



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Diseño, construcción y funcionamiento de microchips,
aplicados a microfluidos a través de dos métodos de
microfabricación

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERO QUIMICO

PRESENTA

JULIO CÉSAR CALDERÓN LUMBRERAS

ASESOR

Dr. LUIS FERNANDO OLGUÍN CONTRERAS

MÉXICO D.F, JUNIO 2012





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Biofisiología

Departamento de Fisiología

Facultad de Medicina

Universidad Nacional Autónoma de México

ENCARGADOS DEL LABORATORIO DE BIOFISIOLÓGICA

Dr. Miguel Antonio Costas Basín

Dra. Silvia del Socorro Pérez Casas

Dr. Luis Fernando Olguín Contreras

Dr. Ernesto Carrillo Nava

Teléfono: 56223523

AGRADECIMIENTOS:

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme dado la oportunidad de desarrollarme como profesionista y como ser humano.

A La Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por haberme acogido durante 4 años y medio, y de la cual estoy sumamente orgulloso de pertenecer.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal "ICyTDF", por la beca otorgada para la realización de esta tesis dentro del proyecto titulado: Tecnología de microgotas en microchips para el descubrimiento de nuevos agentes antivirales, Clave PIFUTP09-288.

A mi asesor Dr. Luis Fernando Olgún Contreras, por su confianza y apoyo brindados en todo momento, además de todas las enseñanzas que tuve en la realización de este trabajo.

A todos los integrantes del Laboratorio de Biofísicoquímica de la Facultad de Química, por todo su apoyo y amistad que me brindaron.

Al Dr. Naser Qureshi, por su apoyo en la utilización del Cuarto Limpio del Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico (CCADET), de la UNAM, para la fabricación de los moldes para fotolitografía suave.

Al Ingeniero Benjamín Vázquez, por su apoyo en la realización de las pruebas con fluorescencia y por todo el trabajo en conjunto que pudimos realizar.

A la Dra. Laura A. Oropeza Ramos y al M. en I. Jorge A. Soto Olmos por su apoyo brindado para la utilización del Polytec MSA-40, del Laboratorio de Caracterización y Pruebas del UNAMems, de la Facultad de Ingeniería para la caracterización de los microcanales.

A Arturo Macías, por su apoyo en el uso del horno del Laboratorio de Biofísica de la Facultad de Ciencias, para la reducción de los Shrinky-Dinks.

A mis sinodales, por tomarse algo de su tiempo para este trabajo, y brindarme sus valiosas sugerencias.

A mis compañeros que estuvieron conmigo en algún momento de mi vida en la Facultad.

A mis profesores que contribuyeron de manera tan importante en mi desarrollo profesional.

Y a todos aquellos que fueron parte de mi vida, que seguramente de cada uno aprendí algo.

DEDICADA:

Primeramente a Dios, por darme vida para realizar tantas cosas de las que me ha dado oportunidad.

A mis padres José César y María Teresa por su apoyo que me han dado día con día, por su amor desde que nací, por todas las enseñanzas brindadas en cada momento de mi vida, y el ejemplo dado para poder realizar cada cosa con entusiasmo y respeto. LOS AMO.

A mis hermanas Shadai y Shekinah, por todo su amor hacia mí, por cada palabra de aliento y por todo su apoyo brindado desde siempre. LAS AMO

A mis abuelitos, Juan Calderón, Juana Zavala, Daniel Lumbreras† y Guadalupe Rangel, por todas sus enseñanzas. LOS AMO.

A mis tíos, Dolores y Luis, a mis primos Diana, Luis, Israel y Abigail, por todo su apoyo. LOS AMO.

A mis tíos y primos que han estado conmigo, brindándome su apoyo. LOS AMO.

A mis amigos de tantos años, José Alberto, Melissa, Diana, Mauricio, Mónica, Emili, Lilitiana, Crisanto, Luis Alberto, Rocío, Adriana, Flor de Abril, Bárbara, Alejandro y Rafael, por su amistad durante todos estos años, compartiendo conmigo tantas cosas, buenas y malas. Los quiero mucho.

A mis amigos de la carrera, Erika, Emilio, Oscar, Laura, Berenice, Monserrat y Lourdes, que con su amistad y compañía, me ayudaron a disfrutar cada momento de la carrera, estando conmigo en momentos difíciles y de alegría. Los quiero mucho.

A mi amigo y Entrenador de Basquetbol Salvador "Horse", por haber sido el único profesor que me dio clases durante los 4 años y medio, brindándome un sinfín de enseñanzas, y por brindarme su amistad.

A mis amigos que compartieron conmigo la grandiosa experiencia de pertenecer al H. Consejo Universitario de la UNAM, Dayana, Mariana, Enrique y Salvador.

Y finalmente a todos aquellos que han compartido un momento de su tiempo, para estar conmigo y que me han ayudado a crecer como ser humano.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABLAS.....	iv
LISTA DE GRAFICAS.....	v
RESUMEN	viii
INTRODUCCIÓN	x
OBJETIVOS.....	xi
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	1
1.1 NUMERO DE REYNOLDS EN FLUIDOS Y EN MICROFLUIDOS	1
1.2 MEMS (SISTEMAS MICRO-ELECTROMECÁNICOS) Y MICROFLUÍDICA	1
1.3 EL NACIMIENTO DE LA MICROFLUÍDICA	4
1.4 MICROFLUÍDICA EN DISPOSITIVOS DE LABORATORIO	5
1.5 MICROFLUÍDICA Y LA INGENIERÍA QUÍMICA.....	5
CAPITULO 2. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE MICROCHIPS.....	7
2.1 INTRODUCCIÓN	7
2.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	9
2.2.1 DISEÑO DE MOLDES	9
2.2.2 METODOLOGÍA DE FABRICACIÓN DE MOLDES PARA MICROCHIPS CON SHRINKY-DINKS	10
2.2.3 FABRICACIÓN DE MICROCHIPS	13
2.2.4 METODOLOGÍA DE FABRICACIÓN DE MOLDES PARA MICROCHIPS POR FOTOLITOGRAFÍA SUAVE.....	16
2.3 RESULTADOS.....	19
2.3.1 LIMITES DE CONSTRUCCIÓN DE LOS MOLDES PARA MICROCHIPS POR LAS TECNICAS DE SHRINKY-DINKS Y FOTOLITOGRAFIA SUAVE.....	19
2.3.2 RESULTADOS DE LAS MEDIDAS EXACTAS DE LOS MICROCHIPS.....	25
2.4 ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	29
2.5 CONCLUSIONES	30
CAPÍTULO 3. TRATAMIENTO CON PLASMA.....	31
3.1 CONDICIONES ÓPTIMAS PARA EL TRATAMIENTO CON PLASMA.....	31
3.1.1 PROPIEDADES TERMODINÁMICAS DEL PLASMA	32
3.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	33

3.3 RESULTADOS	34
3.4 ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	37
3.5 CONCLUSIONES	38
CAPÍTULO 4. FUNCIONAMIENTO DE LOS MICROCHIPS	39
4.1 ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA DE MICROGOTEO	39
4.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL PARA GENERACIÓN DE MICROGOTAS.....	40
4.3 RESULTADOS.....	41
4.4 ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	60
4.5 CONCLUSIONES	61
CAPÍTULO 5. ACOPLAMIENTO DE UN HPLC A UN MICROCHIP DE MICROFLUIDOS.....	63
5.1 INTRODUCCIÓN A HPLC.....	63
5.2 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO QUE PERMITA ACOPLAR UN HPLC A UN MICROCHIP MICROFLUIDICO.....	66
5.3 RESULTADOS.....	68
5.3.1 PRIMER DISEÑO	68
5.3.2 SEGUNDO DISEÑO	70
5.4 ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	72
5.5 SUGERENCIAS	72
5.6 CONCLUSIONES	72
CONCLUSIONES GENERALES	73
ANEXO A. SISTEMA DE FLUORESCENCIA LASER EXPERIMENTAL	75
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Sistema de engranes fabricados por tecnología MEMS, al lado de un ácaro.Tomada de [7]	2
Figura 1.2 Dispositivo de las bolsas de aire de automóviles fabricado con la tecnología MEMS	3
Figura 1.3 Cabezal de una impresora de inyección de tinta fabricado por tecnología MEMS (Izquierda). Tamaño de las gotas impresas en una hoja de papel (derecha)	4
Figura 1.4 Microbomba utilizada para la inyección continua de medicamentos. Tomada de [9]	5
Figura 1.5 Refinería de petróleo, un reto para el desarrollo por medio de dispositivos microfluidicos	6
Figura 2.1 Procesos de fabricación de canales de microfluidos usando PDMS	8
Figura 2.2 La primera imagen muestra un Shrinky –Dink con un diseño aplicado en este trabajo, antes de ser sometido a una temperatura de 280 °C. La segunda imagen es el molde ya reducido por efecto de la temperatura	9
Figura 2.3 Diseño de microchips tanto para Shrinky-Dinks como para fotolitografía suave en AUTOCAD 2011 (Izquierda) y en Corel Draw 5.0 (Derecha)	10
Figura 2.4 Figura de un Shrinky-Dink antes de reducir	11
Figura 2.5 Horno donde se introducen los Shrinky-Dinks para reducir, a 280°C	12
Figura 2.6 Figura de un Shrinky-Dink después de haber sido introducido al horno. Se aprecia de forma evidente la reducción del diseño con respecto a la figura 2.4	12
Figura 2.7 Funcionamiento del plasma utilizando como gas generador aire de la atmósfera creando un plasma color morado (Izquierda). Plasma generado utilizando como gas generador O ₂ puro, (Derecha)	15
Figura 2.8 Microchip terminado, listo para ponerse en funcionamiento	15
Figura 2.9 Máscaras con diseños en negativo recortadas	16
Figura 2.10a. Panel de control del spin coater.Figura2.10b. Colocación de la resina en la oblea....	17
Figura 2.11 Oblea de silicio con SU-8 en parilla a 95°C	17
Figura 2.12 Fuente de luz UV colimada	18
Figura 2.13 Oblea en revelador y posteriormente en isopropanol	18
Figura 2.14 Microchip construido por el método de fotolitografía suave	19
Figura 2.15a Se muestra el ancho de los canales de un Shrinky-Dink (molde), el cual fue diseñado a 1µm (utilizando el software: Autocad 2011). En la figura 2.15b, se muestra el ancho de los canales	

de un shrinky-Dink, el cual fue diseñado a $10\mu\text{m}$ (utilizando el software: Autocad 2011). Se puede ver que es casi nula la diferencia en el ancho de estos dos canales..... 20

Figura 2.16 Se muestran los diseños a un ancho de $1\mu\text{m}$, $10\mu\text{m}$ y $30\mu\text{m}$, diseñados en Autocad 2011 ya transformados en formato PDF y se observa que ya son prácticamente del mismo ancho21

Figura 2.17a. Muestra el ancho real de los diseños en los negativos diseñados con el software Autocad 2011 a $1\mu\text{m}$ de ancho. La figura 2.17b. Muestra el ancho real de los canales en el diseño a $10\mu\text{m}$. La figura 2.17c muestra los el ancho real de los canales en el diseño a $30\mu\text{m}$. Con estas imágenes se puede determinar que es en la conversión al formato de archivo PDF cuando se pierde la escala correcta de los diseños..... 22

Figura 2.18a Muestra el ancho real de los diseños en negativo a $50\mu\text{m}$, la figura 2.18b muestra el ancho real de los canales a $100\mu\text{m}$ y la figura 2.18c, muestra el ancho real de los canales a $200\mu\text{m}$. Se observa, una diferencia entre el ancho de los canales, ya que se mantiene mucho mas la escala real de los diseños..... 24

Figura 2.19 Equipo Polytec MSA-40, Microsystems Analyzer, ubicado en el Laboratorio de Caracterización y pruebas, en el Edificio UNAMems de la Facultad de Ingeniería y usando el modo de TMS (Tophography Measurement System), para caracterización de microcanales en microdispositivos. 25

Figura 2.20 Microcanal construido con la técnica de Shrinky-Dinks, utilizando el programa de diseño Autocad 2011 con un ancho teórico de canales de $1\mu\text{m}$. Se muestra que el canal en realidad tiene un ancho de $256.8\mu\text{m}$ y una profundidad de $43.15\mu\text{m}$ 26

Figura 2.21 Microcanal construido con la técnica de Shrinky-Dinks, utilizando el programa de diseño Autocad 2011 con un ancho de canales en el diseño de $10\mu\text{m}$. Se muestra que el canal en realidad tiene un ancho de $284.5\mu\text{m}$ y una profundidad de $49.07\mu\text{m}$ 26

Figura 2.22 Microcanal construido con la técnica de Shrinky-Dinks, utilizando el programa de diseño Corel Draw X5, diseñado teóricamente con un ancho de canales de $200\mu\text{m}$. Se muestra que en realidad tiene un ancho de canales de $314\mu\text{m}$ y una profundidad de $47.55\mu\text{m}$ 27

Figura 2.23 Microcanal construido con la técnica de Shrinky-Dinks, utilizando el programa de Corel Draw X5 con un ancho teórico de $100\mu\text{m}$. Se muestra que en realidad los canales tienen un ancho de $337\mu\text{m}$ y una profundidad de $49.97\mu\text{m}$ 27

Figura 2.24 Microcanal construido con la técnica de fotolitografía suave, utilizando el programa de diseño Autocad 2011 con un ancho teórico de canales de $1\mu\text{m}$. Se muestra que en realidad los canales tienen un ancho de $234.3\mu\text{m}$ y una profundidad de $130.1\mu\text{m}$ 28

Figura 2.25 Microcanal construido con la técnica de fotolitografía suave, utilizando el programa de diseño Corel Draw X5 con un ancho teórico de 200 μm . Se muestra que en realidad los canales tienen un ancho de 185 μm y una profundidad de 119.1 μm	28
Figura 2.26 Microcanal construido con la técnica de fotolitografía suave, utilizando el programa de diseño Corel Draw X5 con un ancho teórico de canales de 100 μm . Se muestra que en realidad los canales tienen un ancho de 91.6 μm y una profundidad de 82.46 μm	29
Figura 3.1 Plasma generado por 3 gases diferentes, con helio, aire y oxígeno puro.....	31
Figura 3.2 Efectos en el Proceso de Plasma	32
Figura 3.3 Horno de plasma utilizado en este trabajo para la activación de superficies de PDMS y vidrio para la microfabricación de microchips.	33
Figura 3.4 Representación de la colocación de los pedazos de PDMS en el vidrio, con lo que se logra una medición más representativa y se disminuye el rango de error.....	34
Figura 3.5 Imagen que muestra todas las pruebas que se hicieron con el plasma, para encontrar las condiciones óptimas de operación del equipo de plasma.....	36
Figura 4.1 Microgotas de fase acuosa generadas en una fase orgánica, en tres distintos tipos de diseño de microcanal	39
Figura 4.2 Partes principales del microchip	40
Figura 4.3 En esta imagen se muestran algunas gotas generadas en un microchip construido por Shrinky-Dinks, y se pueden apreciar algunas características de las gotas.....	42
Figura 4.4 En esta imagen se muestran algunas gotas generadas en un microchip construido por fotolitografía suave en la cual se observan algunas características de las gotas formadas.	48
Figura 4.5 En la imagen se muestra una serie de figuras tomadas de las lecturas hechas del programa Lab-View, del microchip con un ancho de canales de 256.8 μm y una profundidad de 43.15 μm , donde cada pico representa una gota. Se aprecia un aumento de la frecuencia muy estable.....	58
Figura 4.6 En la imagen se muestra una serie de figuras tomadas de las lecturas hechas del programa Lab-View, donde cada pico representa una gota, en el microchip construido con un ancho de canales de 91.6 μm y una profundidad de 82.46 μm	59
Figura 5.1 Separación por HPLC de cafeína. Condiciones: columna. 15 cm x 2 mm, fase estacionaria. YMC 120 ODS-Aq, 3 μM ; fase móvil, 0.3 ml min ⁻¹ agua-acetonitrilo (8:2)	65

Figura 5.2 Diagrama esquemático de una unidad de HPLC. 1=Deposito de disolvente; 2=Línea de transferencia; 3=Bomba (con manómetro); 4= Inyección de muestra; 5= columna (con termostato); 6= Detector; 7= Residuos; 8= Adquisición de datos.....	66
Figura 5.3 Se muestra el funcionamiento esencial del sistema para este trabajo, donde se observa la función que tiene el HPLC, que es el de inyectar, varios compuestos químicos separados de forma rápida, hasta que alguno inhiba la fluorescencia en la reacción.....	67
Figura 5.4 Diseño de dispositivo de reducción de flujo, en una máscara para ser construido por fotolitografía suave. Tiene una entrada y 8 salidas.	68
Figura 5.5 Dispositivo de división de flujo puesto en funcionamiento, se aprecia que la división de flujo se lleva a cabo de forma adecuada.....	68
Figura 5.6 Conexión entre el dispositivo de reducción de flujo con solo dos salidas, una de las cuales esta conectada al microchip elegido que se construye por fotolitografía suave.	69
Figura 5.7 En esta imagen se puede observar que no se logra una estabilidad entre los flujos, ya que los flujos provenientes de las microbombas invaden al flujo proveniente del dispositivo, a pesar de aumentar el flujo, la presión sigue siendo mucho menor.....	70
Figura 5.8 Diseño del reductor de flujo dentro del microchip.	71
Figura 5.9 Se aprecia como no existe una estabilidad en los flujos, los provenientes de los costados tienden a invadir de manera muy facil del canal del centro que proviene del diseño de división de flujo.	71

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1 Diferentes velocidades y tiempos a las que se depositó la resina SU-8 en obleas de silicio	16
Tabla 2.2 Ancho de canales para Shrinky-Dinks determinado con un microscopio (objetivo 4x), con 6 pasadas en la impresora.....	21
Tabla 2.3 Ancho de canales en máscaras para fotolitografía suave con objetivo de 4x.....	23
Tabla 2.4 Ancho de canales en máscaras para fotolitografía suave con objetivo de 4x diseñados con Corel Draw 5.0.....	24
Tabla 3.1 Resultados de estudio semicuantitativo de QA (Calidad de Adhesión)	35
Tabla 3.2 Promedio de los Estudios de Adhesión	35
Tabla 3.3 Resultados de la QA del PDMS en superficies de vidrio a potencias bajas	36

Tabla 3.4 Promedios de los estudios de adhesión con potencias bajas	37
Tabla 4.1 Diseño en Corel Draw 5.0 “Shrinky-Dink”, con un ancho de 314 μm y una profundidad de 47.55 μm , donde se aumentó de forma gradual el flujo total.....	42
Tabla 4.2 Diseño en Corel Draw 5.0 “Shrinky-Dink”, con un ancho de 314 μm y una profundidad de 47.55 μm . donde se aumentó de forma gradual la relación de flujo (agua/aceite).....	44
Tabla 4.3 Diseño en Autocad 2011 “Shrinky-Dink”, con un ancho de 256.8 μm y una profundidad de 43.15 μm , donde se aumentó de forma gradual el flujo total.....	45
Tabla 4.4 Diseño en Autocad 2011 “Shrinky-Dink”, con un ancho de 256.8 μm y una profundidad de 43.15 μm , donde se aumentó de forma gradual la relación de flujo (agua aceite).....	47
Tabla 4.5 Diseño en Corel Draw 5.0 “fotolitografía suave” con un ancho de 185 μm y una profundidad de 119.1 μm , donde se aumentó de forma gradual el flujo total.....	49
Tabla 4.6 Diseño en Corel Draw 5.0 “fotolitografía suave” con un ancho de 185 μm y una profundidad de 119.1 μm , donde se aumentó de forma gradual la relación de flujo (agua/aceite)50	
Tabla 4.7 Diseño en Autocad 2011 “fotolitografía suave” con un ancho de 234.3 μm y una profundidad de 130.1 μm , donde se aumentó de forma gradual el flujo total.....	52
Tabla 4.8 Diseño en Autocad 2011 “fotolitografía suave” con un ancho de 234.3 μm y una profundidad de 130.1 μm , donde se aumentó de forma gradual la relación de flujo agua/aceite. 53	
Tabla 4.9 Diseño en Corel Draw 5.0 “fotolitografía suave” con un ancho de 91.6 μm y una profundidad de 82.46 μm , donde se aumentó de forma gradual el flujo total.....	55
Tabla 4.10 Diseño en Corel Draw 5.0 “fotolitografía suave” con un ancho de 91.6 μm y una profundidad de 82.46 μm , donde se aumentó de forma gradual la relación de flujo agua/aceite . 56	

LISTA DE GRAFICAS

Gráfica 3.1 Efecto de la potencia y el tiempo en la calidad de la del PDMS en superficies de vidrio.	35
Gráfica 3.2 Grafica que muestra los resultados finales de los estudios de adhesión de PDMS a vidrio con tratamiento de Plasma, manejando potencias bajas.....	37
Gráfica 4.1 Gráfica que muestra el comportamiento de la frecuencia de las gotas generadas con respecto al aumento del flujo total manteniendo una relación agua/aceite = 0.5	43
Gráfica 4.2 Gráfica que muestra el comportamiento del volumen de las gotas con respecto al aumento del flujo total manteniendo una relación agua/aceite = 0.5	43

