluorescencia

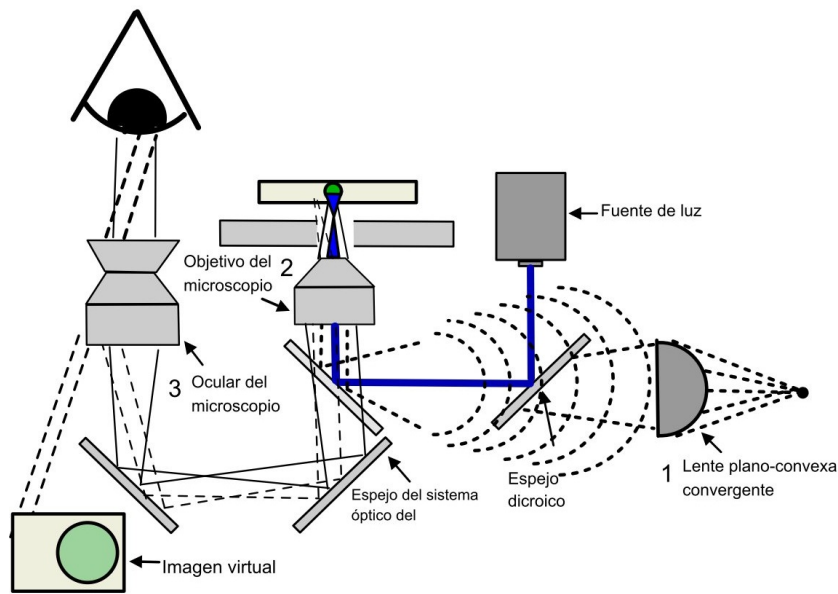


Figura 3.9: *Diagrama óptico del arreglo fluorescente láser. 1 Lente plano-convexa que concentra la luz dispersa de la fluorescencia, 2 Objetivo del microscopio enfoca el haz del láser y captura la luz emitida por fluorescencia, 3 Ocular del microscopio permite observar una imagen virtual de mayor tamaño del experimento*

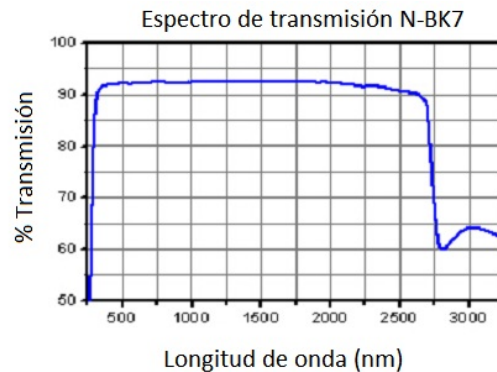


Figura 3.10: *Espectro de transmisión del material del que esta fabricada la lente convergente (Thorlabs, LA-1951 N-BK7) (Tomado de la hoja de datos del fabricante)*

pues es a través de él que se coleccionará la luz emitida por la muestra fluorescente. Existe una gran variedad de objetivos de microscopio cuyo diseño va de acuerdo con las nece-

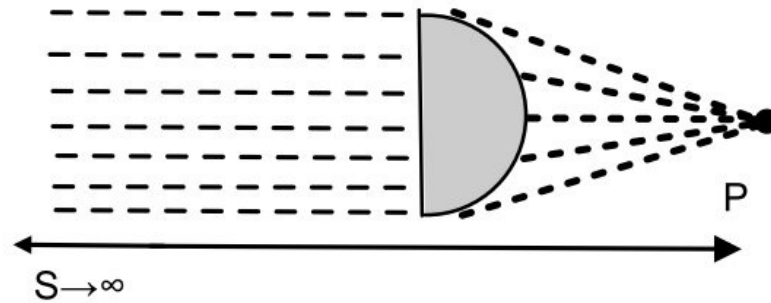


Figura 3.11: *Lente convergente usada para concentrar la luz de la fluorescencia*

sidades y características específicas de la aplicación que tendrán. Entre los parámetros importantes de un objetivo están el espectro de transmisión, la corrección cromática, la corrección de campo plano, el aumento o potencia, la distancia de trabajo, la apertura numérica y el medio de inmersión[50].

El espectro de transmisión de un objetivo nos indica el rango en que la luz podrá transmitirse en forma efectiva. En el arreglo experimental usaremos dos longitudes de onda que están dentro del espectro visible, por lo que no existen requerimientos especiales como ocurre cuando se trabaja con luz ultra violeta o infrarroja[50]. La corrección cromática indica si el objetivo fue diseñado considerando la aberración cromática producto de la diferente refracción que tiene cada longitud de onda al transmitirse a través del material. Algunos diseños se corrigen para dos longitudes de onda y otros para tres, a estos últimos se les llama apocromáticos y son los mejores cuando se observan muestras a color[52].

La corrección de campo plano se hace para que el microscopio enfoque toda el área de visión. Cuando no existe la corrección de campo plano sólo se puede enfocar el centro o la orilla de la muestra o espécimen, lo que obliga a mover alternadamente el foco para observar los detalles que se encuentran en las diferentes áreas del campo de visión[52].

El aumento o potencia nos indica el tamaño de la muestra que alcanzaremos a visua-

lizar, en forma inversa nos indica también el área de visión que podremos observar. En otras palabras, a mayor aumento podremos observar especímenes de menor tamaño, pero al mismo tiempo perderemos campo de visión[52][50]. La distancia de trabajo indica cuál es la distancia máxima entre el objetivo y la muestra. Esta distancia normalmente decrece cuando se incrementan los aumentos [52].

La apertura numérica y el medio de inmersión son dos parámetros que están estrechamente relacionados. El medio de inmersión es aquel que se encuentra entre el objetivo del microscopio y el portaobjetos que sostiene a la muestra o la muestra si no se usa portaobjetos. Los medios de inmersión más comunes son aire (índice de refracción $\eta = 1$), agua y aceite(índice de refracción típico $\eta = 1,51$)[50]. Cuando el medio tiene un índice de refracción similar al del vidrio del porta objetos (Corning, soda lime glass $\eta = 1,515$), se reduce la refracción de los rayos y se permite que viajen mejor del objetivo a la muestra y de regreso. La apertura numérica es el brillo que tiene la imagen y éste depende de la cantidad de luz que capta el objetivo. Dicha cantidad de luz depende del ángulo con que se aproxime a la lente.

La apertura numérica puede calcularse como:

$$NA = \eta_i \text{sen} \theta_{max} \quad (3.7)$$

En la figura 3.12 observamos un diagrama de un objetivo y el cono de luz que incide en él. El ángulo θ corresponde a la mitad del ángulo del cono de luz máximo. η_i es el índice de refracción del medio de inmersión.

El microscopio del arreglo experimental cuenta con 4 objetivos marca Leica cuyas características se muestran en la siguiente tabla:

El objetivo que se usara para realizar las pruebas de cuantificación de fluorescencia es el de 20x, pues tiene una mayor apertura numérica.

El tercer elemento óptico mostrado en la figura 3.9 es el ocular. Este se ocupa para formar la imagen que captura el objetivo. No influye en la cuantificación ni en la estimulación de la fluorescencia. Sin embargo, es importante mencionar que debido a que

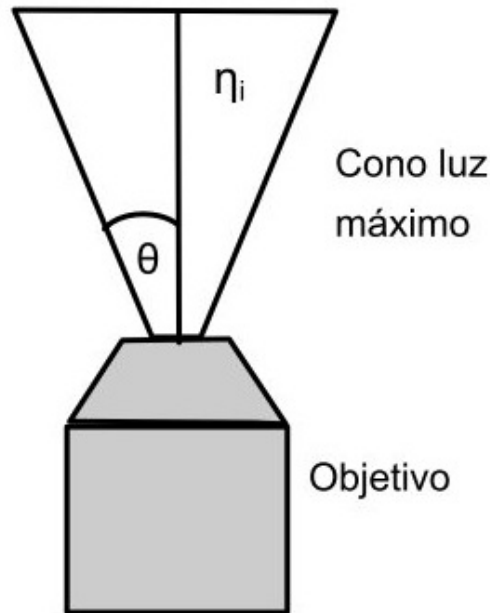


Figura 3.12: Diagrama de la apertura numérica de un objetivo

en conjunto con el objetivo del microscopio forman un conjunto de finitos conjugados, la posición en la que se aprecia enfocada la imagen no es la misma en la que el láser se encuentra enfocado, como se muestra en la figura 3.13.

3.2. Fuentes de luz

En esta sección se presentarán las fuentes de luz utilizadas comúnmente en los arreglos fluorescentes típicos y en el arreglo fluorescente propuesto. Como se ha comentado a lo largo de este capítulo, el arreglo fluorescente propuesto utiliza una fuente de luz láser que le permite una aplicación diferente.

Existe un gran número de fuentes de luz, producidas por fenómenos físicos muy variados, como la combustión, los efectos quimioluminocentes, las reacciones termonucleares, el efecto fotoacústico, etc. La mayoría de la radiación óptica es el resultado de la aceleración de electrones causada por colisiones inelásticas con átomos, iones y

Aumento	Diseño	Apertura Numérica (NA)
2.5 X	N plan	0.07
4 X	Hi plan	0.10
10 x	Hi plan L	0.22
20 X	Hi plan L	0.30

Cuadro 3.1: Características de los objetivos marca Leica con los que cuenta el equipo.

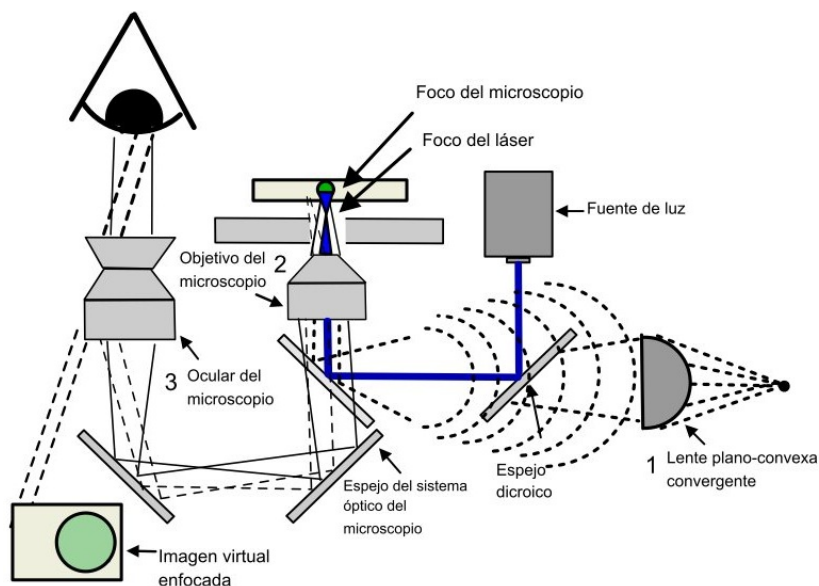


Figura 3.13: Diagrama óptico que muestra el desenfoco del haz del láser cuando se enfoca la muestra

moléculas. La radiación comprendida entre el ultra violeta y el infrarrojo cercano se produce por las transiciones electrónicas entre los niveles de energía[51].

Las fuentes de luz más comunes en la microscopía fluorescente son las de vapor de mercurio, con potencias entre 50 y 200 Watts, y las de Xenón, con potencias entre 75 y 150 watts[46]. Como se muestra en la figura 3.6, este tipo de fuentes de luz se filtran para sólo dejar pasar las longitudes de onda que coinciden con el espectro de absorción de la muestra. Este tipo de fuentes de luz presenta varios inconvenientes, el primero de ellos es que la luz emitida tiene una distribución de intensidad que no es uniforme

en todo el espectro. De hecho, en el caso de las lámparas de vapor de mercurio, los picos de intensidad se encuentran en 313 nm, 334, 365 nm, 406 nm, 435 nm, 546 nm y 578 nm, en el resto del espectro la intensidad es mucho menor y apenas es útil para excitar muestras fluorescentes [46]. El segundo inconveniente es que la intensidad de la lámpara disminuye rápidamente, su vida útil ronda entre 200 y 300 horas. Además como ya se comentó, la luz ilumina todo el campo visual y dificulta la cuantificación de la fluorescencia de cada una de las microgotas.

Una alternativa para contrarrestar los inconvenientes señalados es el láser que viene del acrónimo en inglés “Light amplification by stimulated emission of radiation”. Para el caso específico de este proyecto se buscó un láser cuya longitud de onda coincidiera con la región de mayor absorción de la fluoresceína, alrededor de 488 nm. El haz no se dispersa, lo que en el arreglo experimental permite enfocarla sobre una sola de las microgotas. La baja dispersión del haz también tiene como resultado una alta potencia por unidad de área, lo cual permite estimular con suficiente intensidad la fluorescencia.

El láser empleado en el arreglo experimental es de semiconductor, estos son los más empleados debido a su versatilidad pues existen de diversos tamaños, potencias y longitudes de onda, dicha variedad le permiten muchos tipos de aplicaciones [51]. Entre las características que lo hacen una mejor alternativa frente a otro tipo de láser encontramos: el bombeo de energía es simple y consiste en pasar una corriente eléctrica a través del dispositivo, se puede variar la intensidad al modificar la corriente que circula en él, tiene una alta eficiencia en la conversión de energía, es robusto y confiable[51].

En el arreglo experimental se usó un láser marca Coherent de la serie Sapphire con una potencia óptica ajustable entre 2 y 10 mW. Tiene una longitud de onda $\lambda=488$ nm y se muestra en la figura 3.14.

3.3. Detector

Como se explicó al inicio del capítulo, el objetivo del arreglo experimental es cuantificar la reacción química dentro de las microgotas por medio de la detección de fluores-



Figura 3.14: *Fotografía del láser empleado en el arreglo experimental*

cencia. Así que los detectores de dicha fluorescencia forman un elemento fundamental en el arreglo experimental.

Existen varios tipos de detectores que funcionan con base en diferentes fenómenos físicos, entre ellos están los cambios físico-químicos, como los que se presentan en las películas fotográficas, la ionización de sólidos o gases y el efecto fotoeléctrico. Este último es de gran interés pues ha permitido cuantificar en forma eficaz la luz visible [51]. Los detectores de efecto fotoeléctrico pueden clasificarse en dos: efecto fotoeléctrico externo y efecto fotoeléctrico interno. En el primero, un electrón de la frontera de una película delgada de semiconductor es liberado cuando la luz impacta su superficie, como ocurre en los tubos foto multiplicadores. El efecto fotoeléctrico interno se presenta cuando un fotoelectrón es generado dentro de un semiconductor y excitado a la banda de conducción como ocurre en el fotodiodo [51]. Existen varios tipos de sensores que basan su funcionamiento en el efecto fotoeléctrico interno, entre los más comunes podemos mencionar el fototransistor, el detector fotovoltaico, el fotoconductor y al fotodiodo de avalancha. El fototransistor es un dispositivo de tres terminales que tiene integrada una

región de ganancia electrónica. El detector fotovoltaico es un diodo PN de juntura o de contacto, que está polarizado en inversa y tiene una región fotosensible expuesta, en la cual los fotones generan pares electrón-hueco que son conducidos por el campo eléctrico generado por la polarización inversa formando una corriente eléctrica. El detector fotoconductor también es un diodo polarizado en inversa que cambia su conductividad cuando inciden fotones en la superficie fotosensible con una energía que excede la de la banda prohibida. En este detector se producen pares portadores electrón-hueco que facilitan la conducción. Los fotodiodos de efecto avalancha son similares a los detectores fotovoltaicos pero incluyen una región que causa el efecto avalancha y produce una ganancia en el detector [47].

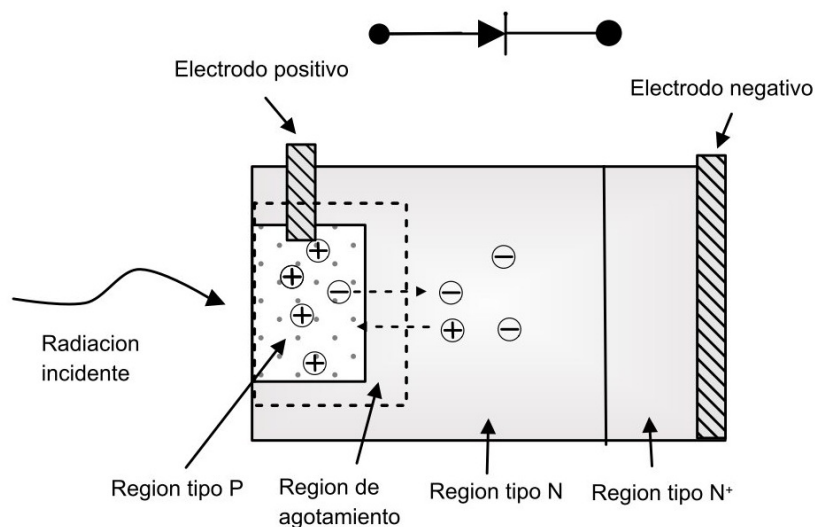


Figura 3.15: *Diagrama óptico del arreglo fluorescente láser*

En la figura 3.15 se observa el diagrama de un fotodiodo. Los fotones que inciden en él generan portadores en cada una de las regiones. Los que se forman en las regiones eléctricamente neutras tipo P y tipo N se difunden, los que son impulsados por el campo eléctrico y llegan a la región de agotamiento se convierten en portadores mayoritarios. Los portadores que se difunden generan una foto-corriente de difusión. Los pares electrón-hueco generados en la region de agotamiento son disociados por el campo

eléctrico, los electrones son conducidos hacia la región N y los huecos hacia la region tipo P. Estos portadores forman una foto-corriente de generación. La foto corriente de difusión y la foto corriente de generación conforman una foto-corriente resultante que contribuye a la corriente inversa del diodo.