Gráfica 4.3 Gráfica que muestra el comportamiento de la frecuencia de gotas generadas con respecto al aumento de la relación de flujo entre la fase acuosa y la fase orgánica manteniendo un flujo total constante = $150 \mu\text{Lhr}^{-1}$	44
Gráfica 4.4 Gráfica que muestra el comportamiento del volumen de las gotas con respecto al aumento de la relación de flujo entre la fase acuosa y la fase orgánica manteniendo un flujo total constante = $150 \mu\text{Lhr}^{-1}$	45
Gráfica 4.5 Gráfica que muestra el comportamiento de la frecuencia de las gotas generadas con respecto al aumento del flujo total manteniendo la relación de agua/aceite= 0.5	46
Gráfica 4.6 Gráfica que muestra el comportamiento del volumen de las gotas con respecto al aumento del flujo total manteniendo la relación agua/aceite= 0.5	46
Gráfica 4.7 Gráfica que muestra el comportamiento de la frecuencia de gotas generadas con respecto al aumento de la relación de flujo entre la fase acuosa y la fase orgánica manteniendo un flujo total constante = $150 \mu\text{L hr}^{-1}$	47
Gráfica 4.8 Grafica que muestra el comportamiento del volumen de las gotas con respecto al aumento de la relación de flujo entre la fase acuosa y la fase orgánica manteniendo un flujo total constante = $150 \mu\text{L hr}^{-1}$	48
Gráfica 4.9 Gráfica que muestra el comportamiento de la frecuencia de las gotas generadas con respecto al aumento del flujo total manteniendo una relación de agua/aceite= 0.24	49
Gráfica 4.10 Grafica que muestra el comportamiento del volumen de las gotas con respecto al aumento del flujo total manteniendo una relación de agua/aceite= 0.24	50
Gráfica 4.11 Gráfica que muestra el comportamiento de la frecuencia de gotas generadas con respecto al aumento de la relación de flujo entre la fase acuosa y la fase orgánica manteniendo un flujo total constante= $200 \mu\text{L hr}^{-1}$	51
Gráfica 4.12 Gráfica que muestra el comportamiento del volumen de las gotas con respecto al aumento de la relación de flujo entre la fase acuosa y la fase orgánica manteniendo un flujo total constante= $200 \mu\text{L hr}^{-1}$	51
Gráfica 4.13 Gráfica que muestra el comportamiento de la frecuencia de las gotas generadas con respecto al aumento del flujo total manteniendo una relación de agua/aceite= 0.24	52
Gráfica 4.14 Grafica que muestra el comportamiento del volumen de las gotas con respecto al aumento del flujo total manteniendo una relación de flujo de agua/aceite= 0.24	53

Gráfica 4.15 Gráfica que muestra el comportamiento de la frecuencia de gotas generadas con respecto al aumento de la relación de flujo entre la fase acuosa y la fase orgánica manteniendo un flujo total constante= 200 $\mu\text{L hr}^{-1}$	54
Gráfica 4.16 Gráfica que muestra el comportamiento del volumen de las gotas con respecto al aumento de la relación de flujo entre la fase acuosa y la fase orgánica manteniendo un flujo total constante= 200 $\mu\text{L hr}^{-1}$	54
Gráfica 4.17 Gráfica que muestra el comportamiento de la frecuencia de las gotas generadas con respecto al aumento del flujo total manteniendo una relación de flujo agua/aceite= 0.24	55
Gráfica 4.18 Gráfica que muestra el comportamiento del volumen de las gotas con respecto al aumento del flujo total manteniendo una relación de flujo agua/aceite= 0.24.....	56
Gráfica 4.19 Gráfica que muestra el comportamiento de la frecuencia de gotas generadas con respecto al aumento de la relación de flujo entre la fase acuosa y la fase orgánica manteniendo un flujo total constante= 100 $\mu\text{L hr}^{-1}$	57
Gráfica 4.20 Grafica que muestra el comportamiento del volumen de las gotas con respecto al aumento de la relación de flujo entre la fase acuosa y la fase orgánica manteniendo un flujo total constante= 100 $\mu\text{L hr}^{-1}$	57

RESUMEN

La microfluídica es la disciplina que se encarga del estudio de los fluidos en escalas micrométricas. Su desarrollo ha impactado de gran manera en algunas áreas de la química, biología y biomedicina, especialmente en análisis y microsíntesis. Esto ha llevado a la búsqueda de métodos más eficientes y económicos para la construcción de microdispositivos que contengan y puedan manipular los microfluidos. En esta tesis se hizo una comparación entre la técnica de fotolitografía suave y la de reducción de acetatos Shrinky Dinks para fabricar microchips de polidimetilsiloxano (PDMS) capaces de formar microgotas que posteriormente sean utilizados para realizar reacciones de inhibición enzimática.

Los microchips se diseñaron utilizando los softwares Autocad 2011 y Corel Draw 5.0, con canales de 1 a 1200 μm de diámetro. Sin embargo, se encontró que con la tecnología disponible para realizar esta tesis, no es posible imprimir máscaras para fotolitografía suave de menos de 91.6 μm ni moldes de Shrinky-Dinks de menos de 256.8 μm . Estas dimensiones marcaron los límites más pequeños del ancho de los microcanales fabricados en este trabajo. Las dimensiones exactas del ancho y de la profundidad de los microcanales se obtuvieron con un interferómetro óptico, Polytec MSA-40, Microsystems Analyzer (microtopografía) observándose una geometría rectangular para los microcanales construidos por fotolitografía suave y canales semicirculares para los construidos por Shrinky Dinks. La profundidad de los canales de los Shrinky-Dinks fue de 43.15 μm y para el microchip elegido que se construyó por fotolitografía suave fue de 82.46 μm .

El último paso en la construcción de los microchips, es el pegado del PDMS a un portaobjetos de vidrio para sellar totalmente los canales y este proceso se realiza por medio de un horno de plasma. Debido a que el pegado no se estaba llevando de forma adecuada, se decidió hacer una serie de pruebas para encontrar las condiciones óptimas de operación del equipo. Dichas pruebas se basaron en la realización de distintos procedimientos de pegado, cambiando el tiempo y la potencia de operación del horno de plasma. Se encontraron que las condiciones más adecuadas para este trabajo son un tiempo de 0.3 minutos a una potencia de 35 Watts.

Con las características mencionadas se construyeron microchips por los dos métodos que pudieran formar microgotas de agua en aceite. Se evaluó la eficiencia de cada tipo de chip para formar las microgotas y se caracterizaron la frecuencia y el volumen de las microgotas bajo diferentes flujos totales (desde 37.5 μm hasta 384 μm) y a diferentes relaciones de aceite/agua (desde 0.15 hasta 1).

Se logró formar microgotas con los microchips construidos por ambos métodos, pero se observó una mayor uniformidad en las gotas con los chips fabricados por fotolitografía suave (diferencias de hasta el 14 % en el volumen), respecto a los construidos por Shrinky-Dinks (diferencias de hasta un 27 % en el volumen).

Teniendo el/los microchip(s), con lo que se puede trabajar mejor cumpliendo con las características necesarias para utilizarlo en el análisis. Se contempla la necesidad de acoplar un

equipo de HPLC, el cual ayudará a introducir una mezcla de diferentes químicos, logrando hacer análisis más rápidamente. Esto representa un problema, ya que el flujo de salida del HPLC es en flujos de mL min^{-1} , y el flujo necesario para los microchips es en $\mu\text{L hr}^{-1}$.

Finalmente se diseñaron y probaron dos microchips para tratar de acoplar la salida de un equipo HPLC a un microchip para microgotas. Estos microchips intentaban reducir el flujo de 1.0 mL min^{-1} a $100 \mu\text{L hr}^{-1}$, pero los resultados de estos chips muestran que hay que hacer más pruebas para encontrar geometrías y dimensiones adecuadas para este propósito.

INTRODUCCIÓN

El presente texto es el manuscrito que refleja el trabajo experimental realizado en el Laboratorio de Biofísicoquímica de la Facultad de Química de la UNAM durante el periodo de marzo de 2011 a mayo de 2012.

El texto se encuentra dividido en 5 capítulos, cada uno con una sección de introducción, resultados y análisis. Además cuenta con conclusiones generales.

El capítulo 1 es una revisión bibliográfica sobre los orígenes de la microfluidica, así como de los orígenes de las primeras tecnologías para la miniaturización de distintos sistemas para diferentes áreas de la ciencia y la tecnología.

En el capítulo 2 de este trabajo se analizan dos técnicas que se han desarrollado para la fabricación de sistemas microfluidicos. Primeramente se da un pequeño marco teórico que introduce a los orígenes de la microfabricación de dispositivos microfluidicos, así como de los orígenes de las dos técnicas de microfabricación que se desarrollaron en este trabajo, la técnica de Shrinky-Dinks y la técnica de fotolitografía suave. Estas técnicas se han desarrollado para la fabricación de sistemas microfluidicos, por lo que se busca encontrar la metodología que mejor funcione para la construcción de microchips tanto por Shrinky-Dinks como por fotolitografía suave, por último se realiza una comparación entre las ventajas y desventajas que se presentan en cada una de las técnicas, con respecto a su fabricación.

En el capítulo 3 se revisa qué es el plasma, así como sus características y se describen las pruebas que se realizaron para optimizar el proceso de activación y pegado de los microchips.

El capítulo 4 trata sobre el uso de microchips para generar microgotas de agua dentro de un flujo continuo de una fase orgánica. La generación de microgotas dentro de los microchips, es una técnica ampliamente utilizada ya que con esta técnica es posible realizar análisis de forma más rápida y controlada.

Puesto que no se encontró ninguna metodología para caracterizar el funcionamiento de los microchips, que permitiera determinar que un microchip funciona mejor que otro con características diferentes. Por esto se propone una técnica de caracterización de las microgotas que consiste en determinar las dos principales características de las gotas, que permitan calificar su funcionamiento. Estas características son: La frecuencia generada de las microgotas y el volumen de las gotas. Estableciendo esto, se logrará determinar cuál es el microchip que mejor funciona y cuál de las dos técnicas de construcción es más eficiente para generar microgotas estables.

En el capítulo 5 se muestran los resultados de explorar la posibilidad de acoplar la salida de un equipo de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) a estos dispositivos.

Finalmente las conclusiones generales de esta tesis mencionan los resultados más importantes de este trabajo, así como sus implicaciones.

OBJETIVOS

- Diseñar diferentes dispositivos para formación de microgotas, para que estas posteriormente se utilicen como microreactores de inhibición enzimática.
- Fabricación de los microchips por los métodos de Shrinky-Dinks y Fotolitografía suave.
- Elegir el mejor diseño para formación de microgotas (caracterizando flujos).
- Determinar cuál de los dos métodos de construcción es el más apropiado para este experimento (Por eficiencia y costo-trabajo de producción).
- Diseñar y construir por los mismos métodos un microchip que funcione como dispositivo para reducir el flujo de salida de un HPLC y que este se logre acoplar a los microchips construidos.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1 NUMERO DE REYNOLDS EN FLUIDOS Y EN MICROFLUIDOS

Un fluido se define como una sustancia que continuamente se deforma en el momento en que es sometido a un esfuerzo cortante, sin importar que tan pequeño sea este esfuerzo. La fuerza cortante es una fuerza tangente a una superficie y esta fuerza dividida por el área de la superficie es el esfuerzo cortante; que en un punto es el valor límite de la fuerza cortante al área cuando esta se reduce al punto [1].

El flujo laminar se define como el fluido que se mueve en forma de capas o laminas, donde una capa se desliza suavemente sobre otra que se encuentra adyacente con solo un intercambio molecular de cantidad de movimiento. El flujo turbulento, a diferencia, se desplaza de manera errática con un intercambio de movimiento muy violento. La naturaleza del flujo laminar o turbulento y su posición relativa sobre una escala que indica una tendencia turbulenta o laminar, es indicada por el Número de Reynolds [1], el cual se expresa de la siguiente manera:

$$Re = \frac{D * v * \rho}{\mu}$$

Donde:

Re= Número de Reynolds.

D= Diámetro del conducto.

v= Velocidad promedio del líquido.

ρ = Densidad del Fluido

μ = Viscosidad del fluido.

Cabe mencionar que en una tubería si $Re \leq 2000$, el flujo es laminar, y si $Re \geq 4000$ el flujo es turbulento [2].

Con esto se puede decir que el número de Reynolds puede ser afectado considerablemente cuando se reducen significativamente los diámetros de los conductos por los que pasan los fluidos, es decir cuando hay una miniaturización. Por ejemplo, para sistemas microfluidicos como los capilares sanguíneos, el $Re \leq 100$, por lo tanto el flujo es laminar [3].

Es así como con ayuda del Re, se puede apreciar que las condiciones en un sistema a microescala son muy diferentes a un sistema a macroescala, ya que este es mucho menor a los sistemas convencionales.

1.2 MEMS (SISTEMAS MICRO-ELECTROMECAÑICOS) Y MICROFLUÍDICA

La miniaturización de diferentes dispositivos mecánicos y sistemas electrónicos ha dado muchos beneficios a diferentes áreas de investigación y a grandes desarrollos tecnológicos. La ciencia que

se ocupa del estudio de estos dispositivos se conoce comúnmente como MEMS, por sus siglas en inglés que significan Micro-Electro-Mechanical Systems o sistemas electromecánicos miniaturizados en español [4]. Los MEMS son difíciles de concebir, ya que no es fácil imaginar un motor tan pequeño que sea imperceptible para el ojo humano, tal es el caso de una máquina de trabajo que no es más grande que un grano de polen [5].

A tal grado se ha avanzado en el área de la miniaturización, que se han desarrollado sistemas miniaturizados en la mecánica, hidráulica, así como también sistemas térmicos. Sin embargo, aunque los sistemas miniaturizados han resultado muy útiles en el campo de la investigación, ha sido difícil introducirlos en el área de la producción [4].

Los MEMS se han diversificado a nuevas áreas como la química, la biología y la biomedicina. Esto ha dado lugar a la creación de una nueva disciplina: La Microfluídica, que se define como el estudio de las corrientes de fluidos que circulan en sistemas artificiales microscópicos [4]. Esta disciplina permite resolver cuestiones pendientes en sistemas biológicos y químicos tales como: el análisis de ADN y el manejo de hidrocarburos para su análisis [6].

Actualmente la microfluídica representa una parte muy importante de la tecnología MEMS y es válido mencionar que un sistema miniaturizado debe estar entre $1\ \mu\text{m}$ y $300\ \mu\text{m}$ para ser considerado MEMS [4]. Estas medidas son sumamente pequeñas para ser percibidas a simple vista, como en el caso de la Figura 1.1 donde se observa un ácaro a lado de un sistema de engranes fabricados por tecnología MEMS, lográndose apreciar el tamaño real de un sistema de esta clase.

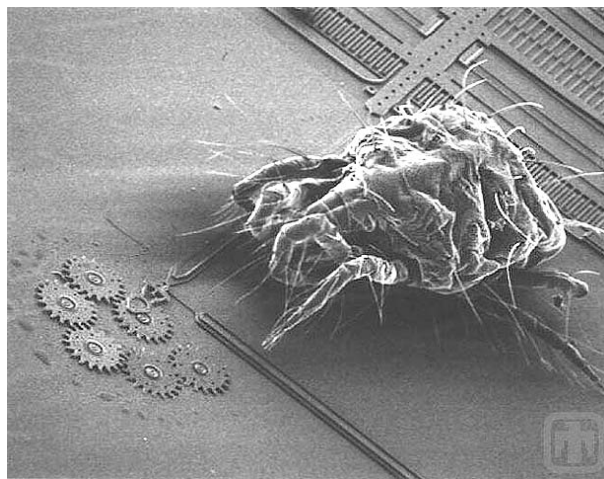


Figura 1.1 Sistema de engranes fabricados por tecnología MEMS, al lado de un ácaro. Tomada de [7]

El trabajo realizado en sistemas micrométricos no es nuevo, ya que en el momento de la invención del microscopio óptico en el siglo XVI, se empezaron a hacer descubrimientos científicos en escalas micrométricas, como el descubrimiento de algunas bacterias, de los cromosomas, etc. A pesar de esto, el trabajo en escalas micrométricas sigue siendo complicado [4], puesto que las condiciones de trabajo son muy diferentes a las condiciones de trabajo en escalas normales. Por

ejemplo, en esta tesis se trabajó con sistemas microfluidicos donde la capilaridad tiene un efecto importante, lo cual no sucede en sistemas a escalas normales. Con todo y esto, se han logrado muchos descubrimientos científicos y tecnológicos [4]. Por ejemplo, los automóviles más modernos tienen más de una docena de MEMS para su funcionamiento, debido a que el manejo de la energía es más seguro, más eficiente y más respetuoso con el medio ambiente [5]. Uno de los sistemas MEMS típicos en un automóvil se encuentra presente en las bolsas de aire. Esta tecnología consiste en un sistema integrado en una oblea de silicio capaz de incorporar componentes electrónicos y electromecánicos capaces de detectar el impacto físico (Figura 1.2). A pesar de su complejidad, el dispositivo es muy benéfico, ya que ofrece mucha seguridad a un sistema que requiere ser efectivo y que además resulta mucho más económico que otros sistemas convencionales [4].

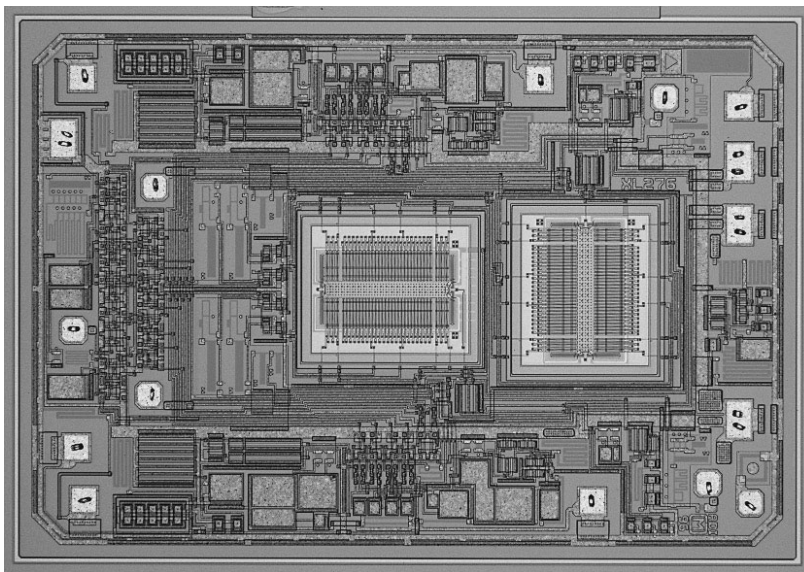


Figura 1.2 Dispositivo de las bolsas de aire de automóviles fabricado con la tecnología MEMS. Tomada [4]

Otro desarrollo muy importante, y que es ampliamente utilizado a nivel mundial, y que además ya se constituyó dentro de la microfluídica; fue el desarrollo de la impresora de inyección de tinta. La microfluídica se ocupa para la fabricación del cabezal de inyección de tinta por tecnología MEMS, el cual permite inyectar la tinta en volúmenes de microlitros como se aprecia en la Figura 1.3, donde se observa el tamaño de las impresiones generadas.

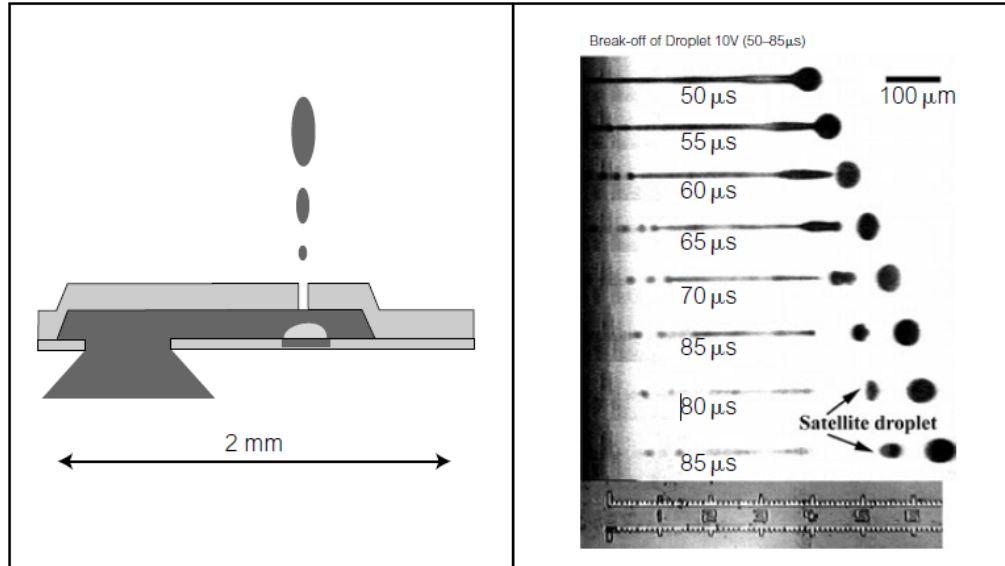


Figura 1.3 Cabezal de una impresora de inyección de tinta fabricado por tecnología MEMS (Izquierda). Tamaño de las gotas impresas en una hoja de papel (derecha). Tomada de [4]

Un desarrollo importante de la Microfluídica utilizando MEMS ha sido la invención de las pantallas de cristal líquido, el cual es un producto con impacto industrial enorme [6] y actualmente representa un avance sumamente importante para el desarrollo de pantallas de distintos recursos ampliamente utilizados, tales como televisiones, pantallas para computadora, videojuegos, etc.

1.3 EL NACIMIENTO DE LA MICROFLUÍDICA

La microfluídica nace cuando se empiezan a desarrollar MEMS en silicio. Con ayuda de esta técnica, en 1975 se desarrolló el primer cromatografo de gases miniaturizado, el cual distribuye los gases en microcanales grabados en silicio.

Después de esto pasaron muchos años para que los beneficios de la microfluídica se pudieran percibir de manera importante [4]. Algunos de los primeros fueron los análisis a fragmentos de ADN realizados por Jacobson y Ramsey [8] y posteriormente la aplicación en cromatografía [4].

Una de las más importantes contribuciones de la microfluídica ha sido la invención de la microbomba, la cual es ocupada en sistemas aplicados a la medicina. La Figura 1.4 muestra una microbomba de esta naturaleza, la cual se utiliza en pacientes que necesitan una inyección regular de algún medicamento, por lo que la microbomba debe ser de un tamaño muy pequeño para no afectar el funcionamiento de algún órgano del cuerpo.

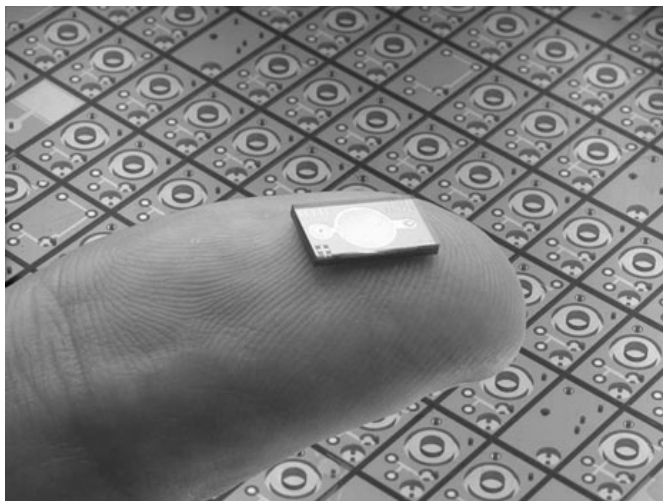


Figura 1.4 Microbomba utilizada para la inyección continua de medicamentos. Tomada de [9]

1.4 MICROFLUÍDICA EN DISPOSITIVOS DE LABORATORIO

Los llamados Lab-on-a-chip, son dispositivos que pueden integrar muchas funciones y procesos que se realizan en un laboratorio en un solo chip miniaturizado. Estos dispositivos se utilizan en una amplia gama de aplicaciones como análisis biomédicos, diagnósticos clínicos, ciencia forense, etc. [10]. Así mismo han sido de gran interés para la realización de escalamientos de procesos peligrosos [11]. Como por ejemplo, estos sistemas se han utilizado ampliamente para hacer análisis de bacterias acelerando el diagnóstico. Esto ha beneficiado mucho ya que estas son causantes de 130 000 muertes al año, solo en Estados Unidos [12]. El hecho de que se puedan realizar varios procesos en un solo dispositivos ofrece muchas ventajas como el de economizar y la realización más rápida de un análisis. Y aunque todavía hay muchos aspectos en lo que hay que avanzar y mejorar, es precisamente la tarea asignada a la microfluidica [4].

1.5 MICROFLUÍDICA Y LA INGENIERÍA QUÍMICA

Se ha pensado que aplicar la microfluídica en procesos químicos sería de gran utilidad, ya que se ha observado que al miniaturizar sistemas, es posible tener mejor control en algunos parámetros importantes en Ingeniería Química que son difíciles de controlar en sistemas tradicionales. Por ejemplo, el intercambio de calor, el cual es esencial en el manejo de reacciones sumamente exotérmicas o endotérmicas. Así mismo, con los microfluidos es posible mejorar el control de los fluidos dentro del sistema, lo cual resulta muy atractivo ya que esto permiten el ahorro económico, es menos peligrosa su implementación y es más respetuoso al medio ambiente [11],[4].

A través de los años, se ha pensado mucho en ya no solo utilizar sistemas microfluidicos para investigación de laboratorio, sino en poder miniaturizar un proceso a nivel industrial como el que

se muestra en la Figura 1.5, donde se observa una refinería. Sin embargo, el principal problema sería generar un volumen de producción suficiente con sistemas de producción miniaturizados [4]. Conociendo que la microfluídica maneja el estudio de fluidos en escalas desde los 10^{-9} litros a los 10^{-18} litros [13] sería muy difícil llegar a establecer un sistema a microescala que permita llegar a tener producciones suficientes de un producto.



Figura 1.5 Refinería de petróleo, un reto para el desarrollo por medio de dispositivos microfluidicos. Tomada de [4]

La respuesta a esta problemática sería la de acoplar millones de microdispositivos en una línea de producción. Algunos de los modelos de escalamiento en Ingeniería Química se desarrollaron en la década de 1930 a 1940 y sus principales objetivos eran los de optimizar la producción, reducir los riesgos de fugas, etc. [11]. Actualmente la miniaturización tendría los mismos objetivos, sin embargo con las técnicas de microfabricación que se conocen actualmente, sería más eficiente en la realización de estos objetivos.

CAPITULO 2. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE MICROCHIPS

2.1 INTRODUCCIÓN

Al principio todas las técnicas de micro y nanofabricación fueron desarrolladas para el campo de los semiconductores debido al importante desarrollo de la electrónica en los últimos 30 años. El silicio es el material predilecto para construir dichos microdispositivos y ha contribuido a un avance muy importante en la microfabricación de microdispositivos ya no solo en el campo de la electrónica [14]. En particular, la fabricación de dispositivos para microfluídica se ha visto muy beneficiada en los últimos quince años con la llegada del silicio como material de construcción de moldes.

El silicio permite crear estructuras en escalas micrométricas y aún menores, por lo cual ha dado lugar a un importante desarrollo en la fabricación de dispositivos que permiten el transporte y manipulación de líquidos [15]. Esto ha permitido un gran avance en muchas áreas donde se requiere un análisis minucioso de líquidos tales como microreactores y microgotas.

El manejo de fluidos en microcanales ofrece muchas ventajas respecto al flujo a macroescala, entre las más importantes están: mayor capacidad de transferencia de calor y de masa; mayor facilidad para controlar los flujos [15]; el volumen de reactivos utilizados es mucho menor, lo cual se verá reflejado en el importante ahorro de estos y por lo tanto económico, ya que en muchas ocasiones los reactivos para análisis especializados son muy costosos.

La elección del material para la construcción de moldes para fabricación de dispositivos de microfluídica depende de varios factores, tales como, facilidad de construcción, propiedades ópticas, compatibilidad química, así como el costo de fabricación [15].

Tradicionalmente, la fabricación de microchips con base en moldes de silicio, ha resultado la técnica más utilizada. También se ha desarrollado la construcción de moldes para dispositivos microfluídicos en metales, sobre todo en acero inoxidable. Sin embargo, resulta muy costoso y difícil, además de que se presenta un problema delicado en el trabajo con fluidos debido a la rugosidad que presentan los metales [15]. Últimamente se han desarrollado dispositivos de microfluídica en plásticos, los cuales son económicos y fáciles de conseguir [15], tal es el caso del polipropileno termoplástico el cual se ha utilizado ampliamente en los últimos años, sin embargo es una técnica menos eficiente y presenta algunos problemas que pueden influir en análisis muy detallados.

Finalmente una de las técnicas más utilizadas hoy en día para realizar prototipos de manera rápida y económica, es la litografía. El termino litografía proviene del vocablo griego, "lithos" que significa piedra y "grafía" que significa dibujo. Por esta razón, en principio se refiere a una estampación obtenida a partir de una matriz de piedra [16]. Científicamente se dice que la litografía es una técnica para transferir una copia de un patrón a la superficie de un material [15].

La forma más convencional y utilizada de la litografía es la fotolitografía. Esta técnica se utiliza mucho para el diseño de modelos en máscaras de capas delgadas y consiste en “imprimir” un patrón utilizando una máscara con el diseño sobre una base cubierta de un material sensible a luz de cierta longitud de onda [17]. Por esta razón se ha convertido en una de las técnicas de fabricación de moldes para dispositivos de microfluídica tradicionales y se ha desarrollado rápidamente.

Una vez que se obtiene el molde, es posible fabricar muchos microchips a partir de él utilizando distintos polímeros. El polidimetilsiloxano (PDMS), es el material típicamente utilizado para la construcción de dispositivos de microfluídica, ya que ofrece muchas ventajas, tales como, transparencia óptica, esto facilita mucho los análisis de los flujos dentro de los microdispositivos, permeabilidad de los gases lo cual permite la eliminación de burbujas de gas que podrían afectar los análisis y facilidad de uso vidrio [18].

Un proceso representativo para la fabricación de un microdispositivo para microfluídica está explicado a grandes rasgos, en la Figura 2.1. El paso 1, es tener una oblea de silicio. El paso 2, es cubrir la oblea con una fotoresina y luego exponerla a rayos UV utilizando una máscara con el diseño de los microcanales. El paso 3 es la obtención del microcanal mediante el revelado de la resina (quedan solamente impresos las partes expuestas a la luz UV). El paso 4 es el vaciado de PDMS al molde. Después de la polimerización, sigue el paso 5 en donde se quita el pedazo de PDMS donde se encuentra el microcanal. Finalmente el paso 6 consiste en pegar el PDMS en una placa de vidrio [18], lo cual forma finalmente los microcanales para microfluídica.

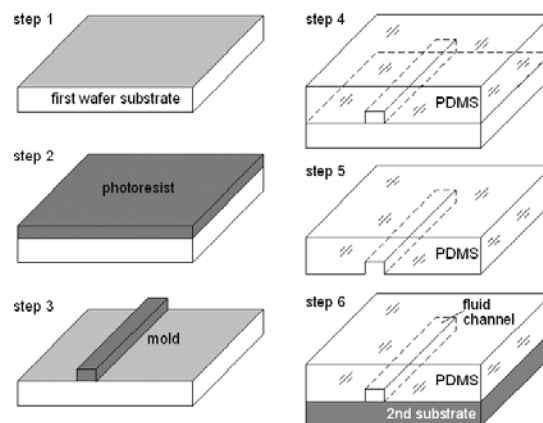


Figura 2.1 Procesos de fabricación de canales de microfluidos usando PDMS. Tomada de [18]

Una técnica nueva utilizada para la fabricación de moldes tridimensionales para microfluidos es a partir de láminas plásticas de Shrinky-Dinks. Estas láminas delgadas están fabricadas a base de poliestireno (PS), y tienen propiedades termoplásticas especiales que les permite reducir su tamaño y aumentar su espesor por acción de la temperatura. En la Figura 2.2 se aprecia una reducción de aproximadamente de 65% de tamaño del Shrinky-Dink y un aumento de aproximadamente nueve veces su espesor. Lo importante es también que la tinta de la que está

hecho el diseño reduce su tamaño y aumenta su espesor proporcionalmente, creando un molde de unas cuantas micras de alto.

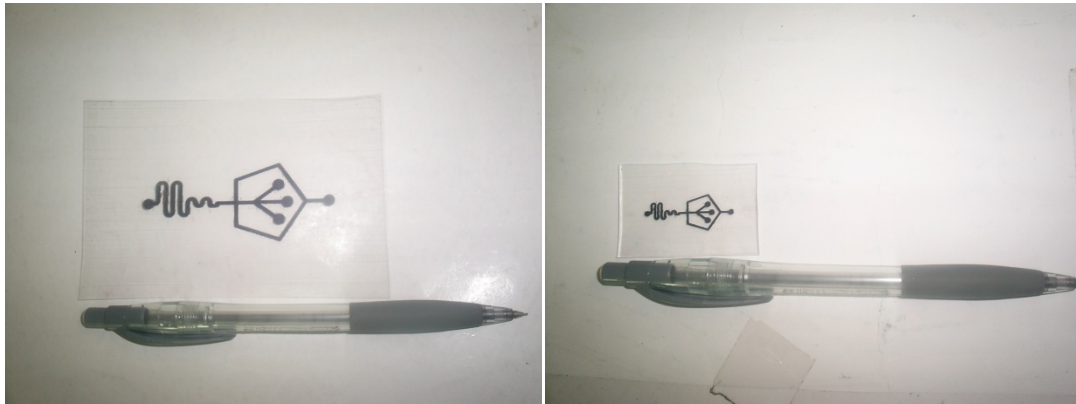


Figura 2.2 La primera imagen muestra un Shrinky–Dink con un diseño aplicado en este trabajo, antes de ser sometido a una temperatura de 280 °C. La segunda imagen es el molde ya reducido por efecto de la temperatura

Esta técnica es ampliamente utilizada para hacer frente al reto de construir dispositivos para microfluídica con canales redondeados y profundos de una manera económica sin necesidad de equipos sofisticados, ya que los Shrinky-Dinks, son comercialmente disponibles para ser usados en impresoras laser [19].

La referencia [19] dice: “Los Shrinky Dinks es un juguete para niños en el que uno puede hacer un dibujo y posteriormente, reducir su tamaño a una pequeña fracción de su tamaño original. Se encontró que después de calentar durante 3-5 minutos a 163 °C la impresión reduce su tamaño en 1/3 de su tamaño original”.

En este capítulo de la tesis se hace una comparación entre el método de Shrinky-Dinks y el método de fotolitografía suave para la construcción de moldes para microfluidos. Se establecieron ventajas y desventajas experimentales de cada método y se establecieron las características de construcción por los dos métodos.

2.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.2.1 DISEÑO DE MOLDES

- Se realizaron algunos diseños de microcanales utilizando los softwares Autocad 2011 y Corel Draw 5.0. Los diseños utilizados con la técnica de Shrinky-Dinks se realizaron a una escala 2.2 veces más grande que el tamaño requerido. Esto es porque se observó que los Shrinky-Dinks no se reducen en 1/3 del tamaño original, sino en aproximadamente 65%. Diseñando a una escala 2.2 veces mayor, los diseños se redujeron al tamaño requerido.

Los dibujos se realizaron en los dos programas de diseño, tal como se muestra en la Figura 2.3, con la finalidad de hacer una comparación en la eficiencia de cada programa.

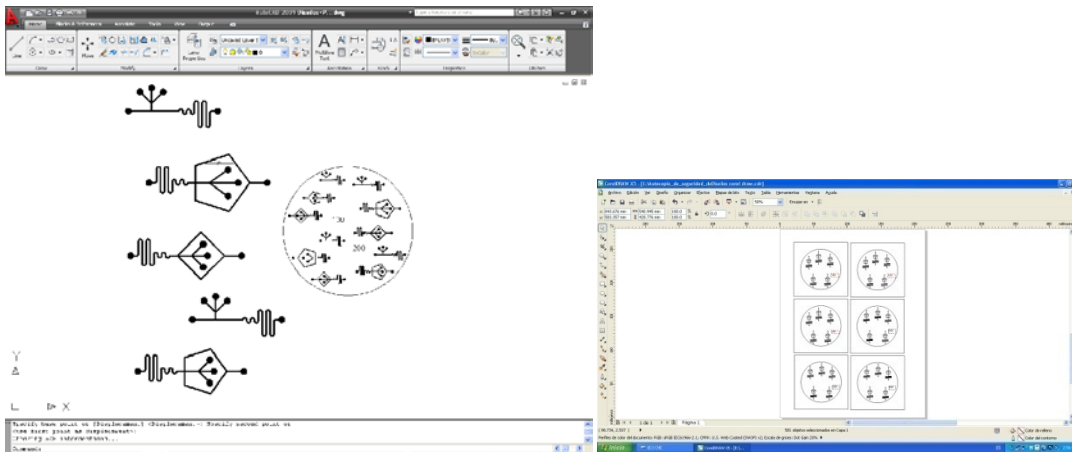


Figura 2.3 Diseño de microchips tanto para Shrinky-Dinks como para fotolitografía suave en AUTOCAD 2011 (Izquierda) y en Corel Draw 5.0 (Derecha)

2.2.2 METODOLOGÍA DE FABRICACIÓN DE MOLDES PARA MICROCHIPS CON SHRINKY-DINKS

- Después de haber realizado el diseño, este se imprimió directamente sobre un acetato de Shrinky-Dinks utilizando una impresora HP Color Laser 2500. El acetato impreso se volvió a introducir en la impresora para imprimir nuevamente el diseño y con esto ir aumentando el espesor de la tinta. Esto repercutió directamente en el espesor de los canales de los microchips. El procedimiento se repitió en 6 ocasiones y no más pues también entre mayor es la cantidad de impresiones hay un ensanchamiento de los diseños y muchos residuos de tinta alrededor. Por esta razón se procuró que a partir de la segunda impresión se colocara bien el acetato para que el diseño estuviera justo encima de la primera impresión.
- Se recortaron los diseños ya impresos en el acetato, procurando que sin importar la geometría del chip, la parte del acetato recortada que rodea el diseño quede completamente cuadrada (esto favorece a la reducción homogénea del Shrinky-Dink), y procurando que haya un margen de la parte recortada y del diseño de aproximadamente dos centímetros, como se muestra en la Figura 2.4.

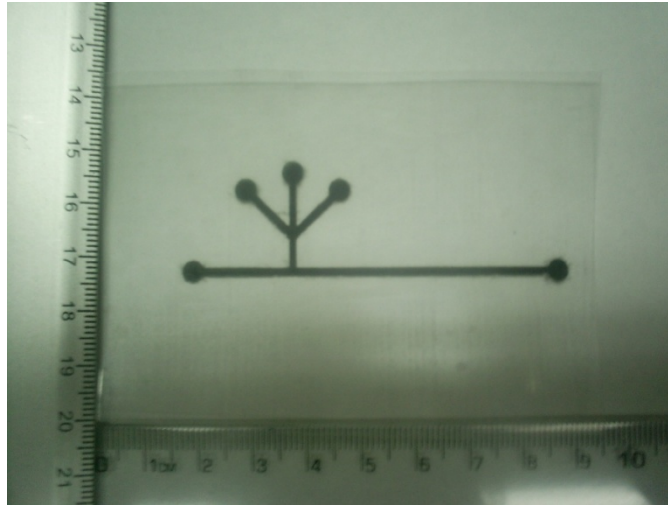


Figura 2.4 Figura de un Shrinky-Dink antes de reducir

- Después de imprimir y recortar los moldes, se realizó su limpieza de la siguiente manera:
 - Se preparó una mezcla de 13 ml de isopropanol grado analítico, y 7 ml de acetona químicamente pura (QP).
 - Se sumergió el Shrinky-Dink con el diseño dentro de la mezcla durante 5 minutos.
 - Posteriormente se dejó secar. Con un algodón sujetado por unas pinzas se limpiaron los residuos de tinta que quedan alrededor de los microcanales. Esto se hizo pasando el algodón repetidamente sobre la tinta. Se debe hacer de forma suave y cuidadosa para evitar que se vaya a desprender la tinta que forma parte de los microcanales. Esto se realizó con la misma mezcla.
 - Se enjuagó el acetato con abundante agua destilada.
 - Se secó el acetato con aire a presión y posteriormente se introdujo a la estufa a 70 °C durante 20 minutos con el objetivo de eliminar por completo la humedad del diseño.
- El acetato se introdujo en un horno como el que se muestra en la Figura 2.5, sobre un vidrio completamente limpio a una temperatura de 280°C. El tiempo dentro del horno es el que tarda el Srinky-Dink en reducirse por completo y que haya tomado una forma completamente plana. Después de algunas pruebas se observó que a esta temperatura, tarda aproximadamente entre 40 segundos y 1½ minutos en llegar a su estado reducido y plano. Se debe cuidar que no se empiece a deformar de las orillas el molde, esto sucede cuando ya ha pasado el tiempo suficiente y aún continúa en el horno, por lo que hay que retirarlo antes de que esto suceda.



Figura 2.5 Horno donde se introducen los Shrinky-Dinks para reducir, a 280°C

- Se retiró del horno el vidrio con el acetato ya reducido y se dejó enfriar durante 5 minutos. Como se muestra en la Figura 2.6, el acetato se redujo en un 65% tomando como base la medida de la Figura 2.4.

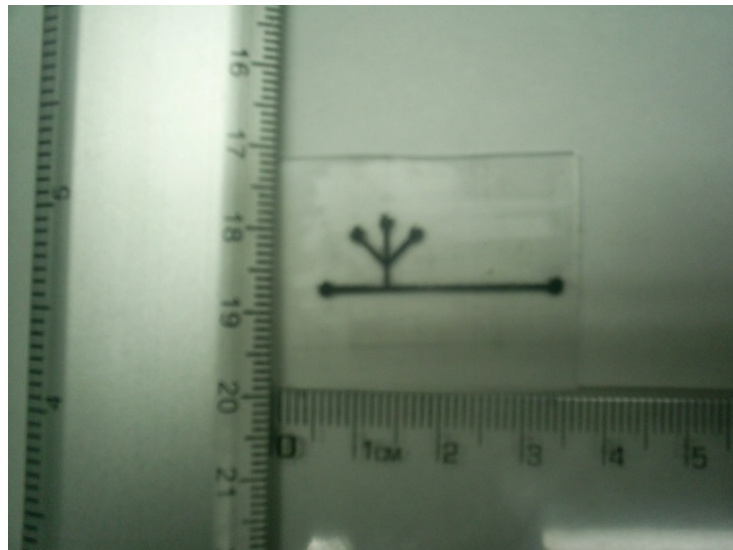


Figura 2.6 Figura de un Shrinky-Dink después de haber sido introducido al horno. Se aprecia de forma evidente la reducción del diseño con respecto a la figura 2.4

Cabe destacar que en la imagen no se aprecia el aumento de espesor del Shrinky-Dink, y lo cual es lo que determina la profundidad en los canales del microchip.

- Se introdujo el molde en agua destilada durante 15 minutos.
- Posteriormente se retiró del agua destilada y se introdujo en una caja de petri de plástico a una estufa a 70°C durante 30 minutos con el objetivo de retirar toda la humedad.