La corriente total que circula por el diodo es :

$$I = -(I_S + I_{FC}) \quad (3.8)$$

I_S es la corriente en inversa cuando el diodo es polarizado en inversa y I_{FC} es la corriente inducida por los fotones. Normalmente la corriente I_S es mucho menor que I_{FC} , de esta forma la corriente que circula en el diodo es proporcional a la radiación que incide en él.

Cuando el fotodiodo se conecta a través de un voltmetro la corriente es cero y el voltaje, que depende de la foto-corriente y se puede expresar como:

$$V_F = \frac{kT}{e} \text{Ln}\left(\frac{I_{FC}}{I_S} + 1\right) \quad (3.9)$$

De la expresión anterior se puede observar que el foto-voltaje varia logarítmicamente con la foto-corriente, en consecuencia, también con la intensidad de la radiación incidente.

El efecto avalancha se produce cuando un diodo polarizado en inversa rebasa un voltaje umbral cercano al voltaje de ruptura, cuando esto ocurre la corriente inversa del diodo crece rápidamente. Si el diodo no está diseñado para trabajar en este voltaje umbral se puede dañar permanentemente.

El fotodiodo de efecto avalancha es aquel que aprovecha éste efecto para multiplicar la foto-corriente. Para evitar que el diodo se dañe permanentemente los diodos de efecto avalancha separan la región de absorción de un fotodiodo común en dos, una de absorción y una de multiplicación. La primera es usualmente de 1 micrómetro de ancho para asegurar una buena eficiencia cuántica en la absorción y tienen un campo eléctrico suficientemente alto para que los portadores viajen a la velocidad de saturación, pero suficientemente bajo para que el efecto avalancha y el efecto tunel sean despreciables. La

región de multiplicación tiene un grosor de unos cientos de nanómetros para controlar la multiplicación. A diferencia de la región de absorción en la de multiplicación el voltaje de polarización es suficientemente alto para asegurar el efecto avalancha[47].

Capítulo 4

Caracterización del arreglo experimental

En este capítulo se presenta la metodología de los ensayos fluorescentes realizados, así como los resultados obtenidos con el arreglo experimental descrito en el capítulo anterior.

4.1. Consideraciones previas a la caracterización

Como se ha mencionado, el objetivo de esta tesis es estimular fluorescencia en microgotas con un haz de luz láser y posteriormente medir la intensidad de la fluorescencia emitida por cada microgota. Como en todo trabajo de investigación, llegar a ese objetivo requirió de muchas pruebas preliminares, adecuaciones y ajustes. En éste caso, dichas pruebas fueron desde lo más sencillo como simplemente desempacar, instalar y probar el láser, hasta comparar el desempeño de distintos programas de adquisición de datos al realizar los ensayos fluorescentes con microgotas a las frecuencias más altas que se lograron.

El arreglo óptico presentado en el capítulo anterior requirió también de adecuaciones. La altura mínima de los soportes de los espejos obligó a diseñar y fabricar cuatro soportes de aluminio que levantaron el microscopio 3.2 cm y dos más que subieron al

láser 4.2 cm. Estos soportes, además de incrementar la altura del microscopio y del láser, fijaron estos dispositivos en una posición. Un problema similar ocurrió con uno de los filtros pues el diámetro de éste era menor que el del soporte proporcionado por el fabricante del microscopio. En este caso también fue necesario diseñar y fabricar un soporte en aluminio para ajustar los diámetros.

Una vez que se instalaron los elementos en la mesa óptica se probó el láser. Como se comentó en el capítulo anterior, el láser es de la marca Coherent de la serie Sapphire modelo 488-10. Este permite seleccionar un intervalo de potencia óptica de salida que va de 1 a 11 mW. La prueba comenzó ajustando la potencia de salida a 1 mW y esperar a que el medidor de potencia con el que cuenta el láser indicara que efectivamente se está suministrando la potencia seleccionada. Después de 1 hora el valor no logró estabilizarse y osciló entre .8 mW y 1.2 mW, lo mismo ocurrió para las potencias de 2 mW y 3mW. A partir de la potencia de 4 mW el láser estabilizaba su salida en menos de 5 segundos, marcando un valor constante con la resolución de décimas de mW con la que cuenta el indicador de potencia de salida del láser. Una posible explicación para esta inestabilidad es que el laboratorio no cuenta con condiciones ambientales controladas, tales como temperatura y humedad. Para evitar dicha inestabilidad se usó el intervalo de potencia entre 4 mW y 10 mW.

El siguiente elemento que se probó fue la tarjeta de adquisición de datos marca National Instruments de la serie X-DAQ modelo USB-6351. Una de las características más importantes para nuestro arreglo es que cuenta con 16 entradas analógicas de 16 bits de resolución con entrada de ± 10 V y una velocidad de muestreo de 1.25 MS/s cuando esta configurada en un canal, o de 1 MS/s, cuando está configurada en multicanal. La prueba se realizó con el software de diagnóstico que incluye el proveedor. Una vez que fue satisfactoria, se probaron en conjunto el fotodiodo de avalancha de la marca Hinds Instruments y la tarjeta de adquisición, y las lecturas se compararon con las adquiridas con un osciloscopio digital USB.

4.2. Metodología para realizar los ensayos fluorescentes

Para iniciar las pruebas de fluorescencia, fue necesario preparar las soluciones de la sal de fluoresceína en un buffer de fosfatos (pH=7.19, 50 mM) , el cual tiene la finalidad de estabilizar el pH de la disolución, esto es importante por que la fluoresceína modifica su comportamiento de acuerdo al pH en el que se encuentre. La primera disolución que se preparó tenía una concentración de fluoresceína de 150 micro molar (μM) y con ella se iniciaron las pruebas con microgotas.

En estas primeras pruebas se empleó el objetivo del microscopio de 4X. Al tener un campo de visión más amplio era posible observar el comportamiento de los flujos de aceite y fluoresceína simultáneamente y encontrar mas rápidamente la relación adecuada de flujos que forman las microgotas. Sin embargo, como se mencionó en el capítulo 3, el objetivo de 4X tiene una apertura numérica 0.10, lo cual limita la cantidad de luz que es captada por el objetivo y que será conducida por el arreglo óptico hacia el fotodiodo de efecto avalancha. Con este objetivo la intensidad registrada por el fotodiodo era cercana a 40 mV; sin embargo, cuando se cambió por el objetivo de 20X con una apertura numérica de 0.30 la intensidad alcanzo mas de 1 volt.

4.2.1. Ensayos con flujos continuos

En esta sección se explicará la metodología seguida para realizar ensayos fluorescentes en flujos constantes y obtener las curvas de sensibilidad del arreglo experimental.

Al realizar las pruebas preliminares con microgotas, se observó que la intensidad de la fluorescencia sensada por el fotodiodo de avalancha era afectada por numerosos factores, entre los que destacan: la potencia del láser, la velocidad del flujo y la concentración de la disolución de fluoresceína. Para conocer con certeza cómo afectan estos factores se diseñaron experimentos en los que se modificó cada uno de estos factores y así obtener las curvas de sensibilidad.

En los experimentos propuestos se probaron 4 potencias del láser comenzando en 4 mW, pues como ya se comentó, niveles menores de potencia no mostraron estabilidad. Las potencias fueron 4 mW, 6 mW, 8 mW y 10 mW. También se propusieron 4 flujos que fueron 50 $\mu\text{L}/\text{h}$, 100 $\mu\text{L}/\text{h}$, 150 $\mu\text{L}/\text{h}$ y 200 $\mu\text{L}/\text{h}$. Para suministrar dichos flujos se emplearon bombas de jeringa marca y jeringas marca DB de 3 mL. El tercer factor con el que se experimentó fue el de la concentración de la disolución de fluoresceína preparada. Para conocer la sensibilidad del arreglo a bajas concentraciones se prepararon disoluciones con concentraciones de 1 μM , 5 μM , 10 μM y 50 μM .

Para obtener las curvas se dejaron dos de los parámetros a explorar fijos y se fue variando el tercero de ellos. El primer procedimiento que se siguió fue hacer circular las 4 concentraciones de fluoresceína simultáneamente en el chip microfluídico que tiene 4 microcanales de 1 cm de largo y aproximadamente 100 μm de ancho y alto, como los que se caracterizaron en el capítulo 2. La velocidad de flujo era la misma para las 4 concentraciones. Para obtener la lectura se posicionaba el haz del láser en uno de los microcanales con cierta concentración y se adquirían los datos con el software Labview de National Instruments. Hecho lo anterior, se colocaba el haz del láser en el siguiente microcanal con diferente concentración de fluoresceína y se repetía el procedimiento de adquisición de datos. Cuando se habían completado las lecturas para las cuatro concentraciones se cambiaba la potencia del láser y se repetía el procedimiento. Cuando se habían concluido las mediciones para las 4 potencias del láser se modificaba la velocidad de flujo de las 4 concentraciones y se repetía todo el proceso hasta concluir los 64 puntos de los que consta el experimento.

La metodología anterior presentó las siguientes desventajas: el haz del láser siempre quedaba en una posición diferente del microcanal. Esto modifica la lectura de intensidad pues el flujo dentro de un microcanal tiene un perfil de velocidades de tal forma que en el centro el fluido circula a una mayor velocidad, ocasionando que el fenómeno de sobre exposición o foto blanqueo se presenta en menor medida. La segunda desventaja es que al mover constantemente la posición de la platina para localizar el microcanal de interés, las mangueras conectadas al chip microfluídico se movían provocando ligeras

variaciones en la velocidad del flujo y propiciando la aparición de fugas de fluoresceína en los puntos de acoplamiento de las mangueras con el chip microfluídico. Dichas fugas se traducen en velocidades de flujo diferentes a las seleccionadas en la bomba. La tercera razón es que al tener las 4 bombas prendidas aumentaban las vibraciones en la mesa óptica y la lectura de la señal era más ruidosa que cuando solo estaba una bomba encendida. Se comprobó que golpes y vibraciones en la mesa óptica generan picos en la intensidad de la lectura, esto sucede debido a que dichas perturbaciones en la mesa causan un aumento instantáneo y de corta duración en la velocidad del flujo que es alcanzado por el haz de luz láser, en consecuencia se presenta menos foto blanqueo.

Para resolver las desventajas mencionadas se cambió el procedimiento. Se colocó una concentración en una de las bombas, se seleccionó un flujo constante, se posicionó el haz de láser, procurando que fuera en el centro, y se tomaron las lecturas variando la potencia en los cuatro valores propuestos de 4, 6, 8 y 10 mW. Hecho lo anterior se cambió el flujo y se repitió el procedimiento. Lo mismo se realizó para las cuatro concentraciones.

Estos experimentos se repitieron 5 veces para tener una media confiable, conocer la desviación estándar de las lecturas y así verificar que los ensayos son repetibles. Cuando se realizaron los primeros ensayos con flujos constantes, se observó que en la señal había unos picos en los niveles de intensidad como los que se observan en la figura 4.1.A. Estos picos son periódicos y son resultado del avance de los motores de la bomba con la que se inyecta la fluoresceína a los microcanales. Esto se comprobó cuando la frecuencia con la que aparecen aumentó conforme se incremento la velocidad del flujo, lo cual se puede apreciar en las figuras 4.1.B y 4.1.C, en las que se muestran señales adquiridas con flujos de $100 \mu\text{L/h}$ y $150 \mu\text{L/h}$, respectivamente. Esto representó una dificultad para obtener las curvas de sensibilidad pues se pretendía obtener los valores promedio de cada una de estas lecturas, repetir el experimento 5 veces, hacer el promedio de la lectura y así tener cada uno de los puntos que conforman las curvas de sensibilidad y su desviación estándar. Además de los picos, el tiempo que tardaba en estabilizarse la lectura fue otra razón que impidió promediar directamente todos los datos adquiridos

en cada una de las lecturas.

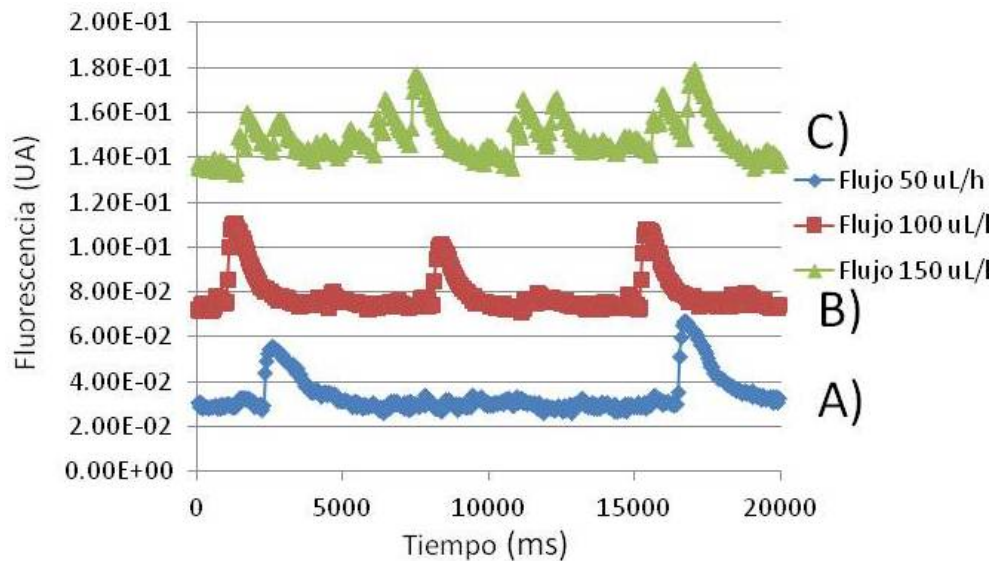


Figura 4.1: *Medición de fluorescencia, en esta se observa un aumento en la frecuencia de las perturbaciones de acuerdo al aumento en el flujo (las gráficas B y C fueron desplazadas verticalmente para observarlas simultáneamente). Condiciones: fluoresceína 5 μ M, láser 8 mW, flujos: 50 (μ L/h), 100 (μ L/h) y 150 (μ L/h).*

Las razones anteriores obligaron a graficar cada una de las lecturas y usar un criterio para seleccionar los datos que se promediarían para obtener un valor. Por ejemplo, de la gráfica presentada en figura 4.1.A, se tomó el promedio de los datos comprendidos entre 5000 y 15000. De la gráfica de la figura 4.1.B se hizo el promedio de los datos comprendidos entre 10000 y 15000. Cuando la gráfica tenía los picos muy próximos como para poder identificar una región plana como se observa en la figura 4.1.C, se realizó un promedio de toda la señal. Esta última gráfica parecía representar una señal ruidosa, sin embargo, se observó que el nivel de ruido de la señal es menor, esto fue posible apagando la bomba y registrando la señal, la cual presentaba oscilaciones de alrededor de 3 mV. También se observó la señal de ruido, con el sistema prendido y apuntando el láser fuera del microcanal, así se observó el ruido el cual también osciló aproximadamente 2 mV. De lo anterior se concluyó que las irregularidades observadas

en la figura 4.1.C, son fluctuaciones reales de la velocidad de flujo producidas por el mecanismo de control de las bombas.

4.2.2. Curvas de sensibilidad obtenidas con flujos continuos

A continuación se presentan las curvas de sensibilidad obtenidas.

En la gráfica 4.2 se observan las lecturas adquiridas con la concentración de fluoresceína más baja que correspondió a $1 \mu\text{M}$. Dicha concentración, junto con la velocidad de flujo de $50 (\mu\text{L}/\text{h})$ y la potencia del láser de 4 mW fueron las condiciones con las que se adquirieron las señales de fluorescencia de menor intensidad alrededor de 11 mV . En consecuencia el ruido cercano a 2 mV influyó más en esta lectura, esto se puede observar en la desviación estándar.

En la figura 4.3 se observa la gráfica de intensidad contra velocidad de flujo para las cuatro potencias del láser empleadas y sus respectivas desviaciones estándar. En las gráficas de desviación estándar correspondientes a la potencia de láser de 4 y $6 (\text{mW})$ se observa un comportamiento interesante, pues para la gráfica en donde la potencia del láser se mantuvo a $4(\text{mW})$ el segundo y cuarto valor son menores que el primero y tercero respectivamente, es decir no se aumento la intensidad de la señal al aumentar la velocidad del flujo.

La figura 4.4 muestra la gráfica de intensidad contra potencia láser para el ensayo realizado con una concentración de $5 (\mu\text{M})$, en la que se observa un comportamiento más uniforme que el mostrado en la figura 4.2, es decir que para esta concentración la intensidad de la señal de fluorescencia aumenta conforme aumentan los parámetros de velocidad de flujo y potencia de láser. Por otro lado el comportamiento empleando un flujo de $50 (\mu\text{L}/\text{h})$ fue el que mostró un mayor porcentaje de desviación estándar, tal como ocurrió en el ensayo de concentración $1 (\mu\text{M})$ y que se observa en la figura 4.2. También comparando estas dos gráficas se observa que la segunda presenta una desviación estándar menor que la primera, salvo para el flujo de $50 (\mu\text{L}/\text{h})$.