2.2.3 FABRICACIÓN DE MICROCHIPS

- Una vez contruidos los moldes para los microchips, se recubren del polímero polidimetilsiloxano. Esto se hace de la siguiente manera.
 - Se colocó un vaso desechable de plástico en una balanza analítica y se llevó a cero. Posteriormente se le agregaron 22 g de “Polidimetilsiloxano (PDMS)”(C_2H_6OSi)_n (SYLGARD 184 SILICONE ELASTOMER BASE). Esta cantidad es suficiente para cubrir una caja petri de 9 cm de diámetro con un espesor aproximado de 1.5 cm. De inmediato se llevó la balanza a cero nuevamente.
 - Se le adicionó agente curante (SYLGARD 184 SILICONE ELASTOMER CURING AGENT) en una proporción en peso para que el PDMS polimerice, pero mantenga su textura flexible.
 - Se mezcló perfectamente el PDMS y agente curante durante 15 minutos.
- Se colocó la mezcla de PDMS-Agente curante sobre un molde de microchip que está dentro de una caja petri.
- Se colocó la caja de petri cerrada, en un desecador procurando que quede lo mas derecha posible, se le conectó la bomba de vacío al desecador, y se encendió el vacío durante 6 minutos con la finalidad de eliminar las burbujas de aire.
- Se dejó la caja de petri dentro del desecador a vacío hasta que hubieron desaparecido todas las burbujas y el PDMS se vio completamente claro.
- Se retiró la caja petri y se introdujo a la estufa a 70°C, durante aproximadamente 24 horas para una completa polimerización.
- Mientras tanto se limpió el portaobjetos, sobre el cual se colocó más adelante el microchip polimerizado. La limpieza se realizó de la siguiente manera:
 - Se limpió el vidrio con abundante agua (no se usó jabón, para evitar que este deje residuos en el vidrio), y con un guante de nitrilo se talló un poco.
 - Posteriormente se limpió con acetona directamente de una piseta, procurando ya no tocar el vidrio, y se dejó secar.
 - Por último se enjuagó con abundante agua destilada para quitar todos los residuos que pudieran quedar de acetona.
 - Se secó con aire a presión.
 - Se introdujo a la estufa a 70°C durante 20 minutos para eliminar la humedad por completo.
 - Se introdujo el vidrio en ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado durante 24 horas.
 - Posteriormente se enjuagó el vidrio con abundante agua destilada.
 - Se secó el vidrio con nitrógeno (N_2).
 - Se introdujeron en la estufa a 70 °C para eliminar por completo la humedad.

- Cuando el PDMS hubo polimerizado completamente, se recortó con un bisturí de forma muy cuidadosa, evitando pasar el bisturí por encima del diseño.
- Ya que este es el primer PDMS que se retiró, contiene una cantidad muy grande de tinta, que no permite el óptimo funcionamiento del microchip, por lo que este se desecha.
- Se volvió a preparar PDMS con la misma técnica antes mencionada y se colocó por segunda ocasión encima del molde (se consideró que ya no se necesita tanto PDMS para la parte del molde, por lo que se prepararon 10 g para el diseño).
- De la misma forma se vertió el PDMS encima del diseño y se realiza lo mismo que la vez anterior.
- Se recortó nuevamente el PDMS, cuidando de no pasar el bisturí por encima del diseño.
- Se colocó el PDMS en una caja de petri de vidrio (Previamente enjuagada con agua destilada y seca en la estufa a 70 °C, durante 20 minutos), con la parte del PDMS donde se encuentran los canales hacia arriba.
- Con un sacabocados de 0.75 mm de diámetro se perforó cuidadosamente en las entradas de los microcanales en donde se conectarán las mangueras que traen los flujos de las diferentes sustancias. Hay que retirar de forma cuidadosa los pedacitos de PDMS que salen de la perforación con pinzas.
- Se colocaron tanto el portaobjetos de vidrio limpio como el PDMS, con los canales hacia arriba, en una placa de metal perteneciente a un horno de plasma.
- Se introdujo la placa con el PDMS y el vidrio al horno de plasma y este se puso en operación de la siguiente manera:
 - Se encendió la fuente de poder a la que está conectada el horno de plasma.
 - Se encendió el horno de plasma.
 - Se colocó la tapa accionando el vacío, hasta que el reloj de operación se prende. Después de 30 segundos de que se encendió el reloj, se permite la entrada del oxígeno (O₂) a 0.5 bar a un flujo de 7.958 ml min⁻¹.
 - Después de 1 minuto de que se dejó entrar el gas se puso en operación el equipo, para activar las superficies del PDMS y del vidrio. Se operó durante 0.3 minutos a 35 Watts.

Cabe destacar que se realizaron pruebas con el plasma utilizando como gas aire de la atmósfera u oxígeno puro. En el primer caso se observó un plasma color violeta como el que se muestra en la fotografía de la izquierda de la Figura 2.7. De la misma forma, utilizando O₂ puro como gas generador del plasma, se observó un plasma más transparente como se muestra a la derecha de la Figura 2.7.



Figura 2.7 Funcionamiento del plasma utilizando como gas generador aire de la atmósfera creando un plasma color morado (Izquierda). Plasma generado utilizando como gas generador O₂ puro, (Derecha)

Se observa una clara diferencia en el plasma formado dependiendo de qué gas se haya utilizando para generarlo. Revisando la literatura [20] se encontró que el color “blanquesino” generado por el plasma utilizando O₂ puro, representa un plasma con mejor eficiencia al momento de pegar los microchips, por lo que se ocupó plasma con este gas.

- Después de que se apagó el equipo, se activó la ventilación para poder retirar la placa.
- Se retiró la placa y de inmediato con ayuda de pinzas se puso el PDMS (del lado de la superficie activada) sobre el vidrio, de forma cuidadosa, y se presiona de forma ligera para retirar el aire que quede entre el PDMS y el vidrio.
- El Microchip se dejó reposar durante 24 horas a 70°C en la incubadora, y posteriormente con ayuda de unas pinzas se verificó el correcto pegado del PDMS al vidrio para tener el microchip listo para funcionar tal como se observa en la Figura 2.8.



Figura 2.8 Microchip terminado, listo para ponerse en funcionamiento

2.2.4 METODOLOGÍA DE FABRICACIÓN DE MOLDES PARA MICROCHIPS POR FOTOLITOGRAFÍA SUAVE

- Las máscaras se imprimieron en negativo sobre acetatos tamaño carta en la empresa GRUPO GRAFISCANNER ADISA®.
- A continuación se recortaron las máscaras impresas en negativo, como se muestra en la Figura 2.9.



Figura 2.9 Máscaras con diseños en negativo recortadas

- Primeramente se programó el spin coater, el cual es un equipo especialmente construido para la fabricación de moldes para sistemas microfluidicos construidos a partir de fotolitografía suave. Sirve para colocar en las obleas de silicio la fotoresina y ya que gira a diferentes revoluciones por minuto, la fotoresina SU-8 puede quedar a diferentes espesores, teniendo microcanales de diferentes espesores. La Tabla 2.1, muestra las diferentes combinaciones en la programación del equipo, a las que se depositó la fotoresina SU-8 en obleas de silicio.

Tabla 2.1 Diferentes velocidades y tiempos a las que se depositó la resina SU-8 en obleas de silicio

Prueba	Step 1	Step 2
1	8 segundos a 200 rpm	20 segundos a 550 rpm
2	10 segundos a 200 rpm	30 segundos a 450 rpm
3	10 segundos a 500 rpm	30 segundos a 650 rpm
4	10 segundos a 500 rpm	40 segundos a 650 rpm

Cabe señalar que en la segunda prueba no se logró un resultado satisfactorio, observando que por la baja velocidad del spin coater no se logra que la resina SU-8 se expanda de manera uniforme en la placa de silicio. Las condiciones de la prueba 4 fueron las que se utilizaron para fabricar los moldes que posteriormente se caracterizaron.



Figura 2.10a. Panel de control del spin coater. Figura 2.10b. Colocación de la resina en la oblea

- Se colocó la fotoresina SU-8, en un recipiente teniendo cuidado de no contaminarla.
- Se puso la oblea de silicio en el spin coater con ayuda de vacío. Se le colocó la fotoresina SU-8 en el centro de la oblea (aprox. 4 mL) y se hace trabajar el equipo.
- Se colocó la oblea con resina en una parrilla a 65°C, durante 5 minutos, y posteriormente a 95 °C durante 15 minutos, (Figura 2.11).



Figura 2.11 Oblea de silicio con SU-8 en parrilla a 95°C

- Se dejó enfriar, y posteriormente se colocó en la placa de la fuente de luz UV colimada, se le colocó la máscara de negativo encima al centro de la oblea, y se expone a rayos UV durante 30 segundos.

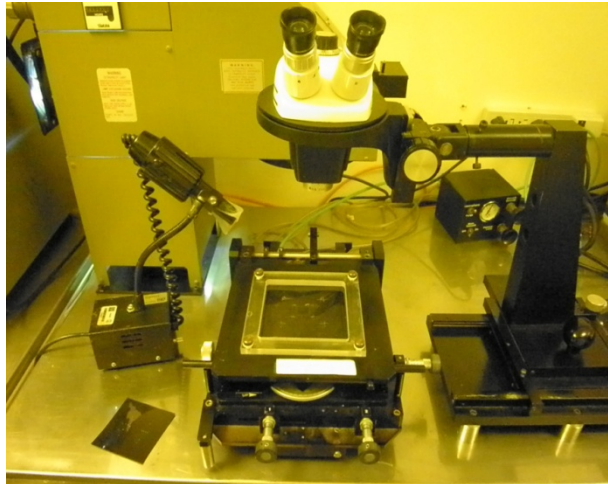


Figura 2.12 Fuente de luz UV colimada

- Se volvió a colocar en la parrilla durante 5 minutos a 65 °C, y posteriormente a 95 °C durante 1 minuto para evitar un choque térmico.
- Se colocó la oblea en líquido revelador de SU-8 para retirar la fotoresina que no se expuso al UV, durante 6-10 minutos, y posteriormente se enjuagó con isopropanol de forma abundante (Esto se hace hasta que el revelador ya haya quitado por completo la resina no fotopolimerizada).

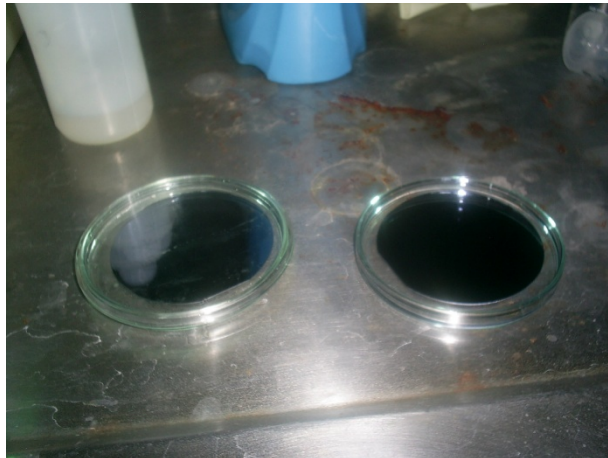


Figura 2.13 Oblea en revelador y posteriormente en isopropanol

- Con ese último procedimiento se tiene listo el molde y se puede continuar el proceso de elaboración del microchip.
- Se colocó la oblea de silicio en una caja petri de plástico y se procedió a cubrirla de PDMS realizando el mismo procedimiento de fabricación, que el propuesto en la fabricación de microchips por el método de Shrinky-Dinks, a excepción de la parte en que se desecha el primer dispositivo, ya que en esta ocasión no hay residuos de tinta en el polímero y se

puede utilizar desde el primer molde. De la misma forma se horadaron los microchips con un sacabocados.

- Posteriormente se introduce el microchip en el horno de plasma a las mismas condiciones ya establecidas.



Figura 2.14 Microchip construido por el método de fotolitografía suave

2.3 RESULTADOS

2.3.1 LIMITES DE CONSTRUCCIÓN DE LOS MOLDES PARA MICROCHIPS POR LAS TECNICAS DE SHRINKY-DINKS Y FOTOLITOGRAFIA SUAVE

Después de analizar algunas de las características de los diseños que se realizaron con los dos diferentes métodos de construcción (Shrinky-Dinks y fotolitografía suave) y con los dos programas de diseño (Autocad 2011 y Corel Draw 5.0), se observó que existe un porcentaje de error en la construcción de microcanales, debido principalmente a causa de dos razones. En el caso de los microchips construidos con Shrinky-Dinks, la resolución de la impresora utilizada, no es suficiente para que después de reducir los chips, se llegue a tamaños de los canales menores de $257\ \mu\text{m}$. En la Figura 2.15 se muestran los microcanales diseñados con Autocad 2011 impresos en Shrinky dinks (reducidos), se observa que es muy diferente el tamaño real con el diseñado.

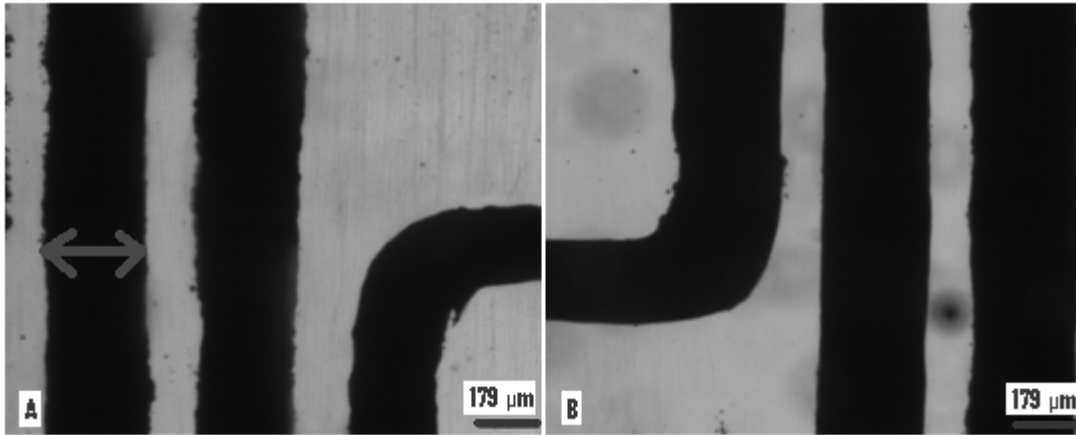


Figura 2.15a Se muestra el ancho de los canales de un Shrinky-Dink (molde), el cual fue diseñado a $1\mu\text{m}$ (utilizando el software: Autocad 2011). En la figura 2.15b, se muestra el ancho de los canales de un shrinky-Dink, el cual fue diseñado a $10\mu\text{m}$ (utilizando el software: Autocad 2011). Se puede ver que es casi nula la diferencia en el ancho de estos dos canales

En la tabla 2.2 se muestran los valores de los tamaños a lo que se diseñaron los chips en el software Autocad 2011 (Tamaño teórico), y se muestran también el ancho experimental de los microcanales después de pasarlos seis veces por la impresora y luego reducir los chips. Se observa que la diferencia entre dichos valores es muy grande y va aumentando conforme va disminuyendo el tamaño del diseño. Para obtener el tamaño de los microcanales se utilizó un vernier electrónico y se tomó una medida de un molde ya reducido que teóricamente debería ser de $400\mu\text{m}$, obteniendo una medida de $1315\mu\text{m}$. Posteriormente se colocó el molde en un microscopio con un objetivo de 4x, se tomó una fotografía del ancho del canal con una cámara digital instalada en el microscopio, obteniendo un ancho de los canales en la pantalla de la computadora y estableciendo una relación entre el tamaño obtenido en la pantalla y el tamaño obtenido del vernier. Posteriormente se establecieron relaciones lineales para determinar con el microscopio el tamaño de los canales más pequeños utilizando esta relación. Los resultados muestran que se pierde mucho la escala por cuestiones de la resolución de la impresora, ya que los canales diseñados a $1200\mu\text{m}$ antes de reducirse tenían un ancho de aproximadamente $2120\mu\text{m}$, y el que se diseñó a $300\mu\text{m}$ para una reducción teórica de $100\mu\text{m}$, se observó que tienen un ancho antes de reducirse de $822\mu\text{m}$. También hay que recordar que los diseños se pasan en 6 ocasiones en la impresora para que los canales queden más profundos, pero esto afecta también el ancho de los canales.

Tabla 2.2 Ancho de canales para Shrinky-Dinks determinado con un microscopio (objetivo 4x), con 6 pasadas en la impresora

Tamaño teórico (μm)	Tamaño esperado de reducción(μm)	Tamaño en pantalla de los chips después de ser reducidos (cm)	Tamaño experimental de chips reducidos (μm)
3	1	5	299
30	10	5.2	311
90	30	6.2	371
150	50	7	418
240	80	8.5	508
300	100	8.5	508
600	200	13.3	795
900	300	17.5	1046
1200	400	22	1315

Con respecto a los microchips construidos en fotolitografía suave cabe señalar que para hacer la impresión de los negativos, fue necesario convertir el archivo diseñado en Autocad 2011 a formato PDF; y este es el paso donde se pierde la escala correcta de diseño, ya que no se hace una correcta conversión en cuestión de medidas de Autocad 2011 a PDF, como se muestra en la Figura 2.16.

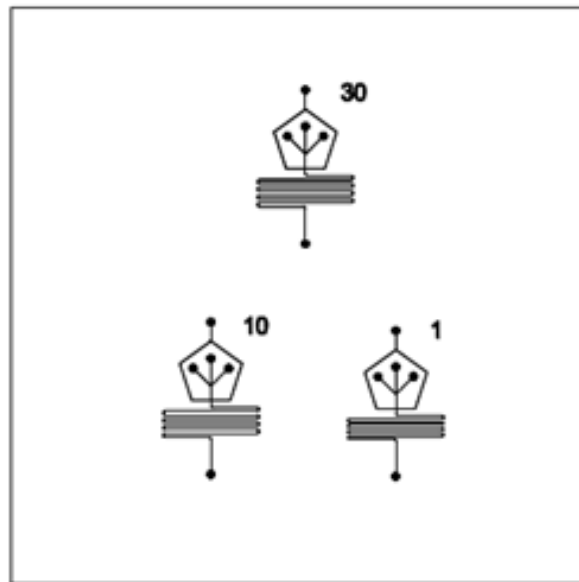


Figura 2.16 Se muestran los diseños a un ancho de 1 μm , 10 μm y 30 μm , diseñados en Autocad 2011 ya transformados en formato PDF y se observa que ya son prácticamente del mismo ancho

A consecuencia de este error presentado en el cambio de formato se observó que no sería posible construir microchips con canales con un ancho inferior a los 209 μm si se utilizaba el software Autocad 2011.

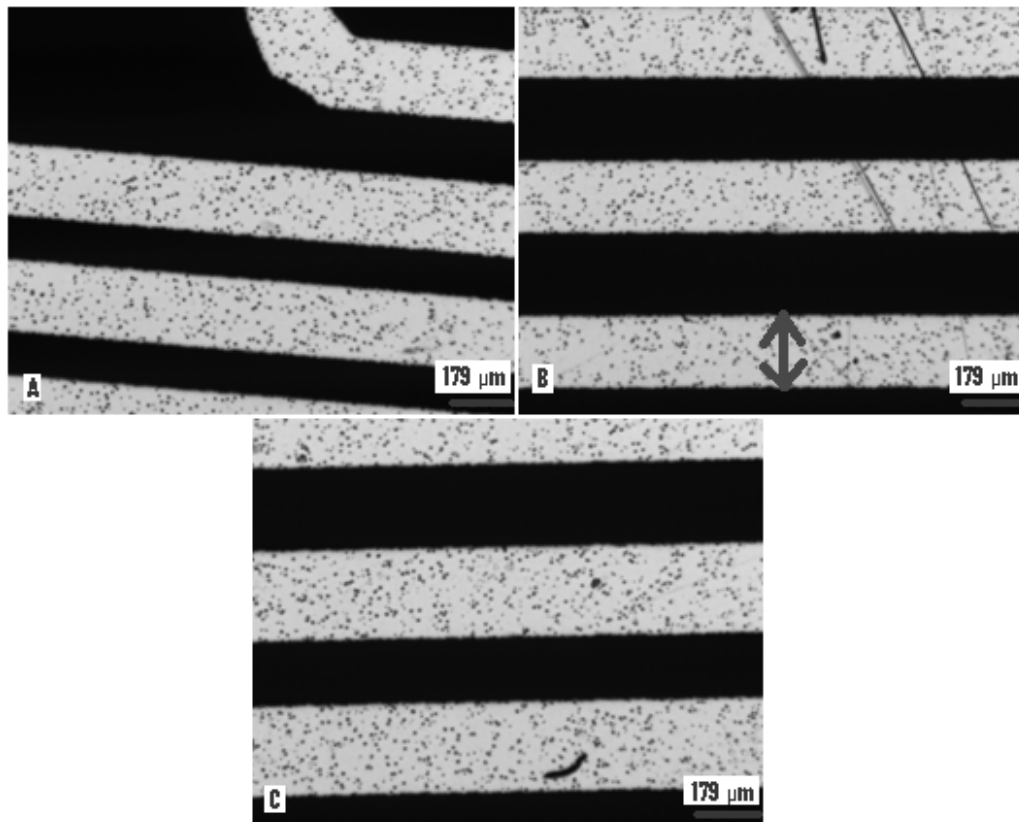


Figura 2.17a. Muestra el ancho real de los diseños en los negativos diseñados con el software Autocad 2011 a 1 μm de ancho. La figura 2.17b. Muestra el ancho real de los canales en el diseño a 10 μm . La figura 2.17c muestra los el ancho real de los canales en el diseño a 30 μm . Con estas imágenes se puede determinar que es en la conversión al formato de archivo PDF cuando se pierde la escala correcta de los diseños

En la tabla 2.3 se puede observar el error que se generó en el método de fotolitografía suave diseñado en Autocad 2011. Para esto se utilizó como base, la medida de la computadora antes obtenida con el vernier en el Shrinky-Dink, y obteniendo el tamaño de los canales por las medidas de la computadora.

Tabla 2.3 Ancho de canales en máscaras para fotolitografía suave con objetivo de 4x

Tamaño teórico (μm)	Tamaño en pantalla (cm)	Tamaño real (μm)
1	3.5	209
10	3.6	215
30	4.2	251
50	4.4	263
80	4.6	275
100	5.2	311
200	7.3	436
300	8.2	490
400	9.9	592

Por último con respecto a los microchips fabricados por el método de Fotolitografía Suave, se imprimieron mascarar (negativos) de los microchips diseñados con Corel Draw 5.0. Después de analizar los resultados, se observó que utilizar este software favorece en gran manera para obtener mejores resultados, ya que el porcentaje de error entre el diseño y el tamaño real es más pequeño. Además, la tendencia fue que los canales resultan ligeramente menores que el diseño (Figura 2.18), a diferencia de las otras dos técnicas en las que los canales resultaban mucho mayores que el diseño.

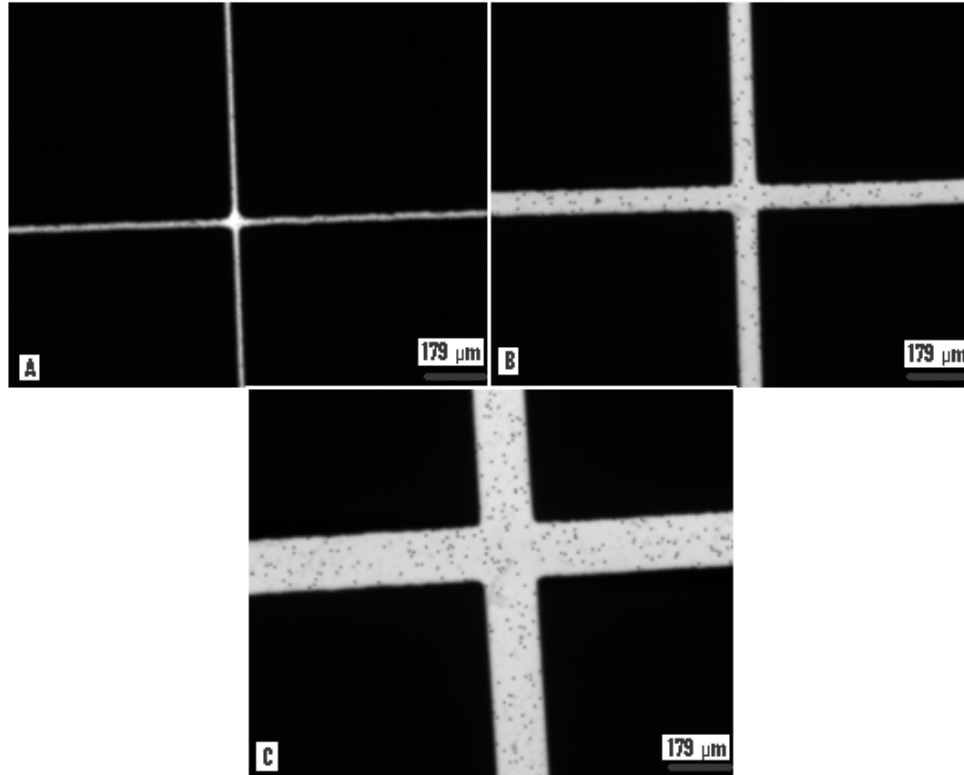


Figura 2.18a Muestra el ancho real de los diseños en negativo a 50 μm , la figura 2.18b muestra el ancho real de los canales a 100 μm y la figura 2.18c, muestra el ancho real de los canales a 200 μm . Se observa, una diferencia entre el ancho de los canales, ya que se mantiene mucho mas la escala real de los diseños

A continuación, en la tabla 2.4, se muestra el error generado en la técnica de fotolitografía suave diseñado en Corel Draw 5.0, el cual es un error mucho menor al de las otras dos técnicas.

Tabla 2.4 Ancho de canales en máscaras para fotolitografía suave con objetivo de 4x diseñados con Corel Draw 5.0

Tamaño teórico (μm)	Tamaño en pantalla (cm)	Tamaño real (μm)	Error (%)
50	0.4	33.9	32.5
100	1.2	91.7	8.3
200	2.7	181.3	9.35
300	4.1	245	18.34
400	5.4	322.7	19.5

Con las mascararas diseñadas a 100 y 200 μm se fabricaron los moldes.

2.3.2 RESULTADOS DE LAS MEDIDAS EXACTAS DE LOS MICROCHIPS

A partir de los moldes reducidos de Shrinky-Dinks y de los moldes obtenidos por fotolitografía suave, se fabricaron microchips en PDMS. Después se realizaron mediciones de los microcanales, con el propósito de tener el porcentaje de error en el tamaño de los canales con respecto al diseño.

La caracterización de la profundidad y del ancho de los canales se realizó con un interferómetro óptico Polytec MSA-40, Microsystems Analyzer, equipo que se muestra en la Figura 2.19

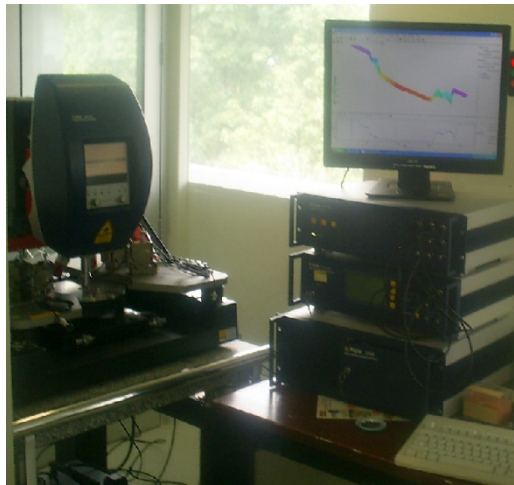


Figura 2.19 Equipo Polytec MSA-40, Microsystems Analyzer, ubicado en el Laboratorio de Caracterización y pruebas, en el Edificio UNAMems de la Facultad de Ingeniería y usando el modo de TMS (Tophography Measurement System), para caracterización de microcanales en microdispositivos

A continuación, se muestran las características de varios canales diseñados en Autocad 2011 y Corel Draw 5.0 utilizando la técnica de Shrinky-Dinks y de fotolitografía suave, las cuales se obtuvieron con ayuda de este equipo.

Las siguientes imágenes que representan los perfiles dados por el Polytec. Dichos perfiles muestran tanto la profundidad como el ancho real de los microcanales. Además de la forma real de estos y las imperfecciones de rugosidad que existen en los microcanales.

Estos perfiles representan a los diseños seleccionados tanto de Shrinky-Dinks como de fotolitografía suave, cuyos moldes se construyeron a través de la prueba 4 de la Tabla 2.1

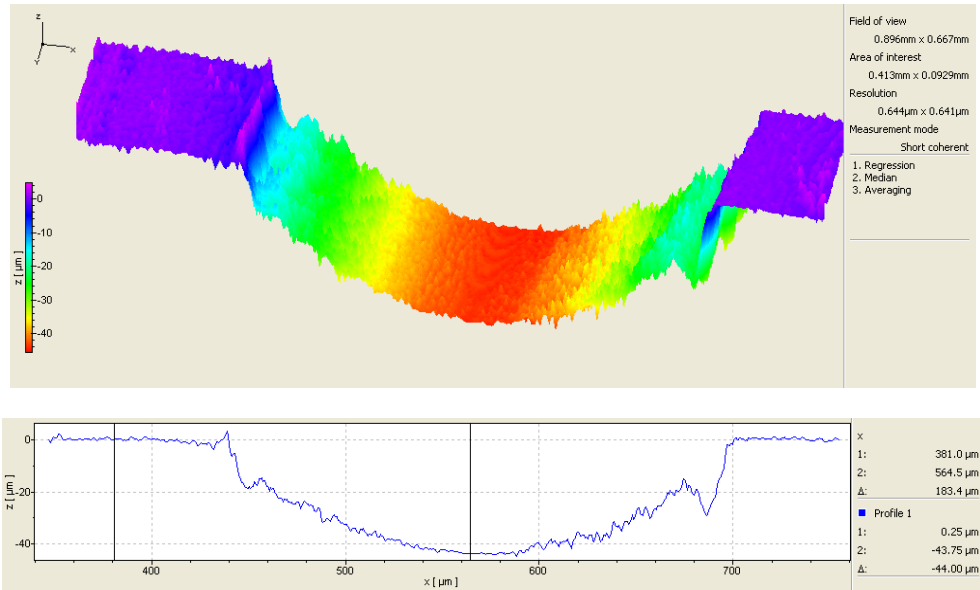


Figura 2.20 Microcanal construido con la técnica de Shrinky-Dinks, utilizando el programa de diseño Autocad 2011 con un ancho teórico de canales de 1 μm. Se muestra que el canal en realidad tiene un ancho de 256.8 μm y una profundidad de 43.15 μm

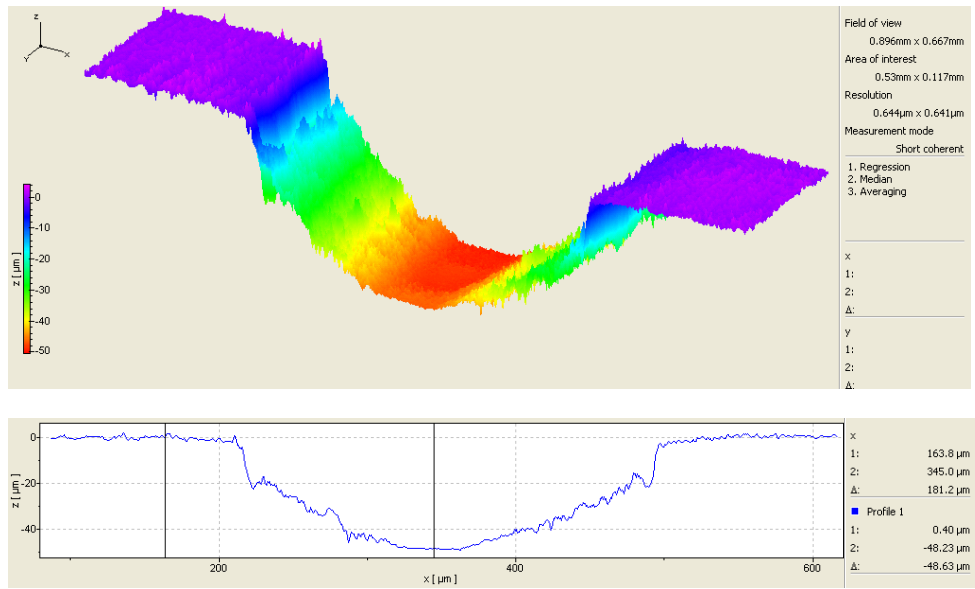


Figura 2.21 Microcanal construido con la técnica de Shrinky-Dinks, utilizando el programa de diseño Autocad 2011 con un ancho de canales en el diseño de 10 μm. Se muestra que el canal en realidad tiene un ancho de 284.5 μm y una profundidad de 49.07 μm

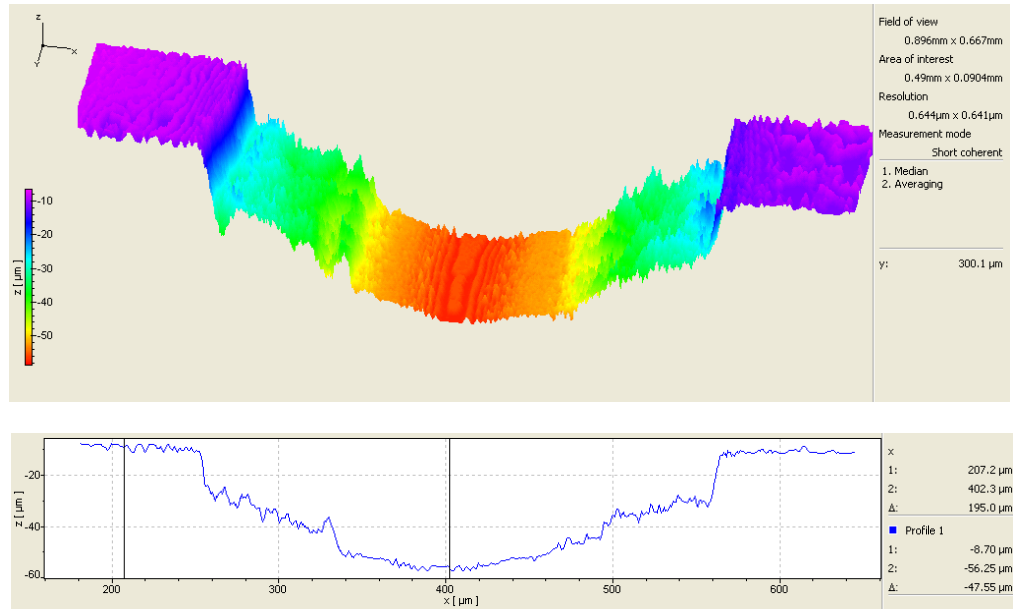


Figura 2.22 Microcanal construido con la técnica de Shrinky-Dinks, utilizando el programa de diseño Corel Draw X5, diseñado teóricamente con un ancho de canales de 200 μm. Se muestra que en realidad tiene un ancho de canales de 314 μm y una profundidad de 47.55 μm

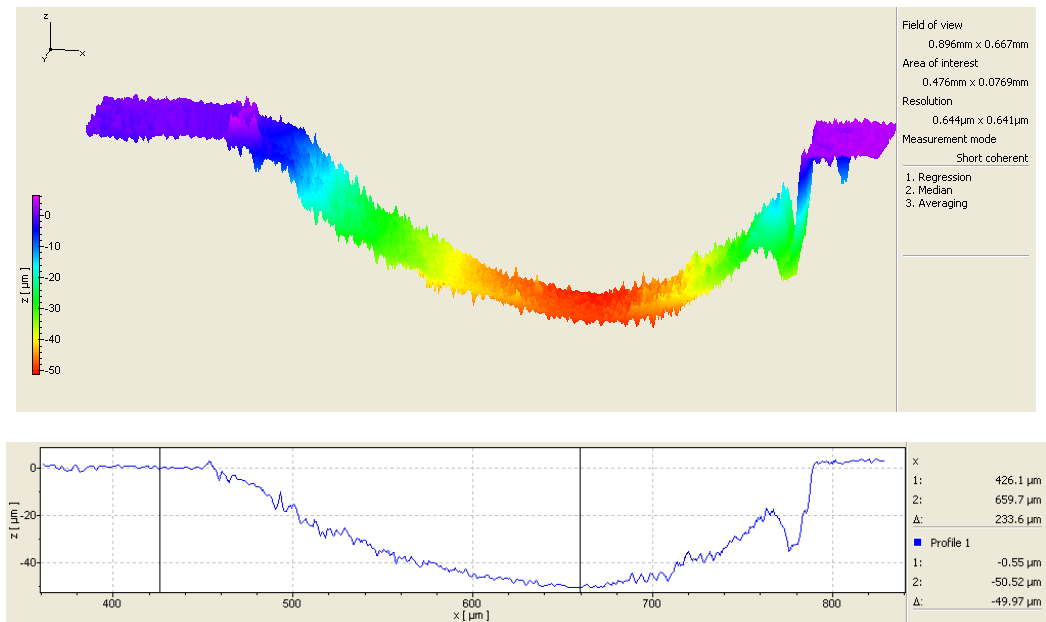


Figura 2.23 Microcanal construido con la técnica de Shrinky-Dinks, utilizando el programa de Corel Draw X5 con un ancho teórico de 100 μm. Se muestra que en realidad los canales tienen un ancho de 337 μm y una profundidad de 49.97 μm

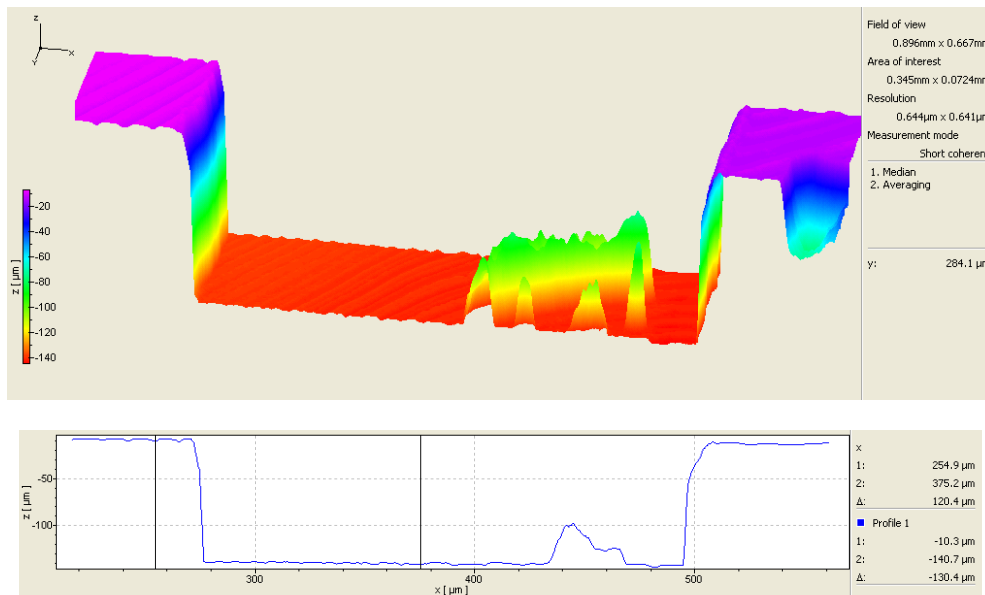


Figura 2.24 Microcanal construido con la técnica de fotolitografía suave, utilizando el programa de diseño Autocad 2011 con un ancho teórico de canales de 1 μm. Se muestra que en realidad los canales tienen un ancho de 234.3 μm y una profundidad de 130.1 μm

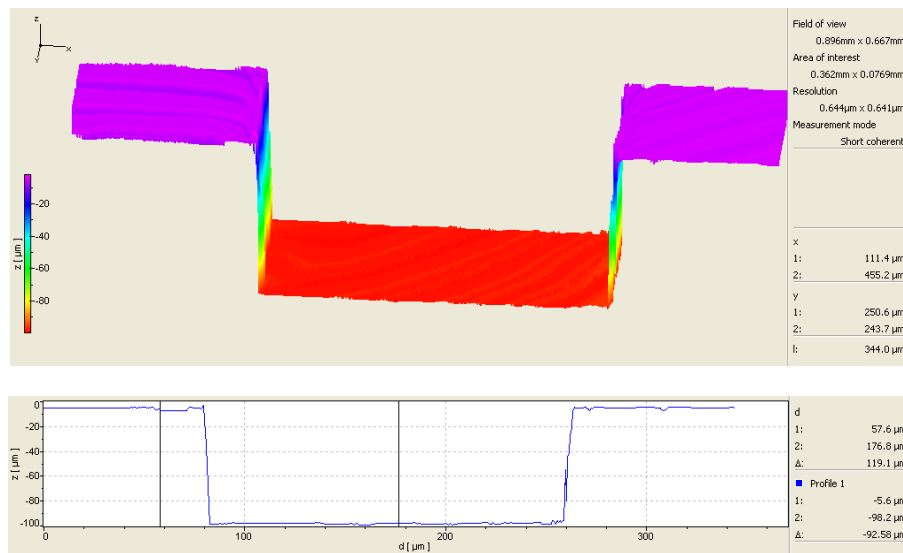


Figura 2.25 Microcanal construido con la técnica de fotolitografía suave, utilizando el programa de diseño Corel Draw X5 con un ancho teórico de canales de 200 μm. Se muestra que en realidad los canales tienen un ancho de 185 μm y una profundidad de 119.1 μm.

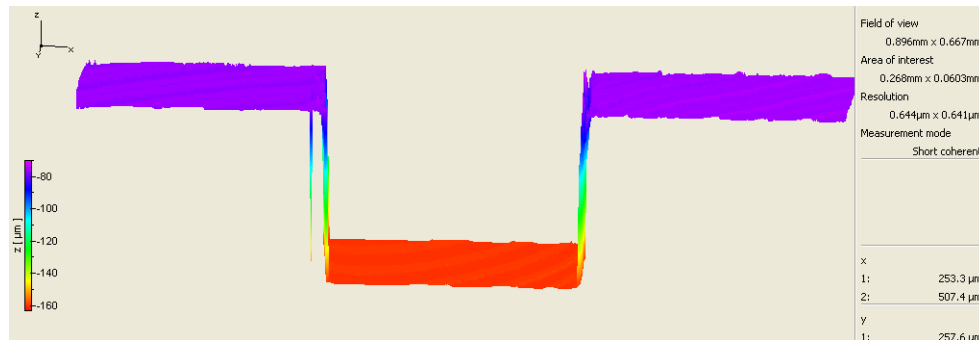


Figura 2.26 Microcanal construido con la técnica de fotolitografía suave, utilizando el programa de diseño Corel Draw X5 con un ancho teórico de canales de 100 μm . Se muestra que en realidad los canales tienen un ancho de 91.6 μm y una profundidad de 82.46 μm .