A continuación se presenta la figura 4.5 en la que se grafica la intensidad (V) contra

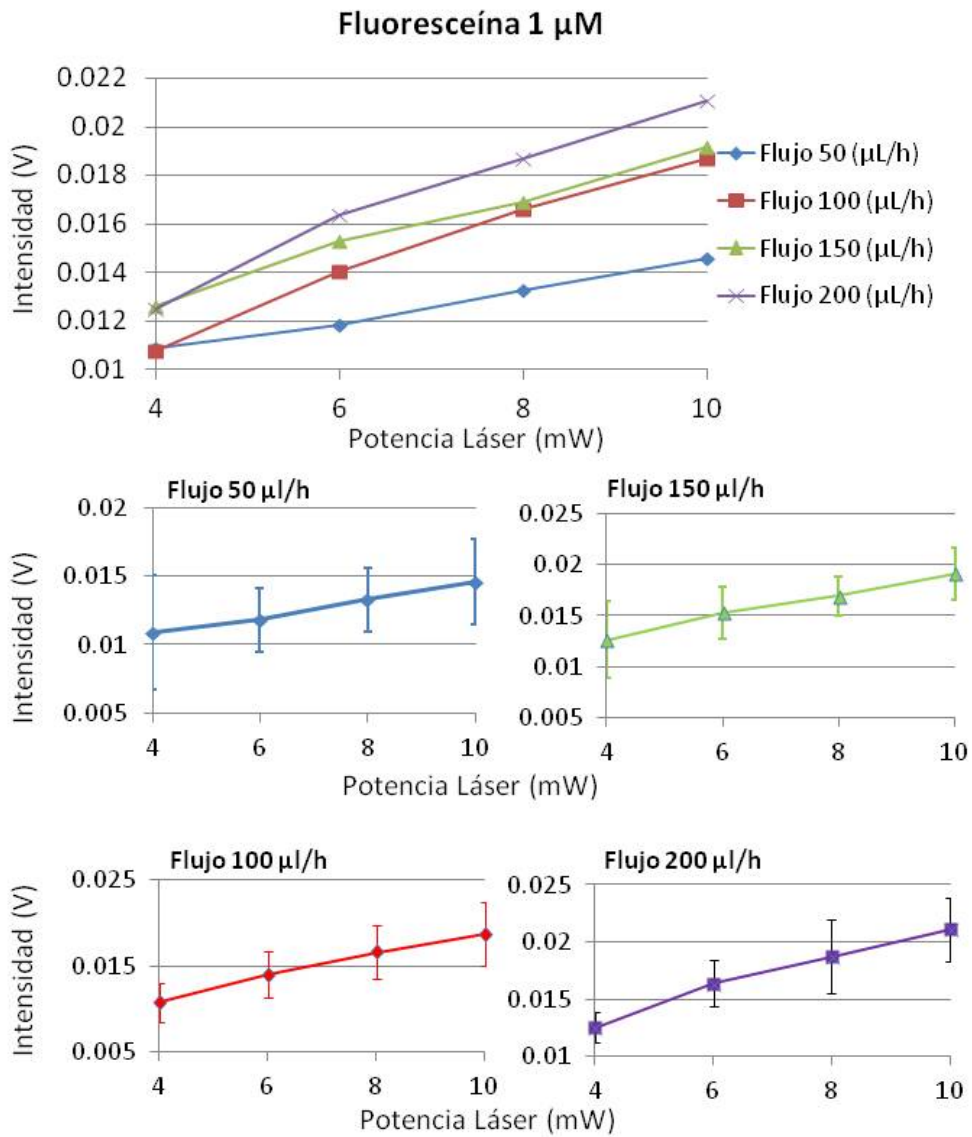


Figura 4.2: Gráfica de intensidad (V) contra Potencia del Láser (mW), para los flujos de 50 (μ L/h), 100 (μ L/h), 150 (μ L/h), 200 (μ L/h) y fluoresceína con una concentración de 1 (μ M). Abajo se muestra la desviación estándar de las lecturas.

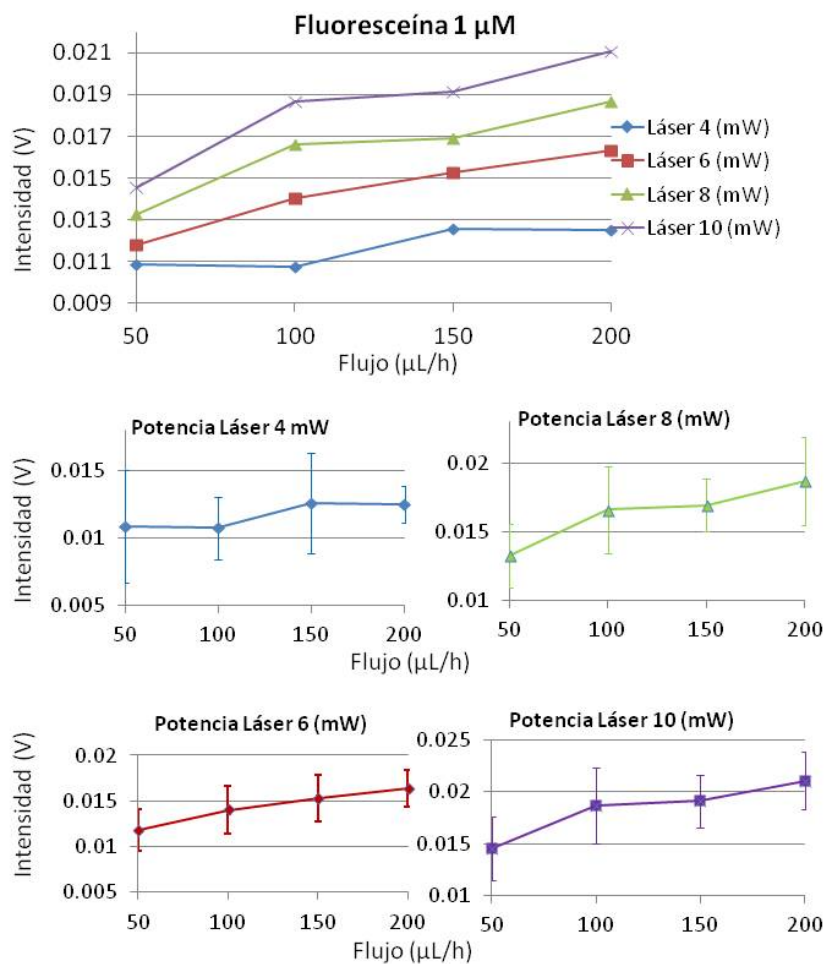


Figura 4.3: Gráfica de intensidad (V) contra Flujo ($\mu\text{L/h}$), para las potencias de láser de 4 (mW), 6 (mW), 8 (mW) y 10 (mW) y fluoresceína con una concentración 1 (μM). Abajo se muestra la desviación estándar de las lecturas.

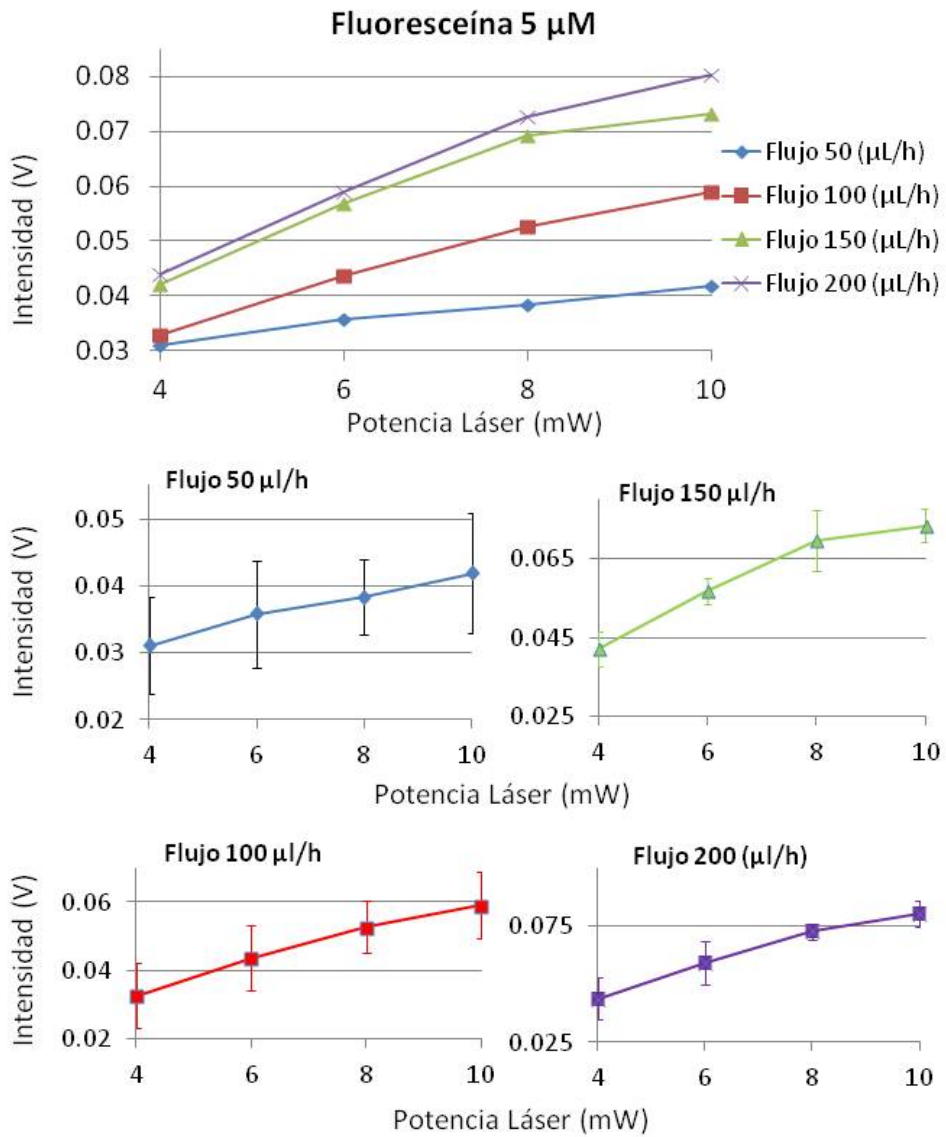


Figura 4.4: Gráfica de intensidad (V) contra Potencia del Láser (mW), para los flujos de 50 ($\mu\text{L/h}$), 100 ($\mu\text{L/h}$), 150 ($\mu\text{L/h}$), 200 ($\mu\text{L/h}$) y fluoresceína con una concentración de 5 (μM). Abajo se muestra la desviación estándar de las lecturas

flujo ($\mu\text{L/h}$), con una concentración de fluoresceína $5\ (\mu\text{M})$. En la gráfica de la desviación estándar para la potencia del láser de $4\ (\text{mW})$ se observa un comportamiento parecido al mostrado en la figura 4.3, si bien en esta gráfica el segundo valor si es mayor que el primero, el incremento es apenas perceptible. Además la desviación estándar para ese punto fue la más grande para esa potencia de láser y concentración de fluoresceína. Lo anterior podría deberse a un comportamiento irregular de la bomba para esa velocidad de flujo.

Flujo ($\mu\text{L/h}$)	Media (V)	Desviación (%)
50	0.031	23.46
100	0.032	29.49
150	0.042	10.62
200	0.043	20.97

Cuadro 4.1: *Porcentaje de desviación estándar de intensidad contra flujo para fluoresceína de $5\ (\mu\text{M})$ y potencia láser de $4\ (\text{mW})$*

Potencia láser (mW)	Media (V)	Desviación (%)
4	0.042	10.62
6	0.056	5.88
8	0.069	10.99
10	0.073	5.87

Cuadro 4.2: *Porcentaje de desviación estándar de intensidad contra potencia láser para fluoresceína de $5\ (\mu\text{M})$ y flujo de $150\ (\mu\text{L/h})$*

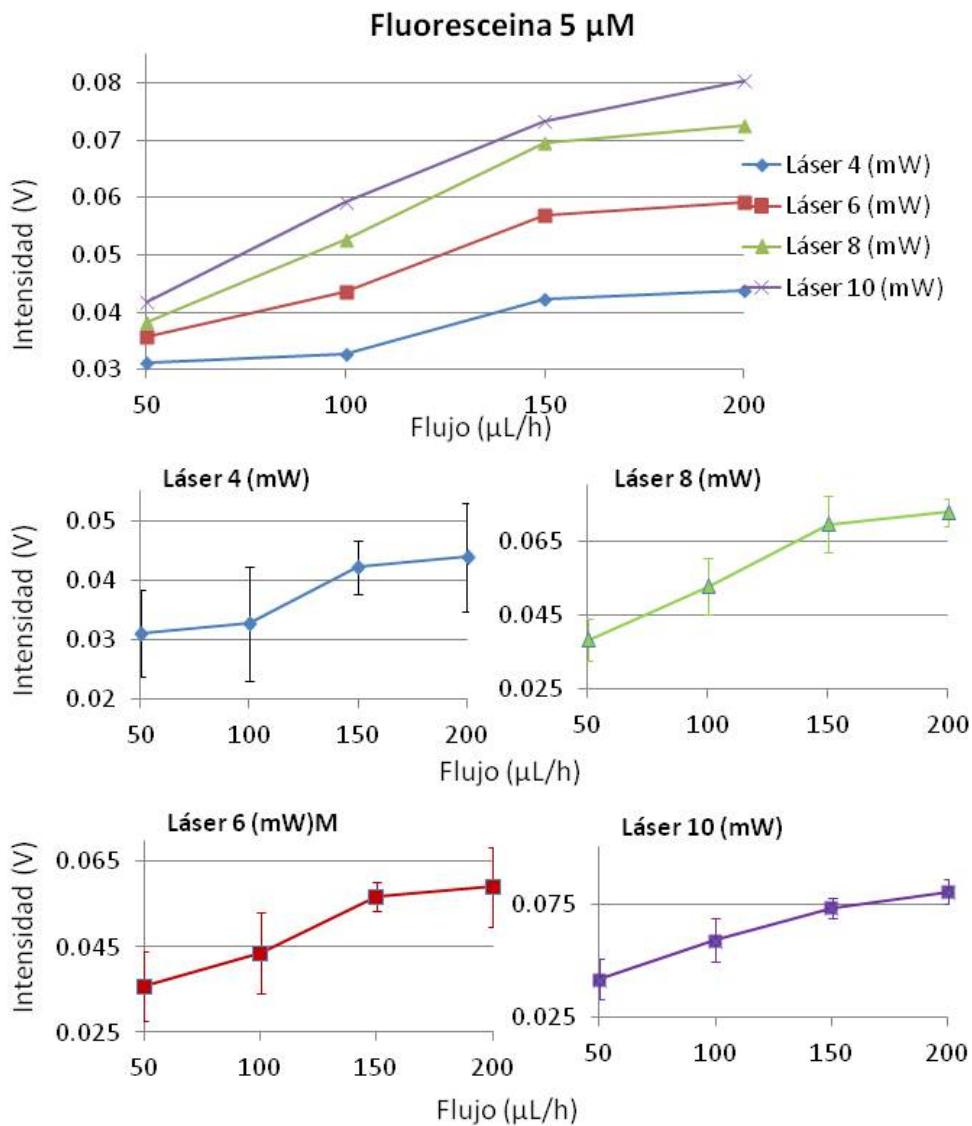


Figura 4.5: Gráfica de intensidad (V) contra Flujo (μ L/h), para las potencias de láser de 4 (mW), 6 (mW), 8 (mW) y 10 (mW) y fluoresceína con una concentración de 5 (μ M). Abajo se muestra la desviación estándar de las lecturas.

En la figura 4.6 se observa la gráfica de intensidad (V) contra potencia láser (mW) del ensayo realizado con fluoresceína constante a 10 (μ M). Note que se presenta un comportamiento consistente para todos los valores, la gráfica de desviación estándar del flujo de 50 (μ L/h) tiene los valores mas amplios porque como ya se menciono una

velocidad de flujo baja afecta la dispersión del ensayo. El resto de desviaciones estándar son menores y muy parecidas entre sí.

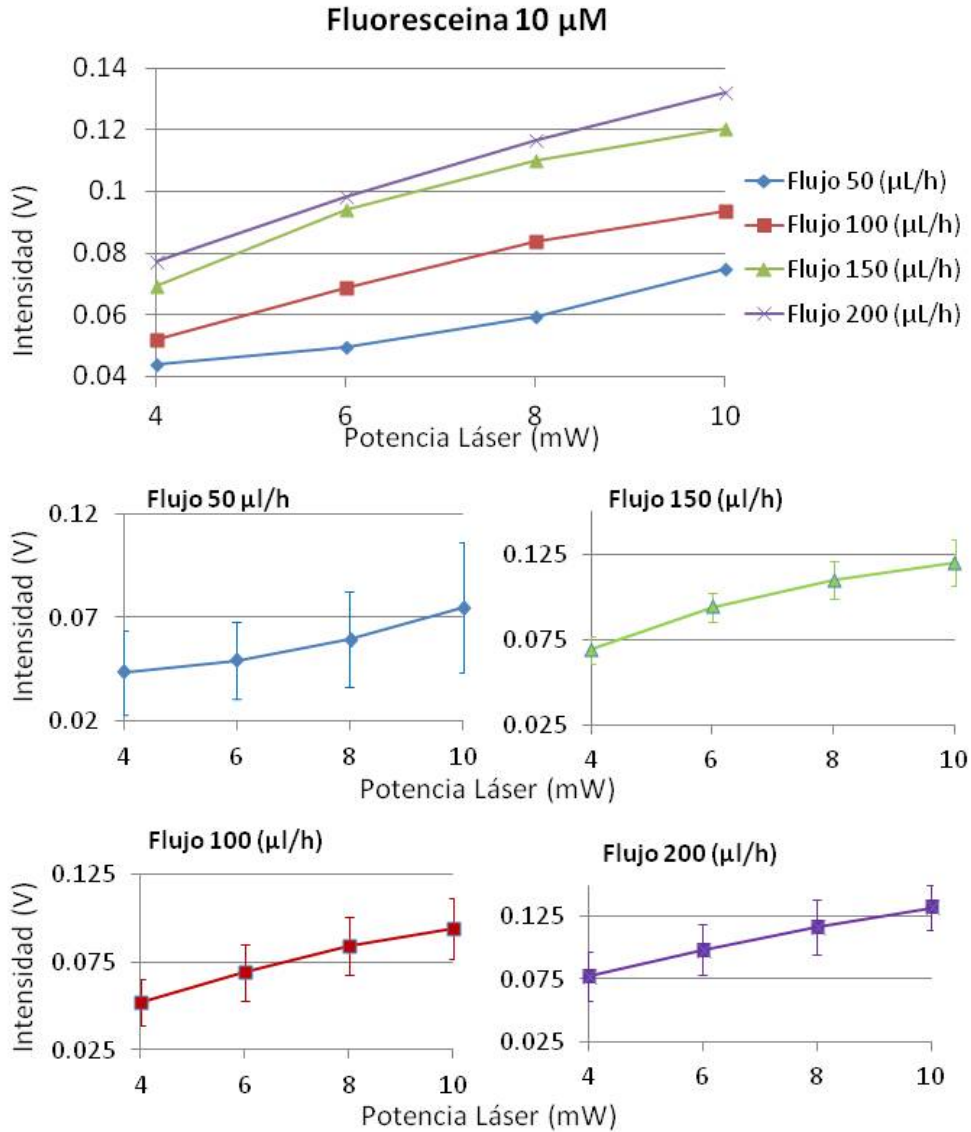


Figura 4.6: Gráfica de intensidad (V) contra Potencia del Láser (mW), para los flujos de 50 ($\mu\text{L/h}$), 100 ($\mu\text{L/h}$), 150 ($\mu\text{L/h}$), 200 ($\mu\text{L/h}$) y fluoresceína con una concentración de 10 (μM). Abajo se muestra la desviación estándar de las lecturas.

En la figura 4.7 se observan los resultados del ensayo realizado con una concentración de fluoresceína de 10 (μM). A diferencia de las gráficas de los ensayos realizados con

concentraciones de 1 y 5 (μM), en ésta no hubo valores que fueran menores a los esperados. En las gráficas de desviación estándar se observa que el flujo de 150 ($\mu\text{L/h}$) presenta una desviación estándar menor que el resto de los valores de velocidad de flujo en forma apreciable.

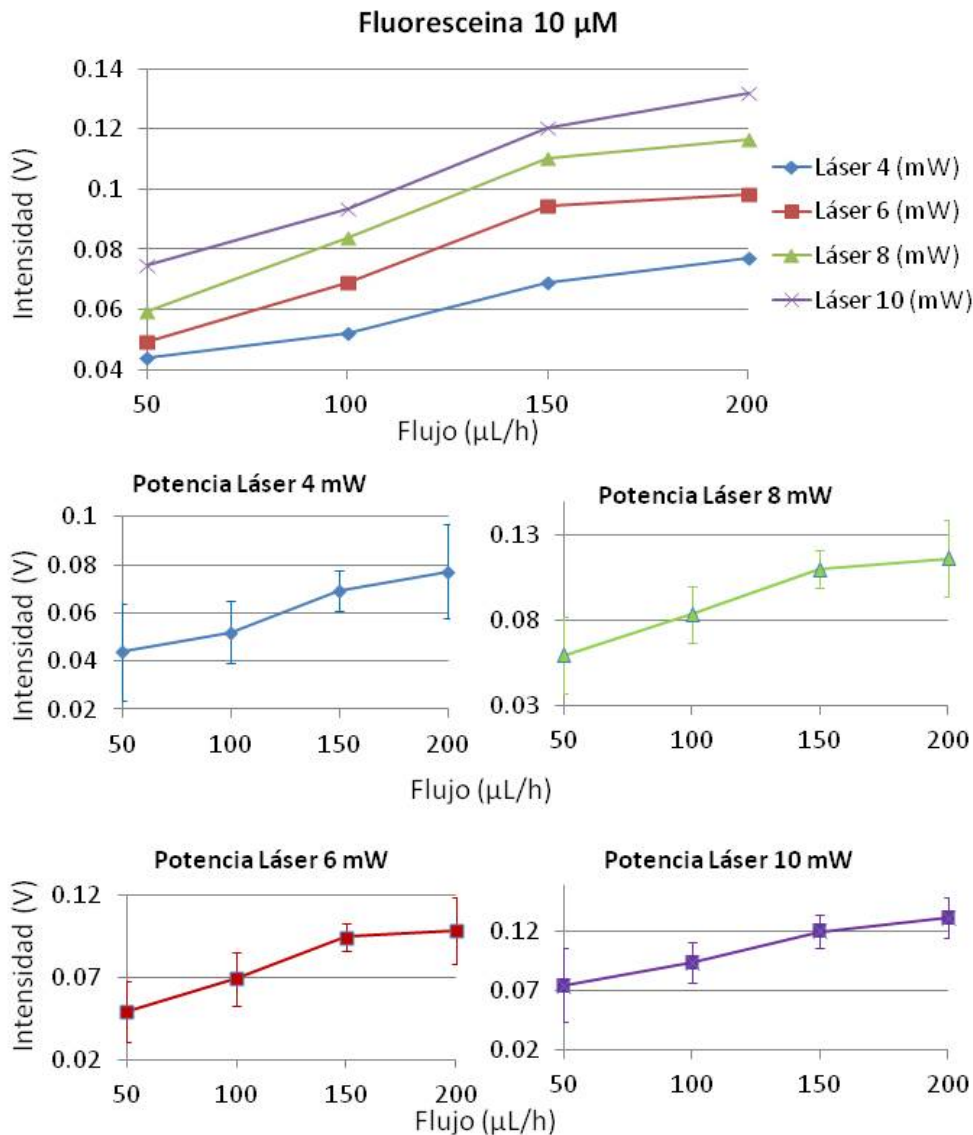


Figura 4.7: Gráfica de intensidad (V) contra Flujo ($\mu\text{L/h}$), para las potencias de láser de 4 (mW), 6 (mW), 8 (mW) y 10 (mW) y fluoresceína con una concentración de 10 (μM). Abajo se muestra la desviación estándar de las lecturas.

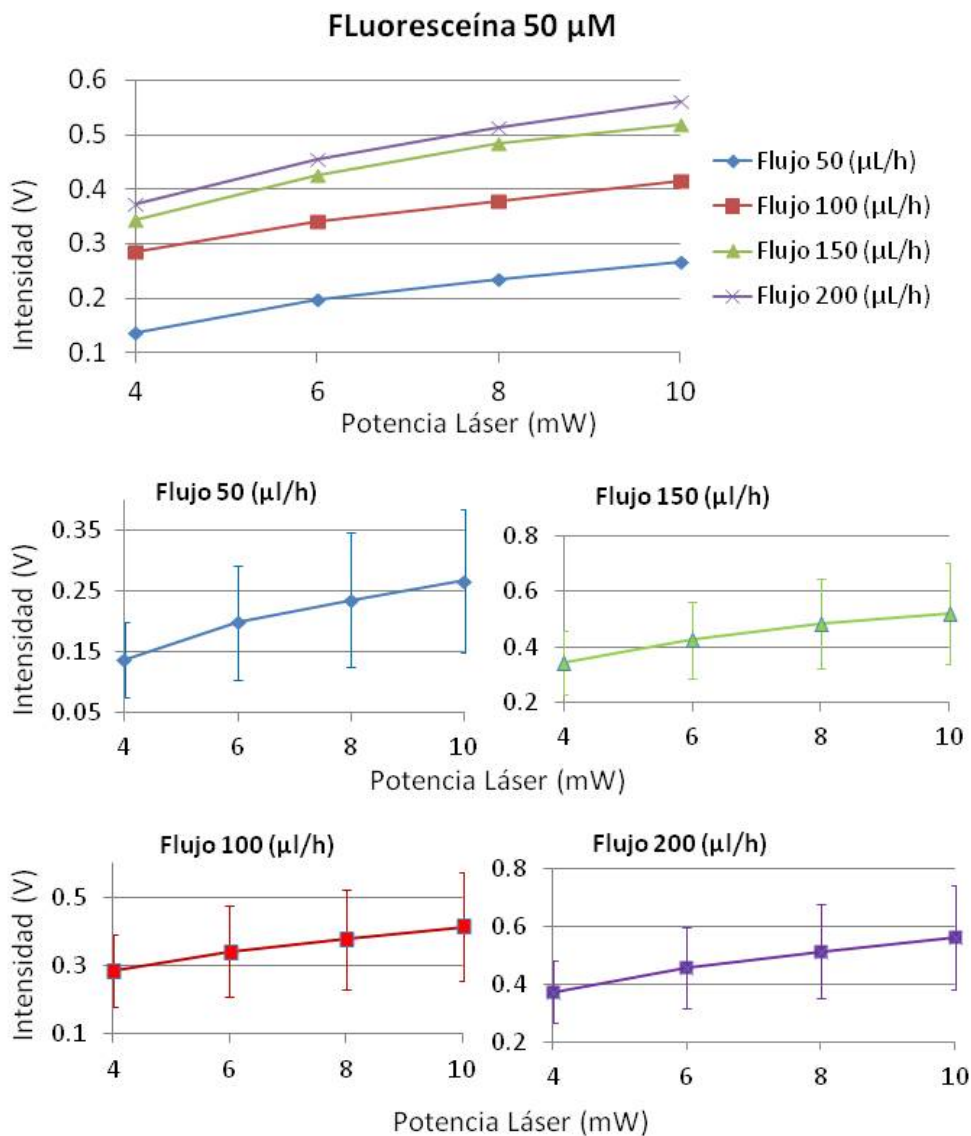


Figura 4.8: Gráfica de intensidad (V) contra Potencia del Láser (mW), para los flujos de 50 ($\mu\text{L/h}$), 100 ($\mu\text{L/h}$), 150 ($\mu\text{L/h}$), 200 ($\mu\text{L/h}$) y fluoresceína con una concentración de 50 (μM). Abajo se muestra la desviación estándar de las lecturas.

En la figura 4.8 se muestra el ensayo realizado con fluoresceína a una concentración fija de 50 (μM) y en ésta se presenta un comportamiento interesante, pues si bien las tendencias están bien definidas y se ajustan muy bien a una recta de pendiente constante, las desviaciones estándar son grandes. Una forma de interpretar lo anterior es que debido a la alta concentración de fluoresceína, la fluorescencia emitida es muy dependiente de los otros dos parámetros: velocidad de flujo y potencia del láser. Como se comentó al inicio del capítulo las bombas tienen un comportamiento irregular y esto puede afectar la dispersión de estas lecturas. A continuación se presenta la tabla 4.3 donde se pueden observar los porcentajes de desviación estándar, los más bajos observados para los parámetros probados se presentan en la tabla 4.2.

Potencia láser (mW)	Media (V)	Desviación (%)
4	0.1366	45.78
6	0.1983	47.51
8	0.2355	47.05
10	0.2670	44.11

Cuadro 4.3: *Porcentaje de desviación estándar de intensidad contra potencia láser para fluoresceína de 50 (μM) y flujo de 50 ($\mu\text{L/h}$)*

La figura 4.9 muestra la gráfica de intensidad (V) contra concentración (μM), para los cuatro flujos propuestos y las cuatro concentraciones a una potencia del láser de 10 (mW). En ella se puede observar que el sistema tiene un comportamiento consistente para todas las concentraciones empleadas, en otras palabras el aumento de la fluorescencia fue proporcional al aumento de flujo para todos los puntos. En la parte de abajo de la misma figura se observa la desviación estándar de las lecturas, debido a la escala la única visible fue para la concentración de 50(μM), que es la más grande en valores absolutos y en porcentaje. El resto de las desviaciones estándar, que se muestran en la tabla 4.4, fueron similares a las observadas en las gráficas anteriores, la mayoría debajo del 20% de la amplitud de la señal excepto en los flujos de 50 ($\mu\text{L/h}$) y para la concentración de 50 (μM).

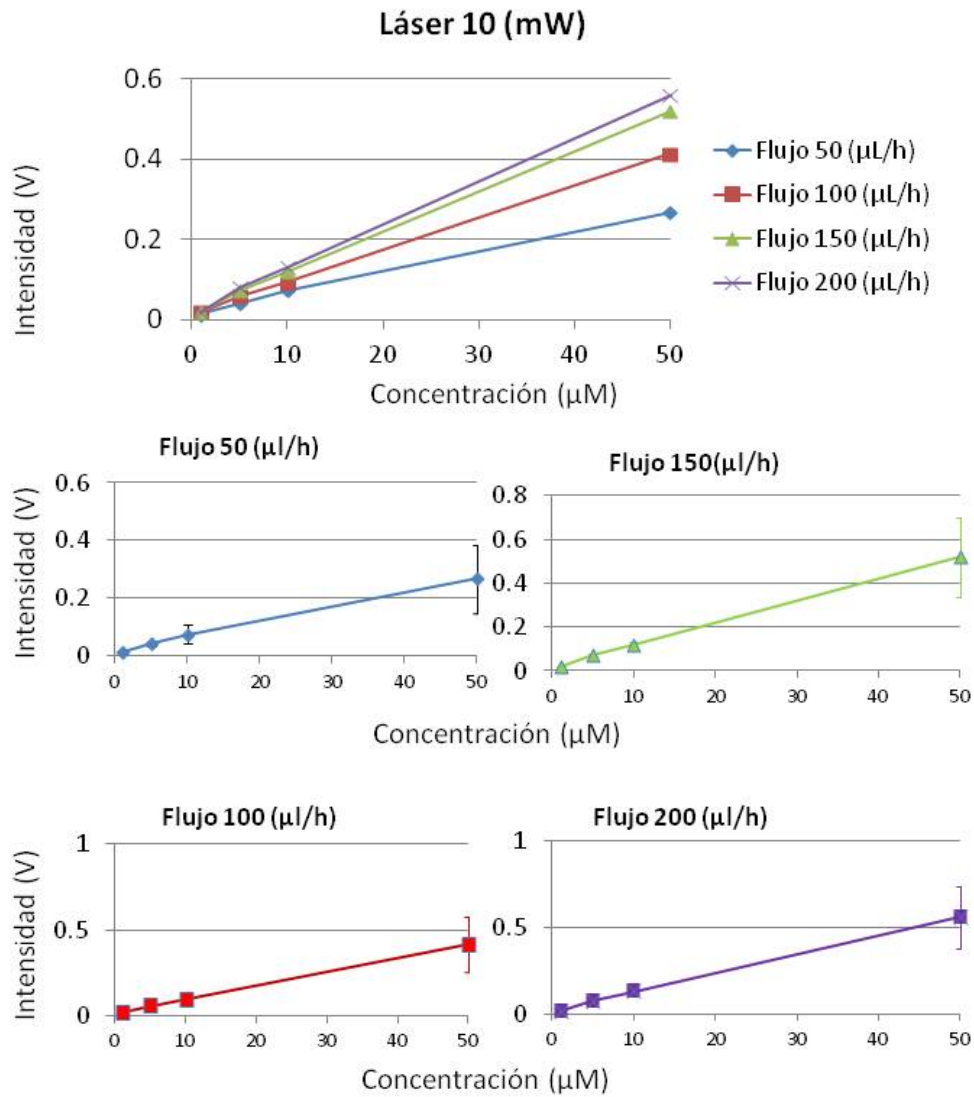


Figura 4.9: Gráfica de intensidad (V) contra concentración (μM), para los flujos de 50 ($\mu\text{L/h}$), 100 ($\mu\text{L/h}$), 150 ($\mu\text{L/h}$), 200 ($\mu\text{L/h}$) y potencia de 10 mW. Abajo la desviación estándar de las lecturas

Flujo ($\mu\text{L/h}$)	Concentración (μM)	Desviación (%)
50	1	21.156
50	5	21.34
50	10	42.18
50	50	44.11
100	1	19.70
100	5	16.18
100	10	18.22
100	50	38.50
150	1	13.22
150	5	5.87
150	10	11.26
150	50	34.72
200	1	13.12
200	5	6.82
200	10	13.34
200	50	31.91

Cuadro 4.4: *Porcentaje de desviación estándar de Flujo ($\mu\text{L/h}$) contra Concentración (μM), para la potencia láser de 10 (mW)*

En la figura 4.10 se muestran las gráficas de intensidad (V) contra concentración (μM), para los cuatro flujos y para las potencias del láser de 4, 6 y 8 (mW). En estas gráficas se aprecia claramente el aumento de la intensidad al incrementar la velocidad de flujo, la concentración y la potencia del láser. En este caso no se incluye la desviación estándar porque los valores no se aprecian debido a la diferencia de escala que provoca el cambio de concentración como se observó en la figura 4.9, además el dato se puede consultar en las gráficas previas.