2.4 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Después de observar las graficas de los perfiles de los canales fabricados por Shrinky-Dinks, se aprecia que es posible utilizar tanto el software Corel Draw X5 como Autocad 2011 para diseñar los microchips. Sin embargo, es más recomendable utilizar el Autocad 2011, ya que se adapta bien a los límites de diseño (entre 257 μm y lo necesario), ya que en el caso de estos dispositivos si se intenta diseñar en dimensiones menores, (200 μm) empieza a haber demasiados problemas con la impresión, los canales se empiezan a pegar, es decir, quedan tan juntos que al momento en que se reducen se pegan, por lo que en el caso de los microchips fabricados con Shrinky-Dinks el límite es de aproximadamente 256.8 μm de ancho

Después de observar las graficas de los perfiles de los canales fabricados por litografía suave, se observa que el programa de diseño que mejores resultados ofrece es el Corel Draw 5.0, ya que se aprecia un menor porcentaje de error entre el tamaño real de los microcanales y el tamaño de diseño. Además, el error es con tendencia a que en el negativo los microcanales sean más delgados que en el diseño original, lo cual es menos perjudicial, y hasta cierto punto puede beneficiar cuando se desea un consumo menor de reactivos. Cabe mencionar también que el microchip con canales más delgados que se logró fabricar fue de 91.6 μm . Es difícil llegar a tener canales más delgados, ya que si se diseña en Corel Draw X5 a dimensiones más pequeñas, las máscaras, empiezan a verse con defectos, como se observa en la Figura 2.18. En ella se aprecia como en el canal diseñado a 50 μm , son muy notorias las imperfecciones de las paredes, ya que la impresora que se utiliza no tiene la definición suficiente. Con respecto a los diseños con Autocad 2011, se observa que el límite de fabricación es de 209 μm debido a que la impresión no acepta el formato de Autocad y hay que cambiar los archivos a PDF.

Después de analizar los resultados obtenidos, se aprecia que la construcción de microchips por medio de Shrinky-Dinks, es una técnica que presenta ciertas desventajas, en gran parte del proceso, ya que se observa que el tamaño del microchip está muy lejano al tamaño del diseño

original, ofreciendo un límite relativamente grande para este trabajo (256.8 μm). También se presenta el problema de la calidad de los canales, ya que en primera instancia se imprimen con muchos residuos de tinta que hay que eliminar, y eliminarla por completo es muy difícil, además de que los canales no tienen paredes completamente rectas y parejas (ver figura 2.25 y 2.22 para observar la diferencia), por lo que las gotas pueden tender a no ser muy estables en frecuencia y tamaño.

Sin embargo, los Shrinky-Dinks tienen algunas características muy ventajosas, como, que su fabricación es muy sencilla y rápida, además que de que los equipos utilizados no son muy complejos ni costosos, por lo que en general es un proceso bastante económico

Otra ventaja que se observa es que la profundidad de los canales salió bastante pareja, mientras que para los de fotolitografía suave se presentó una variación mayor en la profundidad de los microcanales.

Con respecto a la construcción de microchips por fotolitografía suave, se observa que es una técnica en la cual se necesitan varios equipos sofisticados además de condiciones muy complejas para su construcción. También son necesarios materiales relativamente costosos, por lo que es un proceso más caro que el de Shrinky Dinks.

Además, en esta técnica hay que ser muy preciso con el manejo de todos los equipos y sustancias, en particular de la fotoresina, ya que se puede observar que a pesar de que se manejó el mismo procedimiento en los dos microchips construidos con fotolitografía suave, la profundidad de estos varió hasta en un 36 % de un diseño a otro a pesar de haber usado el mismo programa en el spin coater. Este resultado puede deberse a diferencias en la temperatura de la resina lo cual cambia su viscosidad. Esto hace que está técnica represente un problema de reproducibilidad. Cabe señalar que en el caso de los Shrinky-Dinks el porcentaje de variación de la profundidad de los canales es de hasta 14 %.

Sin embargo, en cuestiones experimentales, la fotolitografía ofrece muchas ventajas, puesto que ofrece mucha más precisión y exactitud, ya que se respeta el tamaño requerido del microchip, y el ancho de los canales no pierden tanto su proporción original. Con esta técnica las paredes de los microcanales son muy rectas y parejas, esto beneficia en que tanto la frecuencia como el tamaño de las gotas son muy estables, además de que el volumen de estas es menor a las gotas generadas por Shrinky-Dinks, por lo que hay un ahorro de reactivos necesarios.

2.5 CONCLUSIONES

Como conclusión se puede decir que las dos técnicas funcionaron para la construcción de microchips. Cuando es necesario tener un microdispositivo de forma rápida y no se cuenta con un gran presupuesto y condiciones para realizar fotolitografía suave, así como cuando no se tiene mucho tiempo para la construcción los Shrinky-Dinks son una técnica muy recomendable. Cuando se tienen las condiciones y recursos para construir microchips por fotolitografía suave, recomiendo usar esta técnica pues se dan mejores resultados. Y cuando se necesitan hacer análisis cuantitativos donde es necesario ser muy preciso y exacto es recomendable esta técnica.

CAPÍTULO 3. TRATAMIENTO CON PLASMA

3.1 CONDICIONES ÓPTIMAS PARA EL TRATAMIENTO CON PLASMA

En el capítulo anterior se mencionó que como último paso en la fabricación de los microchips hay que sellar (pegar) los microcanales de PDMS a un portaobjetos de vidrio. Sin embargo, dado que la reacción de plasma para el pegado del microchip, no se estaba llevando adecuadamente, se decidió hacer una serie de pruebas para encontrar las condiciones óptimas de operación del equipo. A continuación se describe brevemente que es el plasma y sus características y después los experimentos realizados para obtener condiciones de pegado óptimas.

La palabra PLASMA se utilizó primeramente para designar al componente líquido e incoloro de la sangre, la leche y los tejidos vivos, y fueron los fisiólogos los que acuñaron el término. En 1923 algunos físicos emplearon el término para describir un singular estado de un gas ionizado. Desde este momento a pesar del desacuerdo de los biólogos, ya no se dejó de ocupar en las Ciencias Físicas [21].

Por lo tanto se puede definir al plasma como a la mezcla de partículas cargadas eléctricamente en la que la carga total negativa es igual a la carga total positiva. Por esta razón el plasma es un medio eléctricamente neutro que conduce perfectamente la corriente eléctrica [21].

Hay que señalar que el plasma emite luz, con la característica de que el color de la luz emitida depende del gas utilizado para la generación del plasma [21]. En la Figura 3.1 se aprecia en la primera imagen plasma generado con helio el cual da un color verde-azul. La segunda imagen muestra el plasma generado con aire de la atmósfera generando un color morado-rosa y la tercera imagen que muestra el plasma generado con oxígeno puro produciendo un color azul-morado.

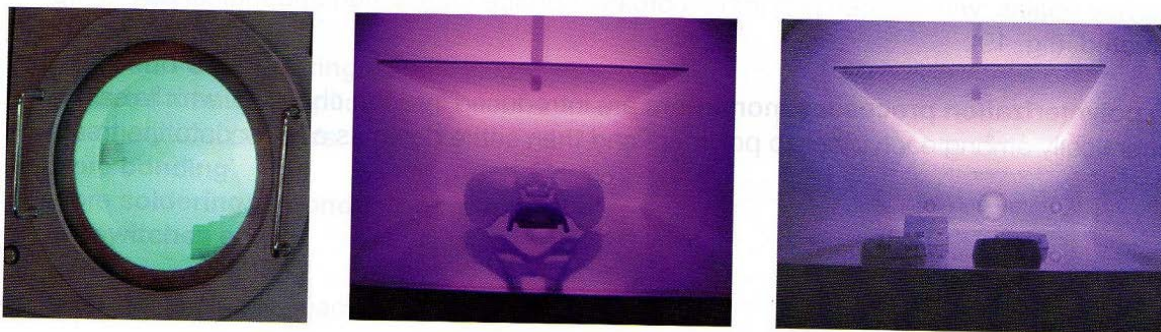


Figura 3.1 Plasma generado por 3 gases diferentes, con helio, aire y oxígeno puro. Tomadas de [22]

El plasma se encuentra en la naturaleza en un rayo, en la aurora boreal y en los rayos del sol. De forma artificial, el plasma se genera en tubos de neón, linternas, etc. [22].

3.1.1 PROPIEDADES TERMODINÁMICAS DEL PLASMA

En el plasma las partículas cargadas negativamente (electrones) colisionan con una molécula de gas residual. Dicha molécula libera un electrón y se convierte en un ión cargado positivamente por lo que se mueve al cátodo. El electrón se mueve hacia el ánodo encontrándose más moléculas y este proceso continúa hasta que el gas está completamente ionizado [22]. En este momento se puede concluir que el gas está en completo estado de equilibrio termodinámico [21].

En la Figura 3.2, se muestra cómo actúa el plasma sobre las moléculas de una superficie, desprendiendo los electrones de las moléculas, dejando radicales libres para reacciones con electrones de otra molécula. Por ejemplo, en este trabajo el plasma desprende los átomos de oxígeno de dos superficies diferentes pero con enlaces de Si-O. Es decir, tanto el PDMS como los vidrios tienen enlaces de Si-O. El plasma desprende los átomos de oxígeno de ambos dejando libre al Si, para reaccionar con el oxígeno de la otra superficie, generando enlaces covalentes. A este proceso se le suele llamar oxidación por plasma [22].

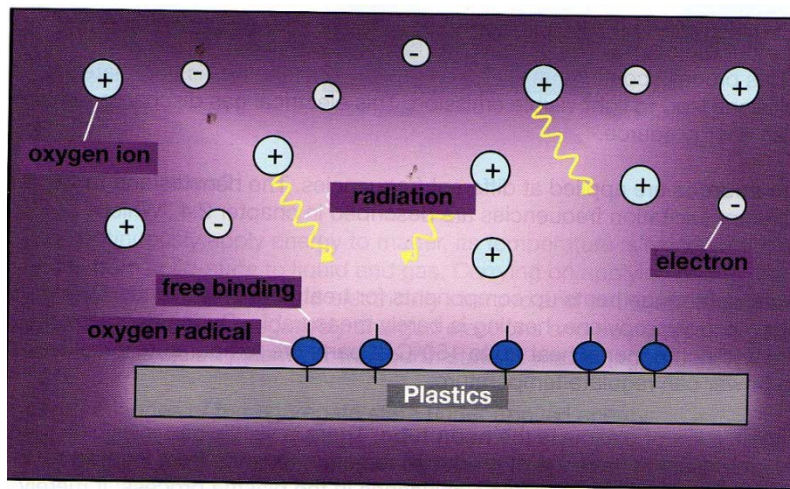


Figura 3.2 Efectos en el proceso de plasma. Tomada de [22]

La oxidación controlada de PDMS (polidimetilsiloxano) es esencial para la adhesión entre los componentes de un dispositivo de PDMS. La adhesión permanente entre los componentes de los microdispositivos es el resultado de los enlaces covalentes formados por las interfaces entre el PDMS y otros materiales a base de silicio como vidrio, cuarzo y PDMS.

El tiempo óptimo y las condiciones de oxidación, alcanzado por los tratamientos con oxígeno contenido en el plasma, son cruciales para los procedimientos de microfabricación con altos rendimientos. Mientras que la oxidación insuficiente de PDMS no ofrece la suficiente densidad de grupos siloxil y no hay una adhesión, la sobre-oxidación del PDMS en la superficie impide la adherencia entre los sustratos planos. Lo ideal es encontrar un conjunto de condiciones óptimas de operación el plasma, es decir sobre todo, la duración del tratamiento de plasma para que se produzca una adhesión permanente y esta sea lo más perfecta posible; es decir, la oxidación de la

superficie del PDMS debe ser suficiente para que se produzca la adhesión irreversible, y que se complete antes de que se produzcan los efectos de la sobreoxidación[20].

Aquí se describirán las pruebas que se hicieron para encontrar las condiciones óptimas para la adhesión entre el PDMS y superficies de vidrio. Se encontró en la literatura que el uso de oxígeno puro es la forma ideal para el tratamiento con plasma [20].

3.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Para este trabajo se utilizó un horno de plasma con las siguientes características. Es un horno de plasma marca **Electronic Diener®**, trabaja a una radiofrecuencia (RF) de 40 KHz, y se puede trabajar a una potencia de 1-100 Watts, trabaja con oxígeno puro con una presión de 7.5-14 psi, a 230 V de corriente alterna (CA), y cuenta con una cámara de tratamiento de 1.9 litros [22], como se muestra en la Figura 3.3



Figura 3.3 Horno de plasma utilizado en este trabajo para la activación de superficies de PDMS y vidrio para la microfabricación de microchips

Se fijaron algunas variables como constantes.

- La limpieza del vidrio se manejó como se mencionó en el capítulo anterior (Construcción).
- Se utilizaron vidrios (Portaobjetos) de 75 X 38 mm
- Gas utilizado: oxígeno puro
 1. Presión de salida del tanque= 8.5 psi
 2. Flujo de Gas =7.958 ml min⁻¹
- Tamaño del PDMS= 1 cm²
- Relación PDMS-Agente Curante= 10:1

Se establecieron las variables que debían cambiarse, ya que en la literatura se manejan condiciones de operación que para este trabajo no funcionaron. Dichas variables fueron:

- Tiempo
- Potencia

Se realizó un estudio semicuantitativo para medir la adhesión del PDMS al vidrio cambiando estos parámetros. Y se realizó con un estudio basado en la referencia [20], en el que se midió la Calidad de Adhesión QA (por sus siglas en ingles), en donde:

QA= 2. Cuando la adhesión del PDMS al vidrio es perfecta, en el 100% de la superficie del PDMS

QA= 1. Cuando hubo una adhesión relativa, es decir, que solo se dio en algunas zonas del PDMS.

QA= 0. Cuando no hubo adhesión del PDMS al vidrio en ninguna zona del PDMS, por lo que se puede despegar con muy poca fuerza.

Se colocaron 3 pedazos de PDMS en cada vidrio como muestra la Figura 3.4 con el objetivo de realizar un estudio más minucioso, y así poder obtener un margen de error más pequeño.

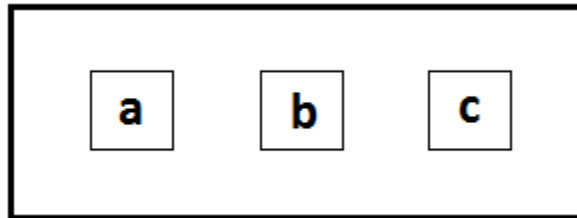


Figura 3.4 Representación de la colocación de los pedazos de PDMS en el vidrio, con lo que se logra una medición más representativa y se disminuye el rango de error.

3.3 RESULTADOS

Los resultados que se obtuvieron se muestran en la Tabla 3.1. Se puede observar que el tiempo es un parámetro que influye en cierta manera a la adhesión del PDMS con plasma de oxígeno, ya que se observó que con tiempos cortos se beneficia un poco la adhesión. Sin embargo también se muestra como la potencia es la variable que afecta de forma importante la adhesión definitiva, ya que en la tabla se puede apreciar que a potencias altas no hay adhesión, y a una potencia baja se obtuvieron resultados sumamente satisfactorios.

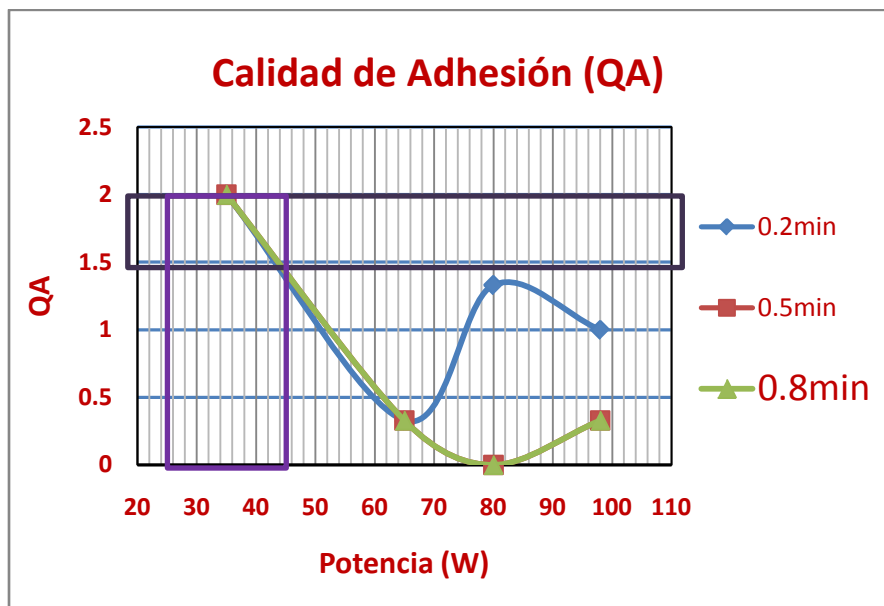
Tabla 3.1 Resultados de estudio semicuantitativo de QA (Calidad de Adhesión)

Tiempo (min)		98 Watts	80 Watts	65 Watts	35 Watts
0.2	a	QA= 1	QA= 1	QA= 0	QA= 2
	b	QA= 1	QA= 2	QA= 0	QA= 2
	c	QA= 1	QA= 1	QA= 1	QA= 2
0.5	a	QA= 0	QA= 0	QA= 0	QA= 2
	b	QA= 0	QA= 0	QA= 0	QA= 2
	c	QA= 1	QA= 0	QA= 1	QA= 2
0.8	a	QA= 0	QA= 0	QA= 0	QA= 2
	b	QA= 1	QA= 0	QA= 0	QA= 2
	c	QA= 0	QA= 0	QA= 1	QA= 2

Para observar mejor los resultados de la prueba, se sacó un promedio de los resultados de cada análisis, obteniendo los resultados que se muestran en la Tabla 3.2, los cuales ayudarán a obtener la Gráfica 3.1, en la cual se observa el comportamiento de la adhesión del PDMS a diferentes potencias.

Tabla 3.2 Promedio de los Estudios de Adhesión

Tiempo (min)	98 Watts	80 Watts	65 Watts	35 Watts
0.2	QA= 1	QA= 1.33	QA= 0.33	QA= 2
0.5	QA= 0.33	QA= 0	QA= 0.33	QA= 2
0.8	QA= 0.33	QA= 0	QA= 0.33	QA= 2



Gráfica 3.1 Efecto de la potencia y el tiempo en la calidad de la del PDMS en superficies de vidrio.

Con ayuda de estos resultados, se decidió hacer otras pruebas a potencias bajas, también cambiando el tiempo, como se muestra en la Tabla 3.3, en donde se observa una mayor proporción de buena adhesión.

Tabla 3.3 Resultados de la QA del PDMS en superficies de vidrio a potencias bajas

Potencia (W)		0.2 min	0.4 min	0.6 min
25	a	QA= 2	QA= 2	QA= 1
	b	QA= 2	QA= 2	QA= 2
	c	QA= 2	QA= 2	QA= 2
35	a	QA= 2	QA= 2	QA= 1
	b	QA= 2	QA= 2	QA= 2
	c	QA= 2	QA= 1	QA= 1
45	a	QA= 2	QA= 2	QA= 2
	b	QA= 2	QA= 2	QA= 2
	c	QA= 1	QA= 1	QA= 1

Se puede concluir entonces que potencias bajas del horno de plasma favorecen en gran manera con la adhesión del PDMS en vidrio, y son las condiciones idóneas para que exista una buena activación de las superficies tanto del PDMS como del vidrio y se tenga una excelente reproducibilidad en casi todas las pruebas que se hicieron a estas condiciones. En la Figura 3.5 se muestran todas las pruebas que se hicieron con el plasma a diferentes tiempos y diferentes potencias.



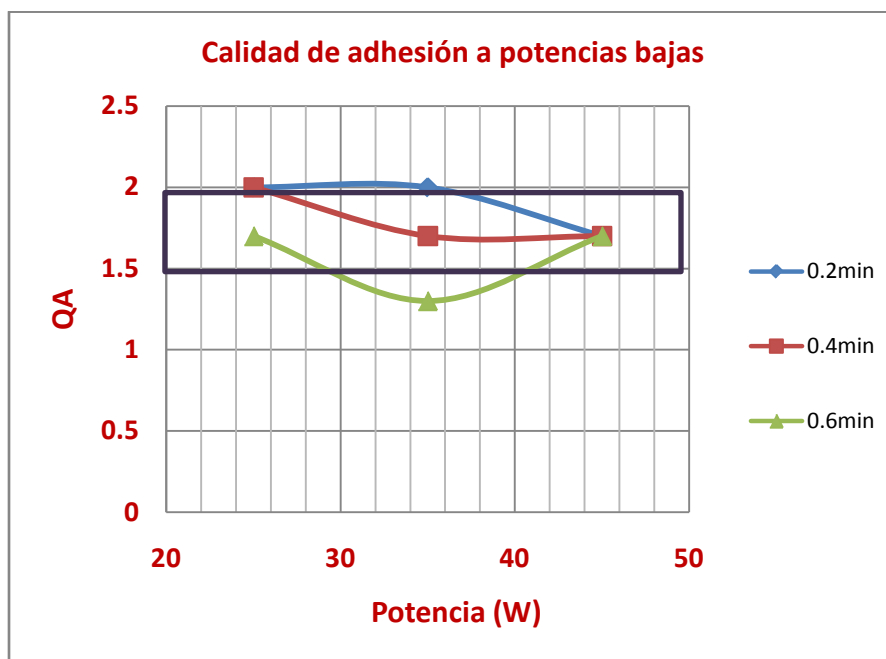
Figura 3.5 Imagen que muestra todas las pruebas que se hicieron con el plasma, para encontrar las condiciones óptimas de operación del equipo de plasma

Al igual que en con los resultados anteriores se decidió sacar un promedio para visualizar de una manera más fácil la mejora en los resultados, esto se hace en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4 Promedios de los estudios de adhesión con potencias bajas

Potencia (W)	0.2 min	0.4 min	0.6 min
25	2	2	1.7
35	2	1.7	1.3
45	1.7	1.7	1.7

Y graficando estos valores se obtiene la Gráfica 3.2 que muestra de manera más evidente la mejoría de los resultados del estudio.