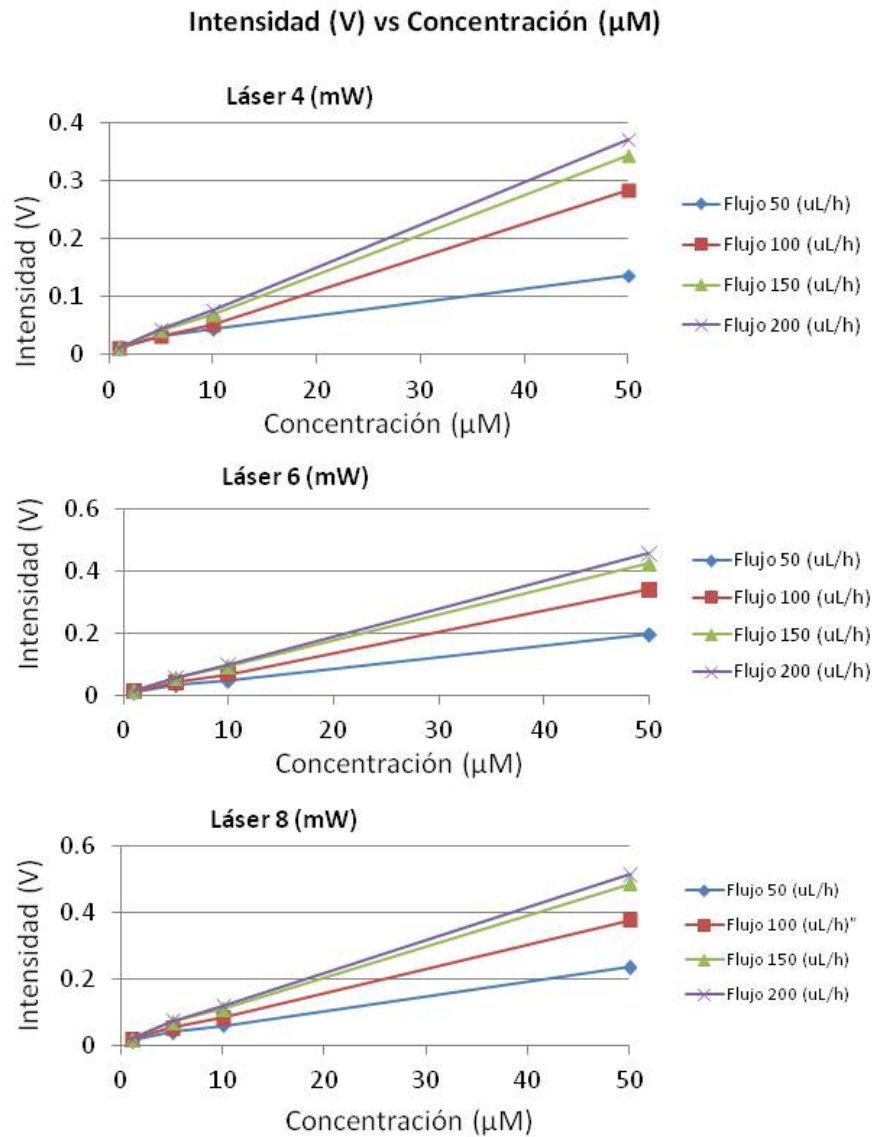


Figura 4.10: Gráfica de intensidad (V) contra concentración (μM), para los flujos de 50 ($\mu\text{L/h}$), 100 ($\mu\text{L/h}$), 150 ($\mu\text{L/h}$), 200 ($\mu\text{L/h}$) y potencias de láser de 4, 6 y 8 (mW)

4.2.3. Discusión de los resultados

Como se mencionó al inicio de este capítulo, los ensayos preliminares permitieron observar el comportamiento general del sistema. Las curvas de sensibilidad permitieron comprobar y cuantificar los efectos de la variación en las condiciones de los ensayos.

Del conjunto de gráficas de los ensayos para flujos constantes se observó que a mayor potencia del láser, mayor fue la intensidad de la fluorescencia detectada, tal como podría esperarse para el intervalo de potencias utilizado, para una potencia de láser mayor podría presentarse un foto-blanqueo que limite este comportamiento. Lo mismo ocurrió para los intervalos propuestos para la velocidad de flujo y la concentración. Sin embargo, las curvas de sensibilidad muestran detalles que vale la pena resaltar. El primero de ellos lo podemos observar en la gráfica de intensidad contra velocidad de flujo, para una potencia láser de 4 (mW) de la figura 4.3, en la cual se observa que el segundo punto, que corresponde a una velocidad de flujo de 100 ($\mu\text{L}/\text{h}$) tiene una amplitud menor que el correspondiente a 50 ($\mu\text{L}/\text{h}$). Una posible explicación, es que para esta concentración de fluoresceína el sistema se encuentre en el límite de sensibilidad. Una segunda posibilidad es que para esta concentración el fenómeno de foto blanqueo, sea apenas perceptible entonces el cambio en el flujo pierde importancia, y una tercera posibilidad, es que el criterio usado para discriminar los pulsos de las bombas al obtener el promedio de las lecturas no fuera el mas apropiado. Sería conveniente repetir estos ensayos modificando las condiciones de bombeo de la fluoresceína usando bombas de mejor calidad o cambiando el diámetro de las jeringas usadas en ellas, lo que provoca que la velocidad con la que se mueve el pistón que la empuja sea mayor y quizá más uniforme.

Se observó que independientemente de la concentración de fluoresceína y la potencia del láser, las lecturas obtenidas con los flujos de 150($\mu\text{L}/\text{h}$) y 200($\mu\text{L}/\text{h}$) eran más cercanas entre si que las medidas con flujos de 50($\mu\text{L}/\text{h}$) y 100($\mu\text{L}/\text{h}$). De lo anterior se puede concluir que para el sistema propuesto el efecto de foto blanqueo es muy notorio para flujos entre 50 ($\mu\text{L}/\text{h}$) y 150($\mu\text{L}/\text{h}$).

Otro resultado interesante es que para el flujo de 150($\mu\text{L}/\text{h}$) se obtuvo un porcentaje de desviación estándar menor que para el resto, independientemente de la concentración de fluoresceína y la potencia del láser. Este efecto probablemente este relacionado con los pulsos de las bombas.

En las gráficas de intensidad contra potencia del láser siempre se observaron incre-

mentos muy lineales en el intervalo de potencia que se pudo seleccionar; sería interesante observar el comportamiento con un láser de mayor potencia.

Si bien conocer el límite de sensibilidad inferior es de mayor interés, la desviación estándar de los ensayos realizados con fluoresceína con una concentración de $50 \mu\text{M}$ mostraron que para ciertos parámetros el porcentaje de desviación estándar es de más del 40 % lo que indica que los resultados no son muy repetibles.

4.3. Ensayos fluorescentes con microgotas

En esta sección se presentan los resultados de los ensayos realizados con microgotas, para formarlas se empleó un chip microfluídico como el mostrado en la figura 4.11. En la parte superior de la figura se observa una entrada en el PDMS por donde se bombeará aceite mineral, en la parte media, adentro del pentágono, se observan tres entradas por las que se bombearán diferentes compuestos; para realizar la caracterización se introdujo una solución de fluoresceína por una sola de las entradas.

Las condiciones para realizar estos ensayos se propusieron con base en las curvas de sensibilidad obtenidas para flujos constantes. Se usó una disolución de fluoresceína con una concentración de $10 (\mu\text{M})$ pues mostró un mejor balance de intensidad-desviación estándar que la observada con la concentración de $50 (\mu\text{M})$. La potencia del láser se ajustó a 8 mW y no a la máxima de 10 mW porque 8 mW fueron suficientes para obtener buenas lecturas para la solución de $10 (\mu\text{M})$ de fluoresceína, además, debido a que los espejos dicróicos no tienen un 100 % de eficiencia, una parte de la luz se fuga, por lo que es más cómodo y seguro trabajar con menor potencia, pues una parte de la luz láser sale por el ocular del microscopio.

El único parámetro que no permaneció constante fue la velocidad de los flujos, pues de ellos depende la frecuencia y forma de las microgotas. Se realizaron pruebas con flujos $100 (\mu\text{L}/\text{h})$ de la solución de fluoresceína (fase acuosa) y $100 (\mu\text{L}/\text{h})$ de aceite mineral (fase orgánica), figura 4.12.A, $100 (\mu\text{L}/\text{h})$ fluoresceína y $300 (\mu\text{L}/\text{h})$ de aceite mineral, figura 4.12.C, $300 (\mu\text{L}/\text{h})$ de fluoresceína y $100 (\mu\text{L}/\text{h})$ aceite mineral, figura

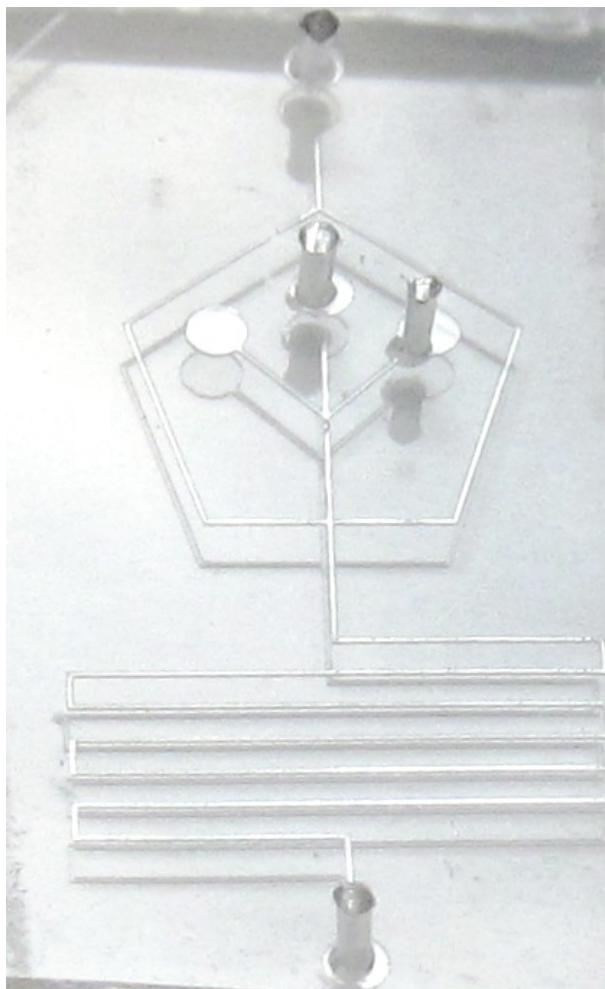


Figura 4.11: *Chip microfluídico empleado para formar microgotas. El ancho y la profundidad del microcanal es de 100 μm . En la parte superior se encuentra la entrada de aceite, en medio las entradas de los compuestos a ensayar, en este caso se uso una solución de fluoresceína. Después del serpentín se encuentra la salida.*

4.13.A. Por último se realizó un ensayo llevando al límite de frecuencia que el chip microfluídico sostenía antes de que se presentaran fugas o no se formaran gotas. Así los flujos antes de que el dispositivo fallara fueron de 3000 ($\mu\text{L}/\text{h}$) fluoresceína y 3000 ($\mu\text{L}/\text{h}$) de aceite mineral(ver figura 4.13.C).

4.3.1. Discusión de los resultados

Los resultados obtenidos en los ensayos con microgotas no fueron menos interesantes que los obtenidos en flujo constante. En el primero de los ensayos las condiciones fueron las siguientes : fluoresceína $10 \mu\text{M}$, láser 8 mW y flujos iguales de fluoresceína y aceite de $100(\mu\text{L}/\text{h})$. La señal medida tuvo un comportamiento muy simétrico; es decir que 50% del tiempo se detectó fluorescencia y el resto del tiempo la lectura fue prácticamente cero. Algo que llamó la atención es que el valor de la intensidad de fluorescencia medido fue ligeramente superior al que se encontró para condiciones similares en flujo constante. En la gráfica 4.12.A observamos una lectura de 0.12 (V) y para condiciones similares de concentración y potencia del láser y un flujo total de aceite más fluoresceína de $200 (\mu\text{L}/\text{h})$ se obtuvo un valor de 0.11 (V) como se muestra en la figura 4.6.

Se hizo un programa en Matlab (apéndice A), que permite obtener el promedio de la intensidad de cada una de las microgotas y también gráfica el valor obtenido. Este programa resulta útil para observar qué tanto varía la intensidad de una microgota con respecto a las demás. En la gráfica presentada en 4.12.B se observa el valor promedio de cada una de las microgotas que es aproximadamente 0.11 V y no los 0.12 que se observan en la figura 4.12.A esto debido a que el programa toma el promedio a partir de que la señal rebasa la media, en consecuencia el valor promedio es ligeramente menor. En dichos valores promedio se observa una variación entre estos ellos menor a 2 mV un valor que cae dentro del ruido de la lectura. Lo que demuestra que las gotas son muy homogéneas.

En las gráficas 4.12.C y 4.13.A se observan ensayos con flujos desiguales de fluoresceína y aceite, para el primero la fase acuosa tiene un valor de $100 (\mu\text{L}/\text{h})$ y la fase orgánica de $300 (\mu\text{L}/\text{h})$, para el segundo la fase acuosa tiene un flujo de $300 (\mu\text{L}/\text{h})$ y la fase orgánica de $100 (\mu\text{L}/\text{h})$. En el primero de estos ensayos se observa que la frecuencia de gotas es de 28 (Hz) , mayor que en el ensayo presentado en 4.12.A en el cual se observa una frecuencia de 16 (Hz) , y el tiempo durante el cual se detecta fluorescencia es menor que el tiempo en el que no, es decir el ciclo no es $50\text{-}50\%$ como ocurre en 4.12.A. En

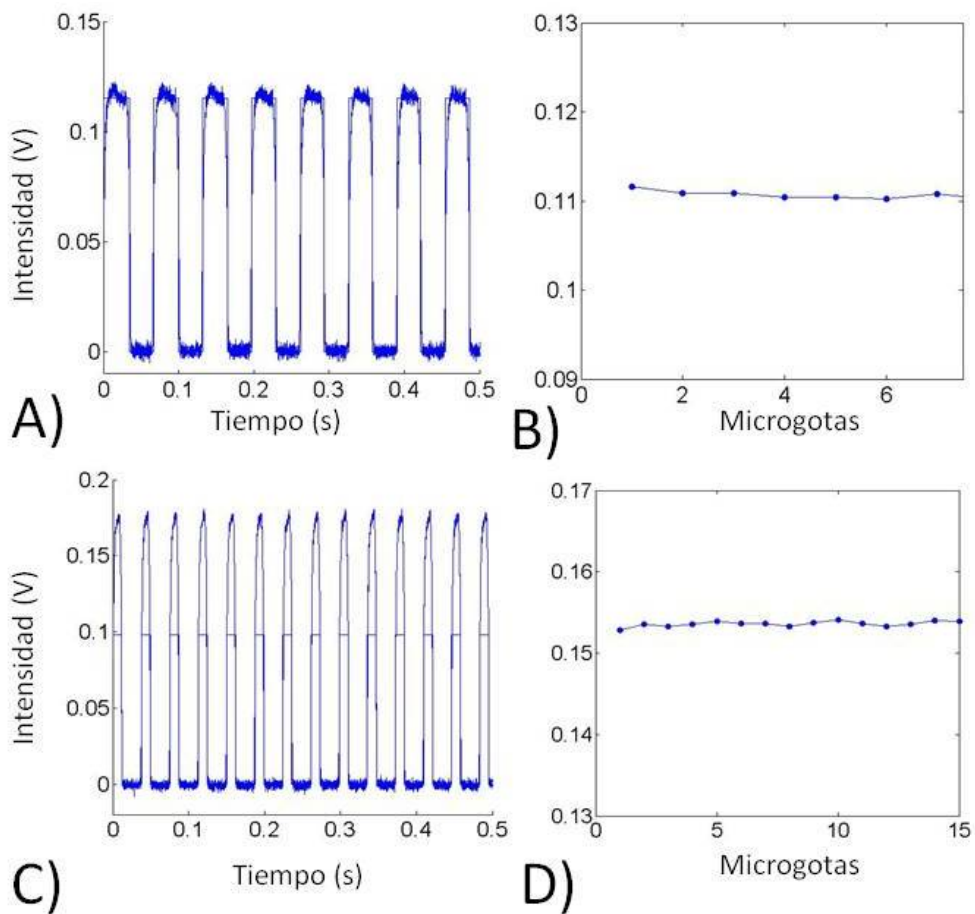


Figura 4.12: *Ensayos fluorescentes con microgotas. A) Gráfica de intensidad de fluorescencia contra tiempo, condiciones: fluoresceína 100 ($\mu\text{L/h}$), aceite mineral 100 ($\mu\text{L/h}$), láser 8 mW, fluoresceína 10 μM . B) Gráfica del valor promedio de la intensidad para cada una de las microgotas contra microgotas. C) Intensidad de fluorescencia contra tiempo, condiciones: fluoresceína 100 ($\mu\text{L/h}$), aceite mineral 300 ($\mu\text{L/h}$), láser 8 mW, fluoresceína 10 μM . D) Gráfica del valor promedio de la intensidad para cada una de las microgotas contra microgotas.*

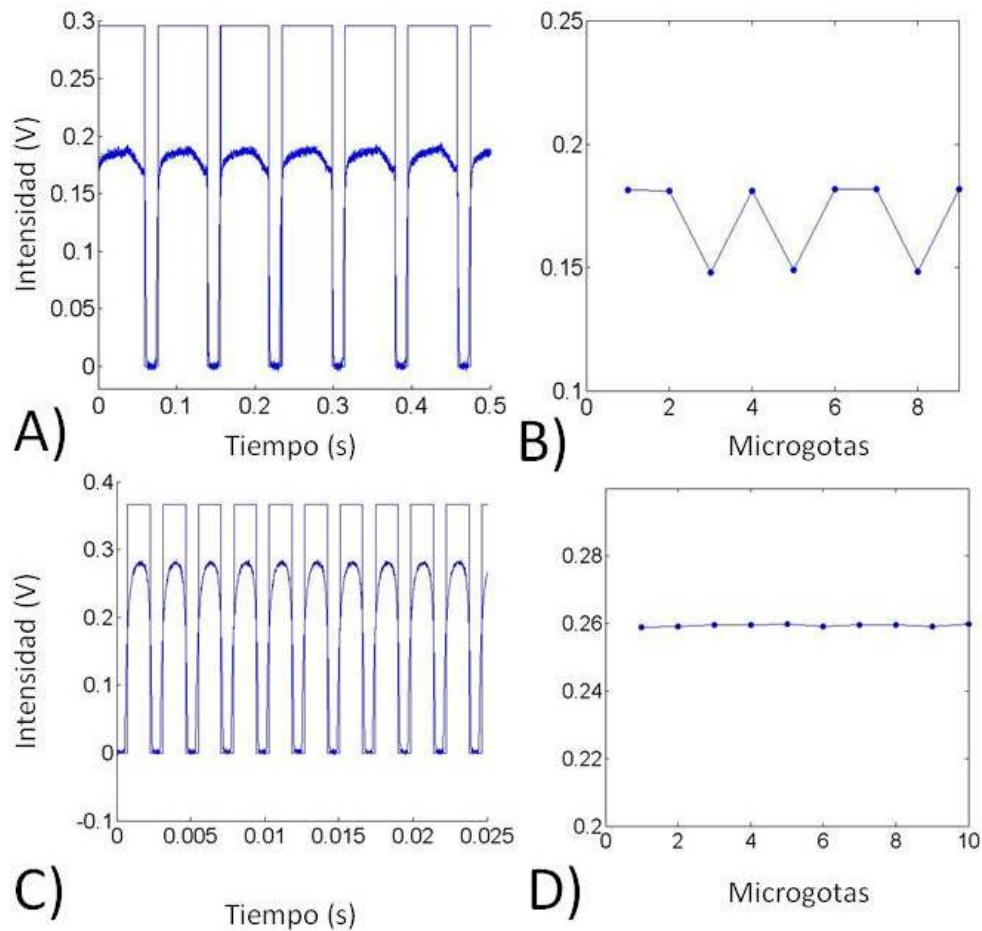


Figura 4.13: *Ensayos fluorescentes con microgotas.* A) *Gráfica de intensidad de fluorescencia contra tiempo, condiciones: fluoresceína 300 ($\mu\text{L/h}$), aceite mineral 100 ($\mu\text{L/h}$), láser 8 mW, fluoresceína 10 μM .* B) *Gráfica del valor promedio de la intensidad para cada una de las microgotas contra microgotas.* C) *Intensidad de fluorescencia contra tiempo, condiciones: fluoresceína 3000 ($\mu\text{L/h}$), aceite mineral 3000 ($\mu\text{L/h}$), láser 8 mW, fluoresceína 10 μM .* D) *Gráfica del valor promedio de la intensidad para cada una de las microgotas contra microgotas.*

el segundo caso las gotas se convierten en paquetes y se registra fluorescencia la mayor parte del tiempo. Para este caso la frecuencia de gotas fue de 14(Hz). En esta señal el programa que calcula el promedio de la intensidad de cada una de las microgotas falló, pues contó gotas de más y algunos de los promedios se alejaron cerca de 30 mv. Lo anterior probablemente se debe a que el programa distingue entre gota y gota cuando se rebasa el valor promedio de la señal, en este caso la señal permanece la mayor parte del tiempo cerca del máximo de la lectura de fluorescencia, en dicha región ocurren las mayores variaciones en la intensidad de la señal lo que propicia disparos en falso.

Finalmente en la gráfica 4.13.C se observa un ensayo con flujos de fluoresceína y aceite de 3000 ($\mu\text{L}/\text{h}$), que fue el máximo conseguido antes de que fallara el dispositivo. La frecuencia de gotas que se alcanzó fue de 420 Hz. Sorprende un poco que las lecturas de las gotas tengan una forma curva más simétrica que las obtenidas a menores flujos. El valor de la señal aumentó considerablemente rebasando los 0.25 (V), que es más de 100 mV mas grande que la señal obtenida con flujos totales de 400 ($\mu\text{L}/\text{h}$). Esta observación es consistente con las tendencias observadas en los flujos continuos, a mayor velocidad de flujo menor foto blanqueo. No se realizaron ensayos con velocidades de flujo similares en flujos continuos pero cabria esperar un comportamiento similar.

Capítulo 5

Conclusiones y trabajo a futuro

Conclusiones

Se cumplió el objetivo de implementar un sistema de fluorescencia láser continuo que permitiera estimular y cuantificar la fluorescencia dentro de microgotas. Para lograrlo se cumplieron los objetivos particulares. El primero de ellos consistió en fabricar y caracterizar chips microfluidicos donde circularon las muestras fluorescentes. Para fabricar los moldes empleados para fabricar los chips microfluidicos mencionados se utilizaron dos técnicas: la primera de ellas fue impresión en láminas de poliestireno termoplástico (PST), conocidas comercialmente como "Shrinky Dinnks". La segunda técnica fue la fotolitografía. La primera demostró ser muy versátil y accesible pues no requirió de ninguna instalación especial ni materiales costosos. Esto la hace muy útil para probar diseños nuevos o para enseñar el proceso de fabricación de micro estructuras por medio de litografía suave. Los chips microfluídicos se fabricaron de PDMS, usando una de las técnicas conocidas como litografía suave, que para nuestro caso fue la conocida como molde-réplica. Tanto los moldes como las réplicas se caracterizaron dimensionalmente usando el interferómetro de luz blanca del Centro UNAMems. Dicha caracterización mostró que los moldes Shrinky Dinnks tienen una sección transversal semicircular con dimensiones que rondaron los 250 μm de ancho y 50 μm de alto. Esto podría facilitar la

formación y circulación de la microgotas: sin embargo, la rugosidad y las irregularidades de dichos canales formaron gotas aplanadas de difícil formación y poco estables que se rompían fácilmente. A lo anterior se suma, que esta técnica no logra una alta repetibilidad en los resultados pues se tiene poco control en el proceso de impresión y reducción. Por otro lado, la fabricación de moldes por medio de fotolitografía formó réplicas con canales cuadrados menos rugosos y mas homogéneos. Se lograron canales de $100\ \mu\text{m}$ de ancho y alto. En los dispositivos fabricados con estos moldes se observó una formación de microgotas mas fácil y homogénea que la obtenida con los dispositivos fabricados con moldes de Shrinky Dinnks. Además, estos moldes permitieron dispositivos con alta repetibilidad, se caracterizó un micro canal de 1 cm de largo y $100\ \mu\text{m}$ de ancho y alto en tres puntos, donde se encontró que el ancho varió menos de $1\ \mu\text{m}$, lo cual representa menos del 1 %. Por otra parte la altura varió al redor de $10\ \mu\text{m}$, es decir aproximadamente 10 %.

El segundo objetivo fue formar un arreglo que permitiera la conducción de un haz de luz a través de la óptica de un microscopio para estimular y cuantificar fluorescencia. Para lograrlo se emplearon un conjunto de elementos ópticos que incluían espejos, espejos dicroicos, filtros, lentes convergentes y la óptica del microscopio. Se observó que tanto los dispositivos optoelectrónicos para estimulación y sensado y la óptica empleada juega un papel importante para obtener una buena señal. Se observó que la apertura numérica del objetivo cambiaba la cantidad de luz captada por el microscopio. El objetivo de mayor apertura numérica con el que se contó fue 0.30 y con el se obtuvieron señales con mayor amplitud que las obtenidas con el resto de los oculares. También se observó que al incrementar la potencia del láser la señal captada aumentaba en forma proporcional en el intervalo observado de 4 a 10 mW.

El tercer objetivo cumplido consistió en sensar y cuantificar la fluorescencia emitida por microgotas. Para ello se instaló un fotodiodo de avalancha, el cual captó la luz emitida por la muestra fluorescente. El transductor la convirtió en una señal de voltaje que se envió a la tarjeta de adquisición. Para procesar y almacenar las lecturas de la tarjeta de adquisición se emplearon dos programas: LabView para los ensayos en flujos

constantes y Matlab para los ensayos hechos con microgotas.

Los ensayos fluorescentes realizados con flujos constantes permitieron conocer el comportamiento del sistema cuando se modifican las condiciones del experimento: potencia del láser, velocidad de flujo y concentración de fluoresceína. Los cambios en la concentración, que fueron de 1 a 50 μM , provocaron variaciones en la amplitud de más de un orden de magnitud; para los parámetros más bajos probados, la concentración de fluoresceína de 1 (μM), la potencia láser de 4 (mW) y la velocidad de flujo de 50 ($\mu\text{L/h}$), la lectura fue de 10 (mV) mientras que para los parámetros de fluoresceína 50 (μM), potencia láser 4 (mW) y velocidad de flujo de 50 ($\mu\text{L/h}$) la lectura fue de 136 (mV).

El aumento en la fluorescencia que provocó el cambio en la potencia del láser fue siempre proporcional y permaneció dentro de un orden de magnitud, para los valores probados, comprendidos en el intervalo de 4 a 10 (mW). Por ejemplo, para la fluoresceína de 50 (μM), para una velocidad de flujo de 100 ($\mu\text{L/h}$) y una potencia de láser de 4 (mW) la señal fue de 285 (mV) mientras que para condiciones similares y potencia del láser de 10 (mW) la señal fue de 414 (mV).

La velocidad del flujo de fluoresceína influyó en la intensidad de la fluorescencia también en forma proporcional, a mayor velocidad de flujo mayor intensidad de fluorescencia y se presentó en todo el intervalo probado. Este comportamiento coincide con el fenómeno de foto blanqueo descrito en los antecedentes, que predice que una velocidad de flujo mayor evitará que la muestra reciba una dosis de radiación demasiado alta y blanquee la muestra disminuyendo la fluorescencia emitida.

Trabajo a futuro

El sistema de láser de estimulación y cuantificación de fluorescencia presentado en esta tesis ofrece varias posibilidades para trabajar a futuro. Se pueden hacer modificaciones para mejorar su desempeño, para aumentar su versatilidad e incluso para convertirlo en una herramienta en el estudio de la dinámica de fluidos a micro escala.

Para mejorar su desempeño es importante conseguir un objetivo para el microscopio con una mayor apertura numérica (NA), ya que, como se mencionó en los capítulos 3 y 4, ésta limita la cantidad de luz capturada y en consecuencia la concentración de fluoresceína. El objetivo sugerido es de 40X, con una apertura numérica de 0.6, que se encuentra dentro del catálogo del fabricante del microscopio (Leica). El aumento de este objetivo es compatible con el tamaño de los microcanales empleados y además este ocular no requiere aceite o agua como medio de inmersión, lo que lo hace más práctico que aquellos objetivos de mayor aumento y NA pero que requieren un medio de inmersión. El nuevo objetivo del microscopio probablemente requiera un filtro paso banda y una lente concentradora de mayor diámetro pues los elementos con los que se cuenta actualmente están en el límite para capturar el cono de luz que sale del microscopio.

Para ganar sensibilidad se puede optar por acoplar un amplificador entre el detector, en este caso un fotodiodo de avalancha, y la tarjeta de adquisición. El tipo de amplificador más recomendable sería un Lock-in, ya que este tipo de circuitos tienen la particularidad de amplificar en una sola frecuencia, discriminando el resto. De esta forma puede recuperarse señales inmersas en ruido. Para poder sacar ventaja de esta particularidad es necesario pulsar el láser en una frecuencia similar a la que se sintonice en el amplificador. Para pulsar el láser se podría usar un modulador optoacústico o un disco y un motor controlado por pasos.

Otra modificación enfocada a mejorar la sensibilidad del arreglo experimental a flujos bajos, son las bombas utilizadas para hacer circular la fluoresceína y el aceite, a los chips. El controlador de los motores de las bombas actuales no tiene una buena respuesta para flujos bajos como se mencionó en el capítulo 4.

Una posibilidad que le podría dar mayor versatilidad al arreglo experimental, sería usar un objetivo del microscopio de gran aumento, haciendo que la microgota abarque todo el campo de visión del objetivo. Así se podría usar una fuente de amplio espectro filtrada, la cual no es colimada, para estimular una sola de las microgotas. Esto permitiría usar fluoróforos distintos seleccionando el filtro con el espectro de transmisión

adecuado.

Una modificación que podría permitir medir la velocidad de las microgotas o de un fluido que circule en el microcanal usando una partícula traza fluorescente, consistiría en implementar un divisor para separar el haz de luz láser en dos. Con ayuda de dos espejos hacer estos haces de luz paralelos separados por unos micrómetros de distancia e introducirlos por el mismo camino óptico. Con los dos haces de luz láser incidiendo en el microcanal, se podría medir la velocidad calculando el tiempo entre las lecturas.

Capítulo 6

Apéndices

6.1. Apéndice A: Programa de Matlab

Programa empleado para adquirir la señal del fotodiodo a través de la tarjeta de adquisición y MatLab. Después la señal es procesada para obtener el valor promedio de la intensidad de fluorescencia de cada una de las microgotas.

```

%Comandos empleados para hacer la adquisicion de datos utilizando MatLab
%29/10/212, Benjamin Vazquez Sanchez, 374251@gmail.com
s = daq.createSession('ni')
%Crea una sesion de adquisicion de datos utilizando una tarjeta de
%adquisicion de datos de National Instruments con los valores iniciales
%de tiempo de adquisicion 1 segundo, 1000 escaneos a 1000escaneos/segundo

s.addAnalogInputChannel('Dev1',0,'Voltage')
%Define una entrada analogica de voltaje por el puerto "Dev1", offset 0.
s.Channels(1).InputType='SingleEnded';
%Cambia el modo del canal de diferencial a entrada de frontera simple con
%tierra
s.DurationInSeconds = 10;
%Modifica el tiempo de adquisicion
s.rateInHz=10000;
%Selecciona la velocidad de muestreo
data = s.startForeground();
%Inicia la adquisicion de datos con los parametros seleccionados
%-----
%Programa para detectar microgotas en la señal y obtener el valor promedio
%de cada una de ellas.

clc
%Limpia la pantalla
x=data(:,1);
%Obtiene el vector del eje X de una señal compuesta por tiempo e intensidad
y=data(:,2);
%Obtiene el vector de intensidad o eje Y de una señal
tam=size(x);
%Obtiene el tamaño del vector x, que se usara para controlar los ciclos y
%se asigna a la variable tam
t=tam(1,1);
%Asigna el valor de de la primera celda de la matriz tam a la variable t
n=[1:1:tam];
%Crea un vector con numeros consecutivos de 1 en 1 con el tamaño del vector
%tam
prom=mean(y);
%Obtiene el valor promedio de la intensidad, desde los valores de y
c=0;
%Inicia un contador con el valor de 0
cc=0;
%Inicia un segundo contador en 0
for i=1:t
    if (y(i)>prom)
        m(i)=2*prom;
    else
        m(i)=0;
    end
end

%Este ciclo for compara el valor de la señal desde 0 hasta t con el valor

```

```

%promedio de la señal, si es mayor el vector m toma el valor del doble del
%promedio de la señal, si es menor toma el valor de 0, sera una señal
%cuadrada que ayudara a visualizar en que momento el programa esta tomando
%el promedio de la microgota

for i=1:(t-1)
    if(m(i)==0) && (m(i+1)==(2*prom))
        c=c+1;
    end
end
%En este ciclo se cuenta las veces que el programa hizo el promedio de la
%señal, cuando no hay error coincide con el numero de gotas y lo presenta
%la variable c

for i=1:(t-1)
    if(m(i)==(2*prom)) && (m(i+1)==0)
        cc=cc+1;
    end
end
%Este ciclo verifica cuantas veces incia el ciclo de promedio y termina,es
%decir que la señal baja a 0 de nuevo.

av=0;
%Inicia una variable en 0
cont=0;
%Inicia un contador en 0
contpicos=1;
%Inicia un contador en 1
cont2=0;
%Inicia un segundo contador en 0
i=1;
%Inicia una variable en 1
clear prompicos;
%Limpia el vector promedio picos
while i<(t-3)
    if (m(i)~=0)
        av=av+y(i);
        cont=cont+1;
    end

    if (m(i)==(2*prom)) && (m(i+1)==0)
        av=av/cont;
        prompicos(contpicos)=av;
        contpicos=contpicos+1;
        av=0;
        cont=0;
    end

    i=i+1;
end
%Este ciclo while hace un recorrido por todos los puntos hasta tres antes

```

```

%del ultimo, cuando m, que es el vector que indica cuando inicia el
%promedio es diferente de 0, se suma el valor de la señal y se cuenta en
%cont el numero de puntos sumados.
%En el segundo if se de acuerdo a las condiciones de existencia de la gota
%y termino de esta se calcula el promedio usando el valor de la suma de la
%señal contenido en Av y se divide entre el numero de puntos de cont. Hecho
%esto se asigna el el valor de Av un valor del vecor prompicos que
%contendra el valor de los primedios de las gotas, asi mismo se incrementa
%en 1 el contador contpicos que es el que registra el numero de promedios.
tamano=size(prompicos);
%Crea el vector tamano de la dimension del numero de promedios obtenidos
num=1:1:tamano(1,2);
%Crea el vector num, del tamaño de tamano, que es el numero de promedios,
%el vector num servira de eje x para graficar el valor de los promedios

figure (2)
plot(num,prompicos)
%Crea la figura 2, en el eje x el vector num que tiene la cantidad de
%promedios o microgotas completas y prompicos con el valor del promedio de
%cada una de las microgotas
prompicos
%presenta en la linea de comandos el valor de cada uno de los promedios
c
%presenta en la linea de comandos la cantidad de gotas detectadas

figure (1)
hold on
plot(x,m(1:t));
plot(x,y);
%Crea una grafica con la señal original y la señal cuadrada superpuesta que
%indica en que momento se obtuvo el promedio de la señal.