Gráfica 3.2 Grafica que muestra los resultados finales de los estudios de adhesión de PDMS a vidrio con tratamiento de Plasma, manejando potencias bajas

3.4 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se observa en los resultados obtenidos, primeramente que el pegado de los chips para este trabajo es un proceso complejo que requiere de un desarrollo experimental minucioso, ya que es difícil encontrar las condiciones óptimas para lograr la reproducibilidad en el pegado.

En los resultados se observa que el tiempo es una variable que afecta en la adherencia de PDMS a sustratos de silicio, ya que tanto en la Tabla 3.1 como en la Tabla 3.3 se observa que el tiempo en

el que se benefició más la adhesión fue a 0.2 min, es decir, a tiempos bajos de activación con plasma se obtienen mejores resultados.

Por otra parte se observa que la potencia del horno es el factor que más afecta la correcta adherencia del PDMS a sustratos de vidrio, determinando que a potencias bajas, es decir, de 25 W a 45 W, es donde se presentan los mejores resultados de pegado de los microchips.

3.5 CONCLUSIONES

Después de haber realizado todo este procedimiento para encontrar las condiciones óptimas de operación para la activación de superficies base silicio, que se usó para pegar los microchips usados en esta tesis, se puede concluir que se lograron encontrar las condiciones que permitieron los mejores resultados de adhesión del PDMS al vidrio (tiempo de 0.3 minutos a una potencia de 35 Watts). Bajo estas condiciones se alcanza una oxidación suficiente tanto de la superficie del PDMS como la del vidrio, sin llegar a las condiciones de sobreoxidación la cual resulta contraproducente en la adhesión de los chips al vidrio.

CAPÍTULO 4. FUNCIONAMIENTO DE LOS MICROCHIPS

4.1 ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA DE MICROGOTEO

Las microgotas son gotas generadas en volúmenes sumamente pequeños (nanolitros) dentro de los microchips. Se forman de una fase acuosa, la cual se encuentra dentro de una fase orgánica que corre como flujo laminar, dicho flujo de aceite corta el flujo de la fase acuosa de una forma repetida formándose microgotas (como se observa en la Figura 4.1).

En las microgotas se pueden llevar a cabo reacciones de diferentes tipos de forma rápida y aislada. Su formación representa una promesa en el análisis de sistemas químicos y biológicos, ya que en sistemas de esta especie se logran generar un gran número de microgotas en un tiempo muy corto, por lo que se puede hacer un sinfín de análisis de diferentes características en un tiempo muy corto [23].

La formación de microgotas ayuda a evitar problemas que se presentan en la microfluídica tradicional como pérdida de muestra, dispersión y contaminación, ya que dentro de la microfluídica convencional se manejan flujos laminares, en donde los reactivos se dispersan a lo largo del flujo por lo que la concentración de la muestra disminuye por la misma razón de la dispersión en el flujo laminar, si llega a haber un elemento contaminante provocará la contaminación completa del flujo [24]. Además en las gotas se puede manipular tanto la frecuencia como el volumen [25]. Algunas características importantes de las microgotas es que pueden dividirse, fusionarse y tal vez la característica principal es que pueden ser analizadas por separado [26], por ejemplo utilizando fluorescencia inducida por un laser (ver apéndice A)[27]

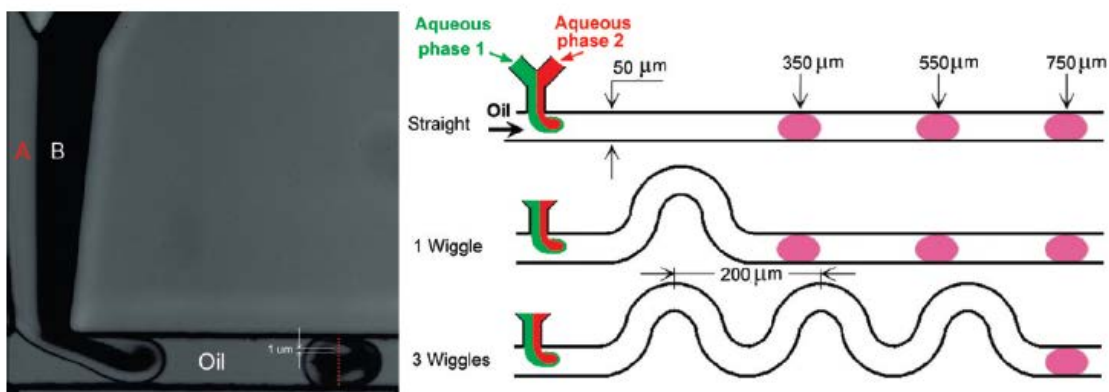


Figura 4.1 Microgotas de fase acuosa generadas en una fase orgánica, en tres distintos tipos de diseño de microcanal. Tomada de [26]

El uso de microgotas permite que se ahorren reactivos ya que las microgotas se generan en volúmenes de nanolitros, y permite hacerse un análisis efectivo en una gota [23]. Por otra parte algunos inconvenientes son: Inestabilidad en la generación de las microgotas y fugas de los componentes de las microgotas a la fase orgánica [28].

Dentro de las técnicas analíticas utilizadas en microfluídica, todavía existen algunas como la espectrometría de masas y la cromatografía líquida, que a pesar de haber sido ya incorporadas con éxito en sistemas de microfluidos convencionales con flujos laminares, han sido difíciles de integrar a las microgotas [24].

4.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL PARA GENERACIÓN DE MICROGOTAS

Se diseñaron y fabricaron microchips que tuvieran las siguientes características: los microchips tienen una entrada de la solución de aceite mineral (fase orgánica), la cual se divide en dos, en una geometría pentagonal (Figura 4.2). Tienen tres entradas para fases acuosas, una de las cuales se utilizó para introducir una solución de fluoresceína que se utilizó como marcador fluorescente. En la zona donde se forman las microgotas, se observa que el flujo de las tres fases acuosas se intersecta con la fase orgánica por ambos lados. Dicho flujo de aceite corta el flujo de la fase acuosa de una forma repetida formándose microgotas, las cuales llegan a un serpentín que tiene el propósito de aumentar el tiempo de residencia de las gotas dentro del microchip, y tiene una salida (Figura 4.2).

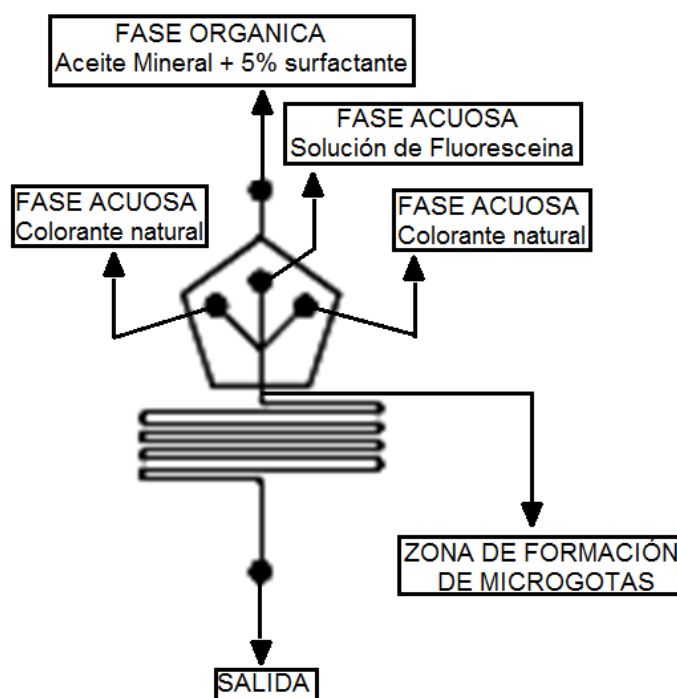


Figura 4.2 Partes principales del microchip

El microchip es construido para que en un estudio posterior (no realizando en esta tesis), se lleven a cabo reacciones enzimáticas en las gotas, por lo que en este trabajo se eficientizará el uso de este dispositivo. Por esta razón este diseño se construyó a diferentes dimensiones y por dos diferentes técnicas (Shrinky-Dinks y fotolitografía suave).

El aceite que se utilizó fue aceite mineral con 5 % peso/volumen del surfactante “Spam 80”. Este compuesto se incluyó para favorecer la formación de gotas estables, pero sin que el aceite se volviera muy viscoso.

A cada microchip se le hicieron pruebas de flujo, para ver cómo funcionan y poder elegir el diseño que más beneficiaba la formación de microgotas.

Primeramente hay que encontrar los flujos a las que hay una estabilidad en la formación de microgotas.

- 1) La primera prueba realizada fue ir aumentando de forma proporcional los flujos de todos los componentes, teniendo la misma relación de flujo entre la fase acuosa y la fase orgánica.
- 2) La segunda prueba que se realizó fue ir cambiando la relación de flujo entre la fase acuosa y la fase orgánica, es decir ir aumentando la cantidad de fase acuosa con respecto a la fase orgánica, manteniendo el flujo total constante.

Se realizaron las pruebas experimentales de la siguiente manera:

- Se llenaron dos jeringas de plástico de 1 mL con agua pintada con colorante natural.
- Se llenó una jeringa de plástico de 1 mL con solución de fluoresceína 150 μ M.
- Se llenó una jeringa de plástico de 1mL con aceite mineral con 5% peso/volumen de Spam 80. (fase orgánica).
- Se colocaron las jeringas en cuatro microbombas (Siryng Pump® modelo NE-300).
- Se colocó el microchip en un microscopio invertido (Leica® DMIL Led S 80/0.30), con el objetivo 4x.
- Se conectaron las jeringas a las 4 diferentes entradas del microchip, con ayuda de 50 cm de microtubería.
- Se pusieron a funcionar las microbombas generando los flujos, y con una cámara digital (Pixe Link® μ Scope Essentials Versión 2.3) montada en el microscopio que ayuda a realizar el experimento ya que permite ver la prueba a través de la computadora, se lograron tomar fotografías.
- La frecuencia de las gotas se medirá con ayuda de un cronómetro, contando las gotas directamente del microscopio, midiendo el número de gotas es un minuto.

4.3 RESULTADOS

Primeramente se muestran los resultados de los microchips fabricados por la técnica de Shrinky-Dinks. En la Figura 4.3 se muestra una imagen de gotas generadas en un microchip construido por la técnica de Shrinky-Dinks, en donde se distinguen algunas características de la técnica, como la geometría de las gotas, el tamaño de las mismas, la rugosidad de los canales y las imperfecciones del microchip.

El volumen de las gotas se puede calcular ya que se conoce tanto la profundidad, el ancho y el largo de las gotas, por lo que se considera que la fórmula para calcular el volumen de un rectángulo, por lo que se obtiene un volumen aproximado.

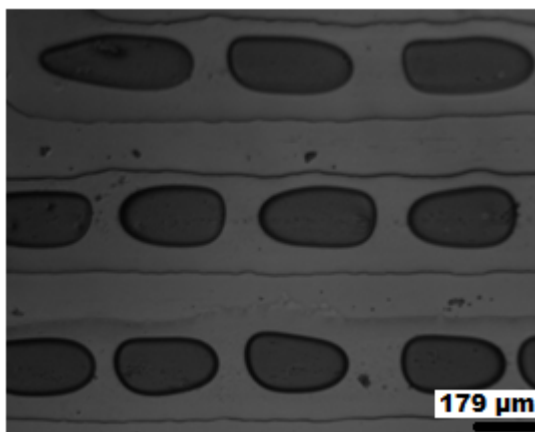
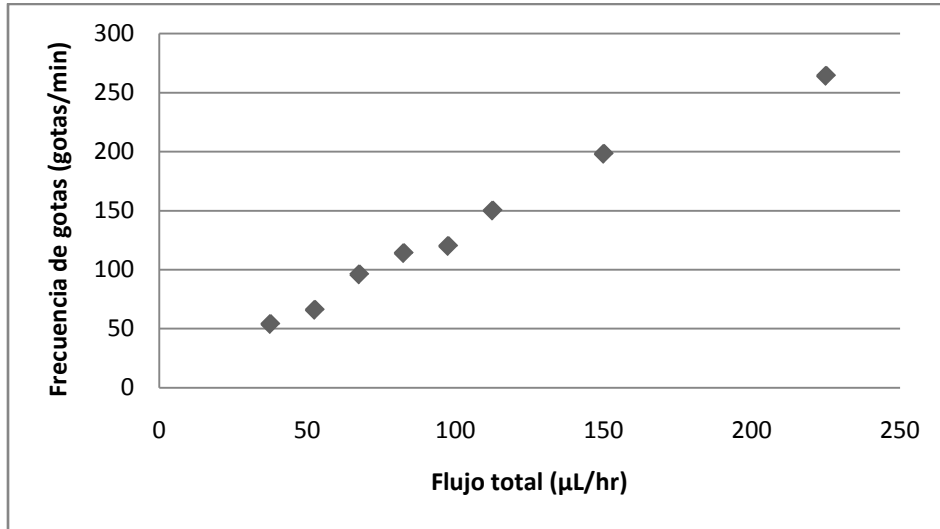


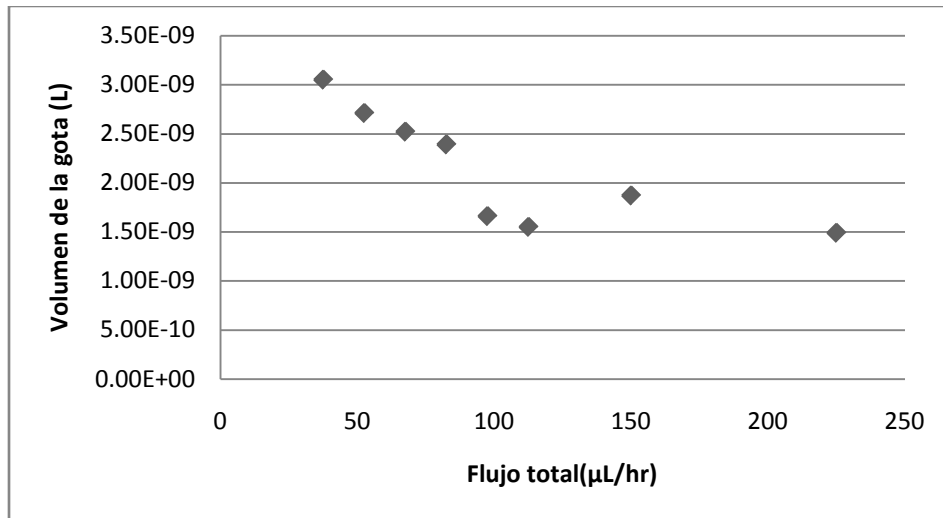
Figura 4.3 En esta imagen se muestran algunas gotas generadas en un microchip construido por Shrinky-Dinks, y se pueden apreciar algunas características de las gotas

Tabla 4.1 Diseño en Corel Draw 5.0 “Shrinky-Dink”, con un ancho de 314 μm y una profundidad de 47.55 μm , donde se aumentó de forma gradual el flujo total

RELACIÓN DE FLUJO (AGUA/ACEITE)= 0.5				
EXPERIMENTO	FLUJO TOTAL ($\mu\text{L hr}^{-1}$)	FRECUENCIA DE GOTAS (Hz)	VOLUMEN DE GOTAS (L)	FRECUENCIA DE GOTAS (gotas min^{-1})
1	37.5	0.9	3.05E-09	54
2	52.5	1.1	2.71E-09	66
3	67.5	1.6	2.52E-09	96
4	82.5	1.9	2.39E-09	114
5	97.5	2	1.66E-09	120
6	112.5	2.5	1.55E-09	150
7	150	3.3	1.87E-09	198
8	225	4.4	1.49E-09	264



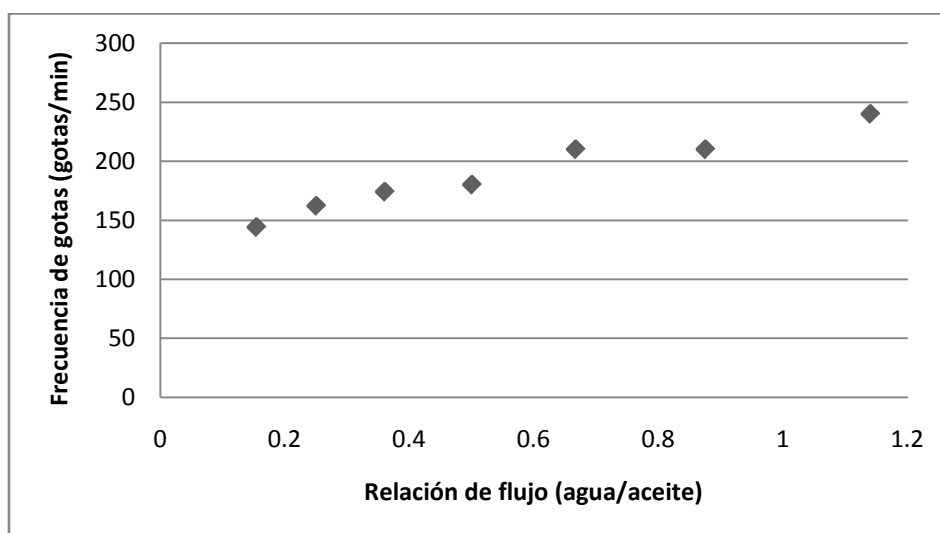
Gráfica 4.1 Gráfica que muestra el comportamiento de la frecuencia de las gotas generadas con respecto al aumento del flujo total manteniendo una relación agua/aceite = 0.5



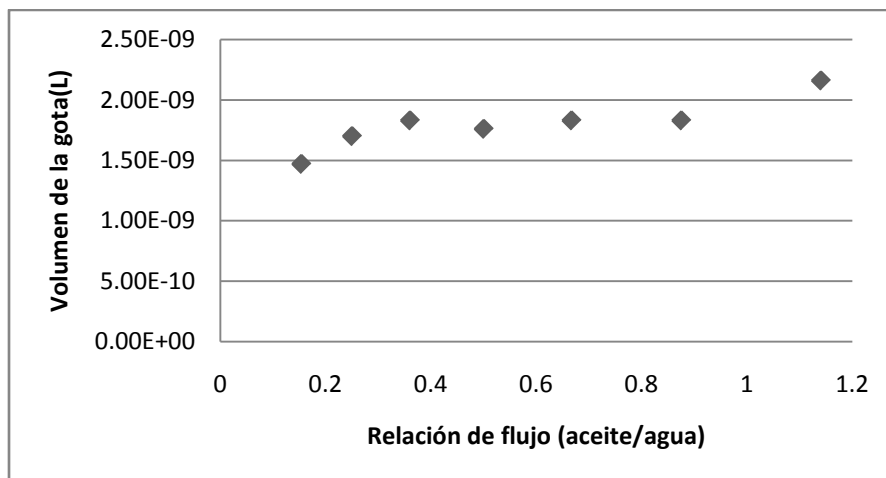
Gráfica 4.2 Gráfica que muestra el comportamiento del volumen de las gotas con respecto al aumento del flujo total manteniendo una relación agua/aceite = 0.5

Tabla 4.2 Diseño en Corel Draw 5.0 “Shrinky-Dink”, con un ancho de 314 μm y una profundidad de 47.55 μm . donde se aumentó de forma gradual la relación de flujo (agua/aceite)

Flujo total = 150 $\mu\text{L hr}^{-1}$				
EXPERIMENTO	RELACIÓN DE FLUJO (Fase ac/Fase org)	FRECUENCIA DE GOTAS (Hz)	VOLUMEN DE GOTAS (L)	FRECUENCIA DE GOTAS (gotas min^{-1})
1	0.1538	2.4	1.47E-09	144
2	0.25	2.7	1.70E-09	162
3	0.36	2.9	1.83E-09	174
4	0.5	3	1.76E-09	180
5	0.6666	3.5	1.83E-09	210
6	0.875	3.5	1.83E-09	210
7	1.14	4	2.16E-09	240



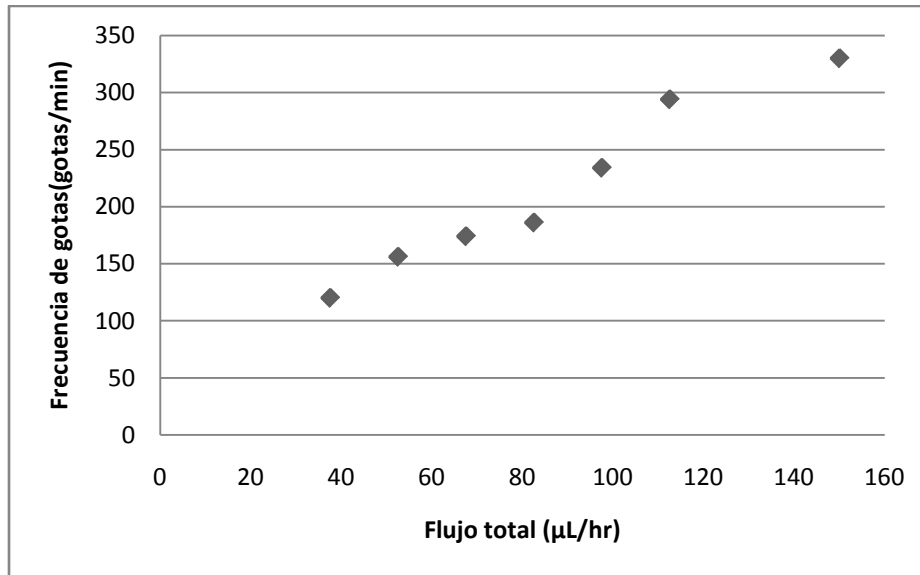
Gráfica 4.3 Gráfica que muestra el comportamiento de la frecuencia de gotas generadas con respecto al aumento de la relación de flujo entre la fase acuosa y la fase orgánica manteniendo un flujo total constante = 150 $\mu\text{L hr}^{-1}$