```

Figura 6.3: *Página 3/3 del código de MatLab empleado.*

6.2. Apéndice B: Artículo enviado a la conferencia latinoamericana de óptica y fotónica, LAOP 2012.

Artículo enviado a la conferencia latinoamericana de óptica y fotónica 2012, organizada por la sociedad de óptica americana OSA.

Characterization of a Laser Induced Fluorescence Detection System for Microdroplets Fluorescence Quantification

Benjamín Vazquez^{1*}, Luis Olguin², Laura Oropeza¹

¹ Departamento de Electrónica, Centro UNAMems, Edificio DIE-DIMEI, 3er. Piso, Facultad de Ingeniería, UNAM, México D.F., 04510, *374251@gmail.com

² Laboratorio 102, Edificio B, Facultad de Química, UNAM, México D.F., 04510

Abstract: On this work a laser induced fluorescence system for microdroplets fluorescence quantification is described in detail, and it is characterized considering flow rate, laser power and fluorophore concentration. At the end, results of a microdroplet assay are presented.

1. Introduction

On recent years the technology known as Lab On a Chip have reached an important success on micro instrumentation for chemical and biochemical research [1,2]. This technology uses microfluidic devices to transport and manipulate small quantities of fluids and biological specimens through micro channels where reactions, separations and combinations take place [1]. Among the vast possibilities that this technology offers, there exist the option to generate micro droplets between a two phased fluid inside micro channels, and used those droplets as micro reactors that allow individual and isolated reactions inside each of them [2]. These can be fused, sorted, cooled and heated, providing an adequate environment to perform both chemical and biological essays [2].

Nowadays, in the microfluidic technology world, two main detection methods have been implemented: electrical and optical [3]. Typically, electrical detection methods are based on impedance measurement and optical methods are often based on fluorescence. Both of them have the advantage of being non-invasive techniques; however, optical methods usually present higher sensitivity, selectivity and resolution [3,4]. The optical method based on laser-induced fluorescence (LIF) has been well established on capillary electrophoresis [5]. A very important advantage of LIF is the ability to decrease the sample size down to single molecule [4], which in combination with the use of micro droplets, result in a high throughput screening for enzymatic assays, protein expressions, protein crystallization, just to mention a few applications [5].

Various LIF systems have been developed [3-5] and their characterization is mainly focused on the improvement of the detection limits [5,6], where fluorescein concentrations of pM orders have been reported [6]. However, there are other factors that affect analytical sensitivity such as laser power, sample size and volume, photo bleaching and flow velocity [7]. For instance, in focal LIF systems the relative laser power becomes very high when the focused laser beam is very fine. This increment of energy occurs because the area where the energy is applied is reduced from millimeters, of a common laser beam, to about tens of micrometers, generating a high energy concentration that is reflected on relative power of several orders of magnitude higher than the original source [8]. This high power makes photo bleaching phenomena an important factor on the intensity of fluorescence emitted. For this reason, the fluorescence intensity not only depends on fluorophore concentration, but also on laser power and flow velocity [7].

In this work we present a LIF system implementation for micro drops and its characterization based on the relevant system parameters discussed above: fluorophore concentration, flow velocity and laser power.

2. Experimental methods

2.1 Fabrication of microfluidic chip

The microfluidic chips were fabricated using standard PDMS soft lithography technique based on mold/replica. Molds were made using photolithography of SU-8 over a silicon wafer. The microchannels were characterized using a white light optical interferometer (Polytec MSA-400) and the dimensions were 102 μm high and 98 μm wide, as can be observed in figure 1.b.

2.2 Micro-drop formation principle and reagents employed

The microdroplets are generated by intersecting flows of mineral oil and a fluorescein solution inside the micro channel circuit, forming an emulsion. This was stabilized adding span 80 to mineral oil (2 %). Fluorescein concentrations were: 1×10^{-6} (M; pH 7) for continues flow experiments and 1×10^{-5} (M; pH 7) for micro droplets essays.

Figura 6.4: *Página 1/3 del artículo enviado a la conferencia latinoamericana de óptica y fotónica*

2.3 Apparatus and equipment

A schematic diagram of the LIF detection system characterized is shown in figure 1.a). An optically pumped semiconductor laser 488 (sapphire 488, Coherent) was used as light source to stimulate the fluorescence. The optical trajectory is described as follow: the laser beam was reflected on a 488 nm dichroic mirror (Di01-R488 Semrock) through a fluorescence port of an inverted fluorescence microscope (DM IL LED, Leica) an reflected on a second dichroic mirror (FF660-Di02, Semrock) placed on the microscope filter holder. The laser line was focused by the objective (20x, NA=0.30, Leica) and pointed to the micro channel. The fluorescence light emitted by the sample (the micro-droplet) was collected by the objective, later reflected by the dichroic mirror (FF660-Di02) and passed through the first dichroic mirror (Di01-R488) and through a band pass filter 500-550 nm (FF02-525/50-25, Semrock). Finally the light was concentrated by a plano-convex lens (LA1951, Thorlabs) before being detected by an avalanche photodiode (APD-100, Hinds Instruments). The signal from the APD was recorded by a data acquisition card (USB-6351, National Instruments) and processed using both LabVIEW signal express and Matlab.

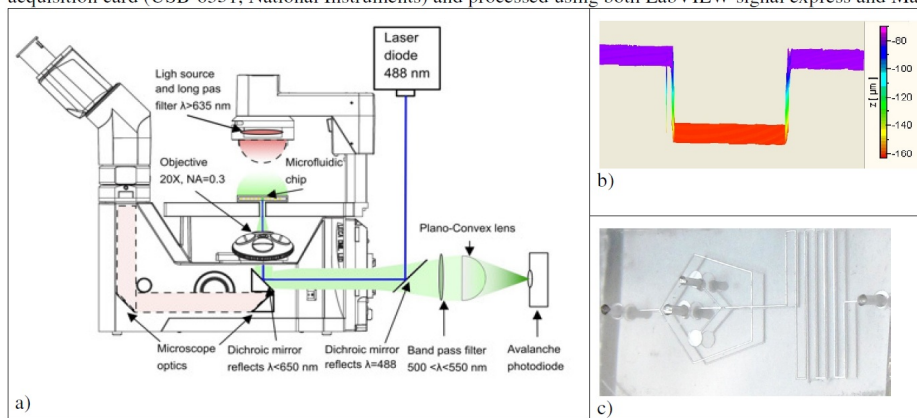


Figure 1. a) A LIF system implemented over an inverted fluorescence microscope; b) Profile of a micro-channel characterized using Polytec MSA-400 non invasive topography system; c) Microfluidic PDMS chip employed for microdroplet fluorescence essays.

2.4 System characterization methodology

Continuous flow experiments were carried out on a microfluidic chip with a single straight micro channel on it. The syringe pump was loaded with the fluorescein solution previously described and a constant flow rate was set. Then, the laser was focused on the micro channel and a fixed power was selected. We started the characterization with a continuous flow of 50×10^{-6} L/h and laser power of 4 mW, once the flow and laser power were stable the fluorescence was quantified. Then we set the laser power on 6 mW, after its stabilization a second lecture was obtained and so on up to 10 mW. The same procedure was applied to different flow rates and an additional test was made fixing the laser power on 4 mW and using three additional concentrations (5×10^{-6} , 10×10^{-6} and 50×10^{-6} M; pH 7). Finally, a microdroplet fluorescence essay was performed using a microfluidic chip shown in figure 1.c, using a fluorescein solution (10×10^{-6} M; pH7) and a flow rate of 100×10^{-6} L/h of both fluorescein solution and mineral oil.

3. Results and discussion

The results in figure 2 shown the sensitivity of the LIF system implemented to relative small changes in the flow rates and laser power. A previous report [7] detected a comparable behavior for flow rates from 0.02×10^{-6} L/m to 1×10^{-6} L/m. In this study we confirm this tendency and proved flows from 50×10^{-6} L/h to 200×10^{-6} L/h. These higher rates are employed to form microdroplets with higher frequency rate and same tendency was observed in all the range studied.

Figura 6.5: Página 2/3 del artículo enviado a la conferencia latinoamericana de óptica y fotónica

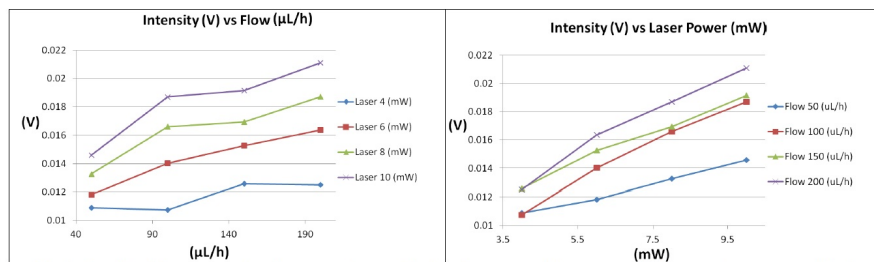


Figure 2. Left: Graphic of fluorescence intensity versus flow rate for four flow rates and laser powers. Right: complementary graphic of fluorescence intensity versus laser power for the same four flow rates and laser powers.

Note that the laser power also has a high impact on fluorescence intensity for a flow rate of 200×10^{-6} L/h and at laser power of 10 mW the signal was about 60% higher than the signal observed at the same flow rate and 4 mW.

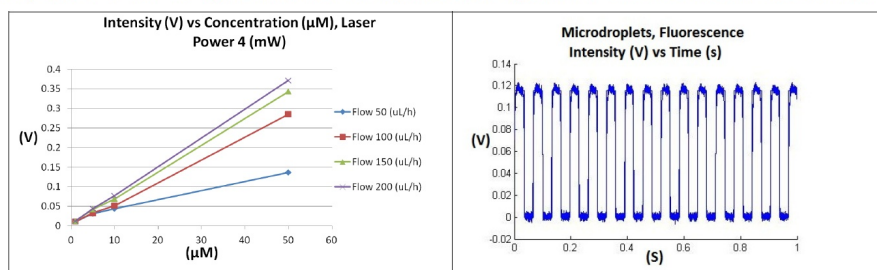


Figure 3. Left: Plot of fluorescence intensity versus fluorescein concentration at four flow rates and 4 mW laser power. Right: Microdroplets assay signal detected, fluorescence intensity versus time at a fluorescein concentration of 10×10^{-6} M/L, flow rates of both fluorescein dilution and mineral oil of 100×10^{-6} L/h, and laser power of 4 mW.

Figure 3 (left) shows the fluorescence intensity versus fluorescein concentration plot. Note that for four different concentrations the signal intensity increases with the flow rate. The explanation behind this is that higher flow rates correspond to less photo-bleaching effects, due to the fact that the same portion of fluorescein is pointed by the laser during a smaller amount of time, obtaining higher amplitude of the read signals. The linear trend is consistent. Finally, figure 3 (right) shows the signal acquired when a micro droplets assay is performed with flow rates of 100×10^{-6} L/h for both oil and fluorescein, achieving 16 Hz microdroplets formation.

4. Conclusions

On this work a LIF system was implemented and the effects on fluorescence of varying fluorophore concentration, flow velocity and laser power were determined. The expected tendencies on photobleaching phenomena and laser power effects were confirmed. Further work is required to find the cross relation between laser power and flow rates.

5. Acknowledgements

This project has been supported by the grant by PIFT09-288 ICYTDF and partially supported by PINV11-17 ICYTDF.

6. References

- [1] Julia Khandurina and Andrés Guttman, "Bioanalysis in microfluidic devices", *Journal of Chromatography A*, 943, 2002, pp. 159-183.
- [2] Ansgar Huebner, Luis F. Olguin et. al. "Development of Quantitative Cell-Based Enzyme Assays in Microdroplets", *Anal Chem*, 2008, 80, pp.3890-3896.
- [3] Seyeong Joo et. al., "A portable microfluidic flow cytometer based on simultaneous detection of impedance and fluorescence", *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 25, 2010, pp. 1509-1515.
- [4] Mikaela Nichkova, Jun Feng, et. al., "Competitive Quenching Fluorescence Immunoassay for Chlorophenols Based on Laser-Induced Fluorescence Detection in Microdroplets", *Analytical Chemistry*, 75, 2003, pp. 83-90.
- [5] Baojian Xu, Mo Yang, et. al., "Line laser beam based laser-induced fluorescence detection system for microfluidic chip electrophoresis analysis", *Sensors and Actuators A*, 152, 2009, pp.168-175.
- [6] Jing-Lin Fu, Qun Fang, et. al., "Laser-Induced Fluorescence Detection System for Microfluidic Chips Based on an Orthogonal Optical Arrangement", *Analytical Chemistry*, 78, 2006, pp.3827-3834.
- [7] G.R. Wang, "Laser induced fluorescence photobleaching anemometer for microfluidic devices", *Lab On a Chip*, 5, 2005, pp. 450-456.

Figura 6.6: *Página 3/3 del artículo enviado a la conferencia latinoamericana de óptica y fotónica*

6.3. Apéndice C: Cartel presentado en el congreso de postgrado UNAM

Cartel presentado en el congreso de alumnos de posgrado de la UNAM.

Implementación de un sistema láser para detección continua de fluorescencia emitida por microgotas

Benjamín Vázquez Sánchez¹, Laura Oropeza Ramos¹, Luis F. Olguín Contreras²

¹Centro UNAMems, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México

²Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

Objetivo

El objetivo de este trabajo es implementar un sistema láser que permita estimular y cuantificar la fluorescencia generada por el producto de reacciones químicas dentro de microgotas, las cuales se generan dentro de un circuito microfluidico y viajan a través de él. Esto permitirá tener un método eficaz, económico y rápido para el análisis de colecciones de compuestos que son potencialmente útiles en el desarrollo de fármacos [1] [2].

Introducción

Dicho trabajo es parte de la colaboración en el proyecto del Dr. Luis Olguín de la Facultad de Química de la UNAM, en el cual se pretende encontrar compuestos potencialmente inhibidores de la enzima neuraminidasa la cual es fundamental en la replicación del virus de la influenza [3] [2].

En la actualidad estos ensayos se realizan en forma automatizada por medio de robots que colocan menestras de los tres reactivos en micro pozos[4][5]. Desventajas:

- Alto costo robots
 - Emplea micro-litros reactivos
 - Frecuencia de ensayos = 2 Hz
 - Mayor espacio físico
- El sistema propuesto resuelve varios de los inconvenientes, ya que ofrece:
- Bajo costo
 - Emplea nano-litros de reactivos
 - Frecuencia ensayos = 10 kHz
 - Menor espacio físico

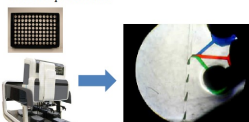


Figura 1. A. Sistemas actuales automatizados por medio de robots. B. Microgotas en chip microfluidico.

Fabricación de chips microfluidicos de polímero PDMS por medio de litografía suave

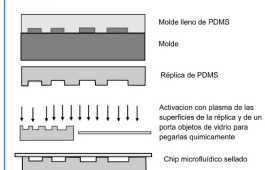


Figura 2. Fabricación de réplicas y sellado del chip microfluidico.

Fabricación del molde microestructurado por litografía óptica

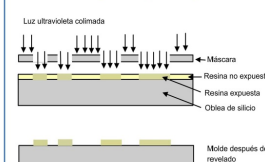


Figura 3. Fabricación del molde por medio de fotolitografía.

Arreglo óptico para detección de fluorescencia

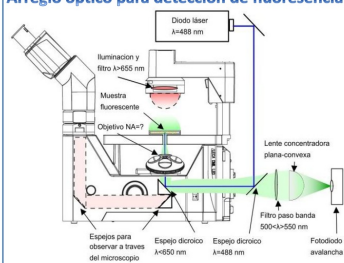


Figura 4. Fotografía del chip experimental. El arreglo mostrado permite la estimulación de fluorescencia en forma continua por medio de un láser y cuantificar la cantidad de fluorescencia por medio un fotodiodo de avalancha.

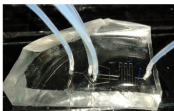


Figura 5. Fotografía del chip microfluidico construido y utilizado para formar microgotas.

Caracterización de réplicas y moldes

La caracterización de los moldes y réplicas se realizó utilizando el sistema Polytec MSA-400, el cual es un interferómetro óptico.

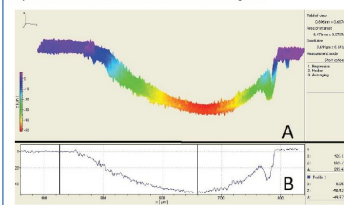


Figura 6. Representación 3D de un corte transversal de un microcanal usando el equipo de caracterización topográfica Polytec MSA-400.

Caracterización del sistema de detección de fluorescencia

Para caracterizar la sensibilidad se hicieron mediciones usando fluoresceína con diferentes condiciones de concentración, velocidad de flujo e intensidad del láser. A continuación se presentan las curvas de sensibilidad al variar dichas condiciones y la lectura obtenida al formar micro gotas de fluoresceína con una concentración de 5 micro molar inmersas en aceite mineral.

Incremento de la fluorescencia con el incremento en la velocidad de flujo

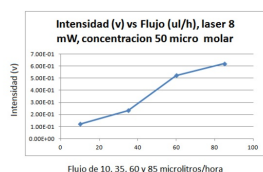


Figura 7. Gráfica que muestra el incremento en la intensidad de la fluorescencia conforme se incrementa la velocidad de flujo. Este efecto se asocia al "blaqueamiento" de las moléculas fluorescentes.

Incremento de la fluorescencia con el incremento en la potencia del láser

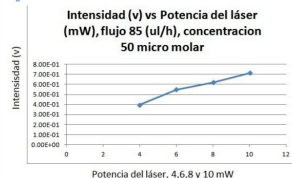


Figura 8. Gráfica que muestra el incremento en la intensidad de la fluorescencia conforme se incrementa la potencia del láser.

Incremento de la fluorescencia con el aumento en la concentración de fluoresceína

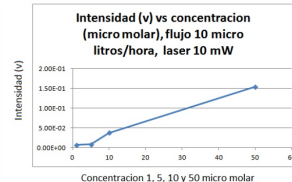


Figura 9. Gráfica que muestra la intensidad de la fluorescencia de acuerdo a la concentración de fluoresceína de la muestra.

Lectura de la fluorescencia obtenida al formar microgotas de fluoresceína con una concentración de 5 micro molar

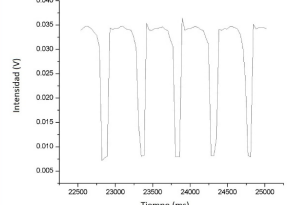


Figura 10. Gráfica que muestra la fluorescencia emitida por microgotas de fluoresceína en fase acuosa con una concentración de 5 micro molar que se forman y transportan en aceite mineral.

Conclusiones

Se construyeron y caracterizaron chips microfluidicos que permiten la formación de microgotas. Se implementó un sistema fluorescencia láser que permite detectar y cuantificar la fluorescencia emitida por microgotas. Se realizaron ensayos para obtener las curvas de sensibilidad del arreglo experimental y se cuantificó la fluorescencia emitida por microgotas con diferente concentración del fluoróforo.

Bibliografía

- [1] Newman, D.J. et al, Journal Natural Products vol.66, 2003.
- [2] P. Dittich, P. et. Al, ChemBioChem, Vol 6, 2005.
- [3] Wetherall, N. et al, Clin Microbiol, vol.2,2003 [4]Jeremy J. et al, PNAS, vol.107,2010, [5]Kintses B. et al, Current Opinion in Chemical Biology vol.14, 2010.

Agradecimientos:

Agradecemos el financiamiento por parte del ICYTDF con el proyecto PIFT09-288 del Dr. Luis Olguín, al centro UNAMems donde se realizó la caracterización de los chips y a la beca de maestría otorgada al primer autor por parte de la DGEPE-UNAM.

6.4. Apéndice D: Fotografías de los soportes y del sistema.

Fotografías del soporte del filtro de la luz de iluminación, del láser montado en soportes fabricados a medida y del sistema completo, donde se observan los soportes del microscopio.



Figura 6.8: Soporte diseñado y maquinado del filtro paso largas empleado en el sistema de iluminación del microscopio.

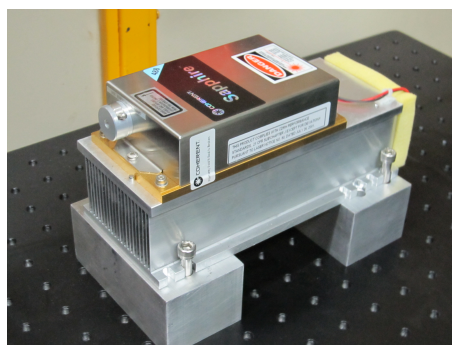


Figura 6.9: Láser fijado a la mesa mediante soportes fabricados a medida.

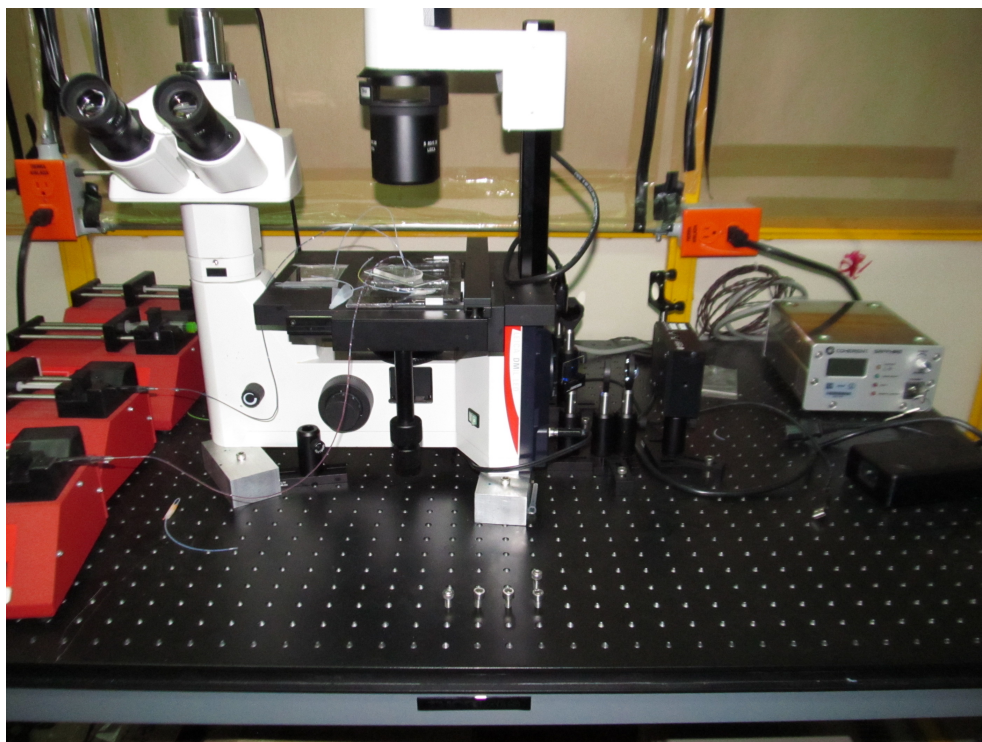


Figura 6.10: *Fotografía del sistema implementado.*

Bibliografía

- [1] Wetherall N., et. al., “Evaluation of neuraminidase enzyme assays using different substrates to measure susceptibility of influenza virus clinical Isolates to neuraminidase inhibitors: report of the neuraminidase Inhibitor susceptibility network”, *Journal Of Clinical Microbiology*, Vol. 41(2), pp.742-750, 2003.
- [2] Dittrich P., Jahnz M., and Schille P., “A New Embedded Process for Compartmentalized Cell-Free Protein Expression and On-Line Detection in ,Microfluidic devices”, *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, Vol. 6 (5), pp. 811- 844, 2005.
- [3] Newman D., Cragg G., Snader K., “Natural products as sources of new drugs overthe period 1981-2002”, *Journal Natural Products*, Vol.66, pp 1022-1037, 2003.
- [4] Squieres T., Quake S., “Microfluidics:Fluid physics at the nanoliter scale”, *Reviews of modern physics*, vol. 77, pp. 977-1026, 2005.
- [5] Feynman R., “There is plenty room at the bottom”, *Journal of Microelectromechanical Systems*, vol. 1 (1), pp. 60-66, 1992.
- [6] Feynman R., “Infinitesimal Machinery”, *Journal of Microelectromechanical Systems*, vol. 2 (1), pp. 4-14, 1993.
- [7] Maluf N. et. al., “An introduction to Microelectromechanical Systems Engineering”, Second Edition, Norwood, USA, Artech House, 2004.

- [8] Senturia S., “Microsystem Design”, Boston, USA, Kluwer Academic Publishers, 2002.
- [9] Terry, J. et. al., “A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer”, *IEEE Transactions Electron Devices*, Vol. 26, pp.188-1886, 1979.
- [10] Mohamed Gad-el-HAk et. al., “MEMS Introduction and Fundamentals”, Boca Raton, USA, Taylor and Francis, 2006.
- [11] Henrik Bruss, “Theoretical Microfluidics”, Oxford University Press, 2008.
- [12] Patrik Tabeling, “Introduction to Microfluidics”, UK, Oxford University Press, 2005.
- [13] Manz A., Graber N., Widmer H., “ Miniaturized Total Chemical-Analysis Systems- A Novel Concept For Chemical Sensing”, *Sensors And Actuators, B-Chemical*, Vol. 1, pp. 244-248, 1990.
- [14] Ashleigh B., et. al., “ Microdroplets in Microfluidics: An Evolving Platform for Discoveries in Chemistry and Biology”, *Angewandte Chemie (International edition)*, Vol. 49, pp. 5846-5868, 2010.
- [15] Joo S. et. al., “A portable microfluidic flow cytometer based on simultaneous detection of impedance and fluorescence”, *Biosensor and Bioelectronics*, Vol. 25 (6), pp. 1509-1515, 2010.
- [16] Fu J., et. al., “Laser-Induced Fluorescence Detection System for Microfluidic Chips Based on an Orthogonal Optical Arrangement”, *Analytical Chemistry*, Vol.78 (11), pp. 3827-3834, 2006.
- [17] D. Sinton., “Microscale flow visualization”, *Microfluidics and Nanofluidics*, Vol. 1 (1), pp. 2-21, 2004.

- [18] Uhlen M. and Svahn H., “ Lab on a chip technologies for bioenergy and biosustainability research”, *Lab on a chip*, Vol.11 (20) The Royal Society of Chemistry, vol. 11 (20), pp. 3389-3393, 2011.
- [19] Kintses B, et. al., “Microfluidic droplets: new integrated workflows for biological experiments”, *Current Opinion in Chemical Biology*, Vol.14 (5), pp.548-555, 2010.
- [20] Nichkova M. et. al., “Immunoassay for Chlorophenols Based on Laser-Induced Fluorescence Detection in Microdroplets”, *Analytical Chemistry*, Vol. 75 (1), pp. 131-138, 2003.
- [21] Tan A., Rodgers K., “Rapid fabrication of microfluidic devices in poly(dimethylsiloxane) by photocopying”, *Lab Chip*, Vol. 1, pp. 7-9, 2001,
- [22] Xu B., et. al., “Line laser beam based laser-induced fluorescence detection system for microfluidic chip electrophoresis analysis”, *Sensors and Actuators A: Physical*, Vol.152 (2), pp.83-90, 2009.
- [23] Wang G., “Laser induced fluorescence photobleaching anemometer for microfluidic devices”, *Lab on a Chip*, Vol. 5 (4), pp. 450-456, 2005.
- [24] Thorsen T., et. al., “Microfluidic Large-Scale Integration”, *Science (New York, N. Y.)*, Vol.298 (5593), pp. 580-584, 2002.
- [25] Wang C., et. al., “An integrated microfluidic system for diagnosis and multiple subtyping of influenza virus”, *IEEE 24th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems*, pp.841-844, 2011.
- [26] Gubareva L., et. al., “Catalytic and Framework Mutations in the Neuraminidase Active Site of Influenza Viruses That Are Resistant to 4-Guanidino-eu5Ac2en”, *Journal of Virology*, Vol. 71 (5), pp. 3385-3390, 1997.

- [27] Agresti J., et. al., “Ultra-high-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.107 (9), pp.4004-4009, 2010.
- [28] C. Tormos, et. al., “Droplet-based microfluidic platforms for the encapsulation and screening of Mammalian cells and multicellular organisms”, *Chemistry and Biology*, Vol.15, pp. 427-437, 2008.
- [29] B. Ziaie, et. al., “Hard and soft micromachining for BioMEMS: review of techniques and examples of applications in microfluidics and drug delivery”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 56, pp. 145- 172, 2004.
- [30] L. Oropeza, et. al., “Low cost micro-platform for culturing and Stimulation of cardiomyocyte tissue”, *IEEE 24th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems*, pp. 912-915, 2011.
- [31] J. Soto-Olmos, L. Oropeza-Ramos and J. Hernández-Cordero, “Low-cost and bio-compatible long-period fiber gratings”, *Proceedings of the 22nd General Congress of the International Commission for Optics*, Vol. 1063, p. 4510, 2011.
- [32] Beebe D., Mensing G. and Walker G., “Physics and applications of Microfluidics in biology”, *Annual review of biomedical engineering*, Vol. 4, pp. 261-286, 2002.
- [33] Courtois F., et. al., “Controlling the Retention of Small Molecules in Emulsion Microdroplets for use in Cell-Based Assays”, *Analytical Chemistry*, Vol.81, pp. 3008-3016, 2009.
- [34] Fujii M., et. al., “Volume controlled high throughput picoliter droplet generation system using cascade multi-stage separation channel”, *IEEE 24th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems*, pp.1201-1204, 2011.
- [35] Brassard D. et. al., “Advance Ewod-Based digital microfluidic system for multiplexed analysis of bimolecular interactions”, *IEEE 24th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems*, pp.153-156, 2011.

- [36] Shim J., et. al., “Simultaneous determination of gene expression and enzymatic activity in individual bacterial cells in microdroplet compartments”, *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 131 (42), pp 1521-1526, 2009.
- [37] Wang W. and Soper S., “Bio-MEMS Technologies and Applications”, Boca Raton, USA, Taylor and Francis, 2007.
- [38] Hubner A., et. al., “Microdroplets: A sea of applications”, *Lab on a Chip*, Vol. 8 (8), pp. 1244-1254, 2008.
- [39] Xia Y. and Whitesides G., “Soft Litography”, *Angewandte Chemie International Edition*, Vol. 37 (5), pp 550-575, 1998.
- [40] Grimes A., et. al., “Shrinky-Dink microfluidics: rapid generation of deep and rounded patterns”, *Lab on a Chip*, Vol. 8 (1), pp. 170-172, 2008.
- [41] Tan H., et. al., “A reliable method for bonding polydimethylsiloxane(PDMS)to polymethylmethacrylate (PMMA) and its application in micropumps”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 151 (1),pp. 133-139, 2010.
- [42] Van Dam, R., “Solvent-resistant elastomeric microfluidic devices and applications”, Thesis Dissertation (Ph.D.), California Institute of Technology, 2006, consultada por ultima vez el 18/10/2012 en: “ <http://thesis.library.caltech.edu/4796/>”
- [43] Chau K. et. al., “Dependence of quality of adhesion between poly(dimethylsiloxane) and glass surfaces on the composition of the oxidizing plasma”. *Microfluidic Nanofluidic*, Vol.10 (4), pp. 907-917, 2010.
- [44] Millare B., et. al., “Dependence of quality of adhesion between poly(dimethylsiloxane) and glass surfaces on the conditions of treatment with oxygen plasma”, *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, Vol. 24 (22), pp. 13218-13224, 2008.

- [45] Manual de operación del software: “Topography Measurement System Software 2.0”, del caracterizador de MEMS modelo MSA-400, marca Polytec.
- [46] Spring K. and Davidson M., “Introduction to fluorescence microscopy”, notas técnicas de Nikon, consultadas por última vez en octubre 18, 2012, en la URL: www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html.
- [47] Michael Bass, et al. “Handbook of optics vol.4, Optical Properties of Materials Nonlinear Optics, Quantum Optics”, tercera edición, USA, Mc Graw Hill, 2010.
- [48] Ronal R. Willey, “Design of blocking filters of any narrow bandwidth”, *Applied optics*, Vol.46 (8), pp 1201-1204, 2007.
- [49] Hecht, E., “Óptica”, tercera edición, Madrid, España, Addison Wesley, 2006.
- [50] Spring K., Davidson M., “Introduction to microscope objectives”, notas técnicas Nikon, consultadas por última vez en octubre 18, 2012, en la URL: www.microscopyu.com/articles/optics/objectiveintro.html.
- [51] Dakin P., et. al., “Handbook of optoelectronics”, Taylor and Francis, vol. 1, 2006.
- [52] Davidson M., and Abramowitz M., “Optical microscopy”, notas técnicas de Olympus America consultadas por últimas en octubre 18, 2012, en la URL: www.olympusmicro.com/primer/microscopy.pdf.