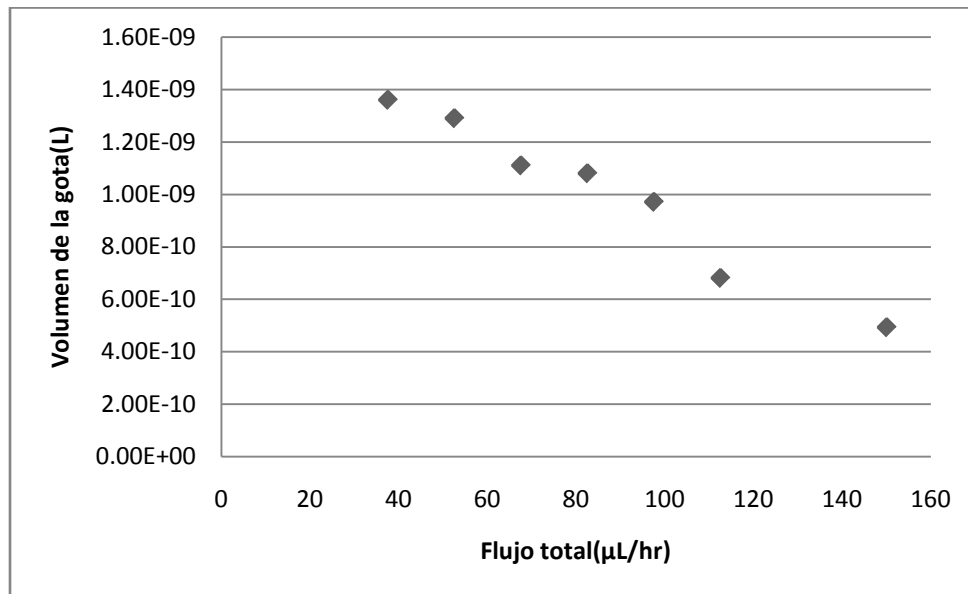
Gráfica 4.4 Gráfica que muestra el comportamiento del volumen de las gotas con respecto al aumento de la relación de flujo entre la fase acuosa y la fase orgánica manteniendo un flujo total constante = $150 \mu\text{L hr}^{-1}$

Tabla 4.3 Diseño en Autocad 2011 “Shrinky-Dink”, con un ancho de $256.8 \mu\text{m}$ y una profundidad de $43.15 \mu\text{m}$, donde se aumentó de forma gradual el flujo total

RELACIÓN DE FLUJO (AGUA/ACEITE)= 0.5				
EXPERIMENTO	FLUJO TOTAL ($\mu\text{L hr}^{-1}$)	FRECUENCIA DE GOTAS (Hz)	VOLUMEN DE GOTAS (L)	FRECUENCIA DE GOTAS (gotas min^{-1})
1	37.5	2	1.36E-09	120
2	52.5	2.6	1.29E-09	156
3	67.5	2.9	1.11E-09	174
4	82.5	3.1	1.08E-09	186
5	97.5	3.9	9.71E-10	234
6	112.5	4.9	6.81E-10	294
7	150	5.5	4.93E-10	330



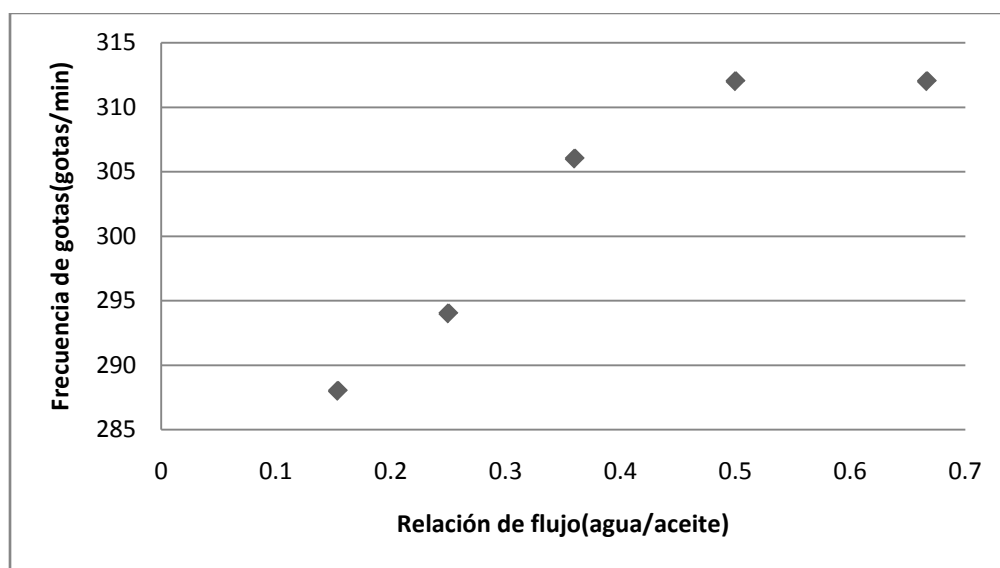
Gráfica 4.5 Gráfica que muestra el comportamiento de la frecuencia de las gotas generadas con respecto al aumento del flujo total manteniendo la relación de agua/aceite= 0.5



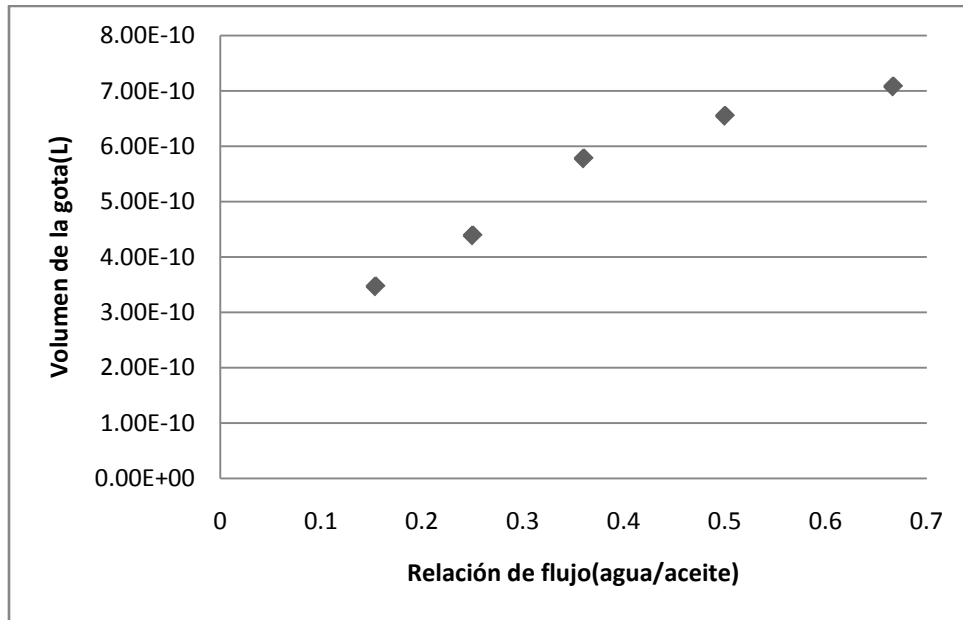
Gráfica 4.6 Gráfica que muestra el comportamiento del volumen de las gotas con respecto al aumento del flujo total manteniendo la relación agua/aceite= 0.5

Tabla 4.4 Diseño en Autocad 2011 “Shrinky-Dink”, con un ancho de 256.8 μm y una profundidad de 43.15 μm , donde se aumentó de forma gradual la relación de flujo (agua aceite)

Flujo total = 150 $\mu\text{L hr}^{-1}$				
EXPERIMENTO	RELACIÓN DE FLUJO (Fase ac/Fase org)	FRECUENCIA DE GOTAS (Hz)	VOLUMEN DE GOTAS (L)	FRECUENCIA DE GOTAS (gotas min^{-1})
1	0.1538	4.8	3.47E-10	288
2	0.25	4.9	4.39E-10	294
3	0.36	5.1	5.78E-10	306
4	0.5	5.2	6.55E-10	312
5	0.6666	5.2	7.08E-10	312



Gráfica 4.7 Gráfica que muestra el comportamiento de la frecuencia de gotas generadas con respecto al aumento de la relación de flujo entre la fase acuosa y la fase orgánica manteniendo un flujo total constante =150 $\mu\text{L hr}^{-1}$



Gráfica 4.8 Gráfica que muestra el comportamiento del volumen de las gotas con respecto al aumento de la relación de flujo entre la fase acuosa y la fase orgánica manteniendo un flujo total constante = $150 \mu\text{L hr}^{-1}$

A continuación se muestran los diseños elegidos que se fabricaron por la técnica de fotolitografía suave. En la Figura 4.4 se muestran algunas gotas generadas en un microchip construido por fotolitografía suave, en donde se muestran algunas características como la geometría, el tamaño de las gotas generadas en esta técnica, así como la menor rugosidad de las paredes de los microcanales.

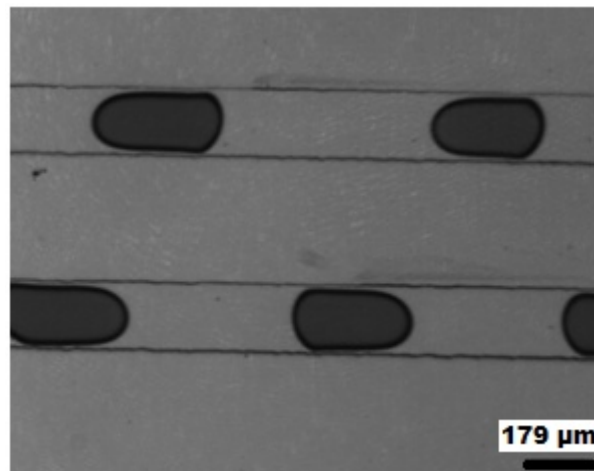
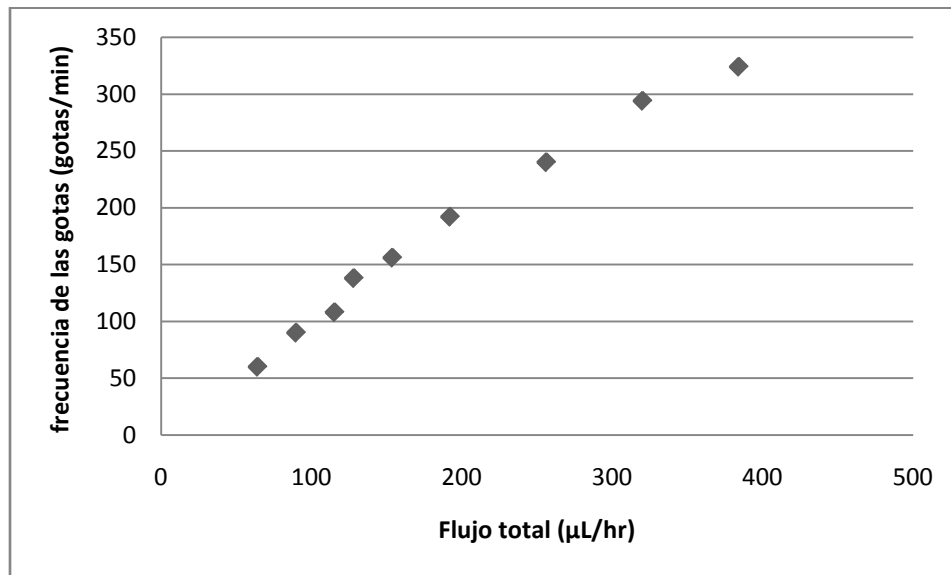


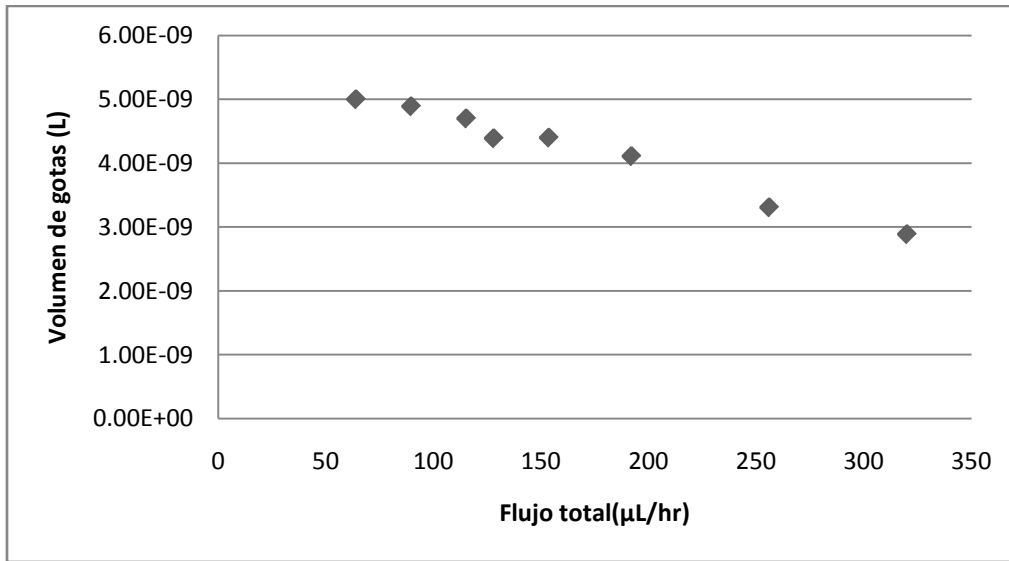
Figura 4.4 En esta imagen se muestran algunas gotas generadas en un microchip construido por fotolitografía suave en la cual se observan algunas características de las gotas formadas.

Tabla 4.5 Diseño en Corel Draw 5.0 “fotolitografía suave” con un ancho de 185 μm y una profundidad de 119.1 μm , donde se aumentó de forma gradual el flujo total.

RELACIÓN DE FLUJO (AGUA/ACEITE)= 0.24				
EXPERIMENTO	FLUJO TOTAL ($\mu\text{L hr}^{-1}$)	FRECUENCIA DE GOTAS (Hz)	VOLUMEN DE GOTAS (L)	FRECUENCIA DE GOTAS (gotas min^{-1})
1	64	1	5.00E-09	60
2	89.6	1.5	4.89E-09	90
3	115.2	1.8	4.70E-09	108
4	128	2.3	4.39E-09	138
5	153.6	2.6	4.40E-09	156
6	192	3.2	4.11E-09	192
7	256	4	3.31E-09	240
8	320	4.9	2.89E-09	294
9	384	5.4	nd	324



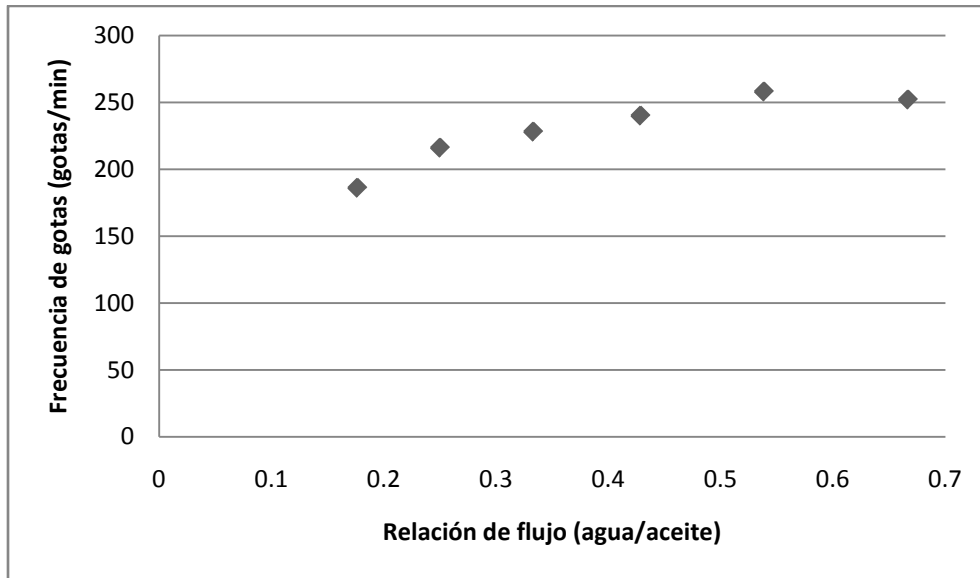
Gráfica 4.9 Gráfica que muestra el comportamiento de la frecuencia de las gotas generadas con respecto al aumento del flujo total manteniendo una relación de agua/aceite= 0.24



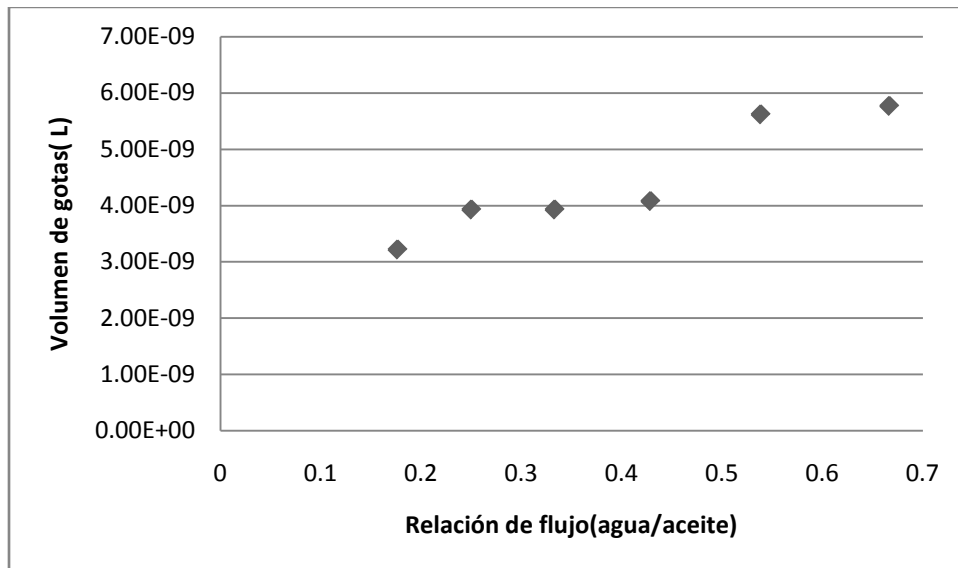
Gráfica 4.10 Gráfica que muestra el comportamiento del volumen de las gotas con respecto al aumento del flujo total manteniendo una relación de agua/aceite= 0.24

Tabla 4.6 Diseño en Corel Draw 5.0 “fotolitografía suave” con un ancho de 185 μm y una profundidad de 119.1 μm, donde se aumentó de forma gradual la relación de flujo (agua/aceite)

<i>Flujo total = 200 μL hr⁻¹</i>				
EXPERIMENTO	RELACIÓN DE FLUJO (Fase ac/Fase org)	FRECUENCIA DE GOTAS (Hz)	VOLUMEN DE GOTAS (L)	FRECUENCIA DE GOTAS (gotas min ⁻¹)
1	0.1764	3.1	3.22E-09	186
2	0.25	3.6	3.93E-09	216
3	0.333	3.8	3.93E-09	228
4	0.4285	4	4.08E-09	240
5	0.5384	4.3	5.62E-09	258
6	0.6666	4.2	5.77E-09	252



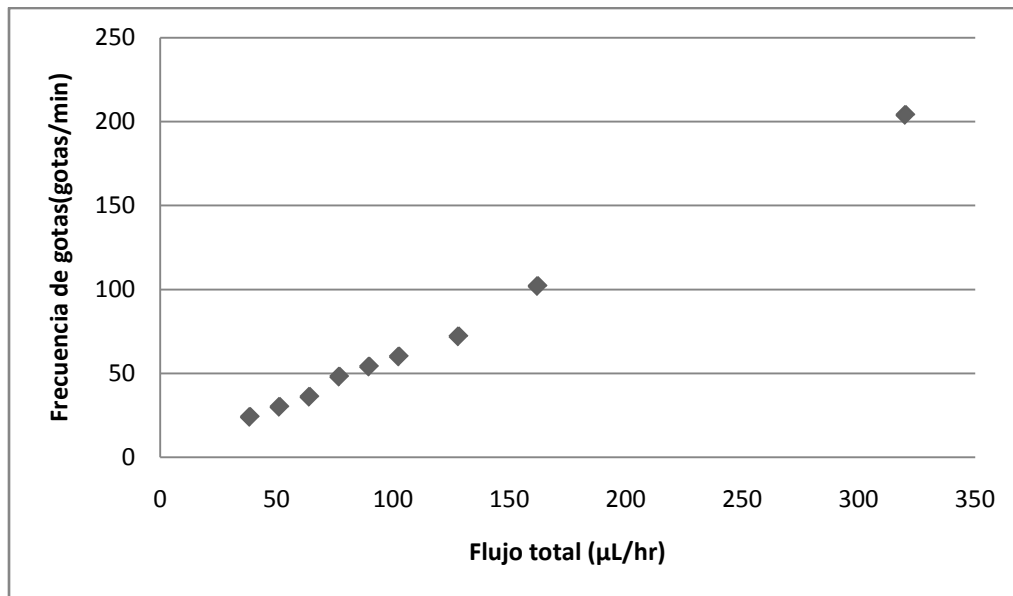
Gráfica 4.11 Gráfica que muestra el comportamiento de la frecuencia de gotas generadas con respecto al aumento de la relación de flujo entre la fase acuosa y la fase orgánica manteniendo un flujo total constante= $200 \mu\text{L hr}^{-1}$



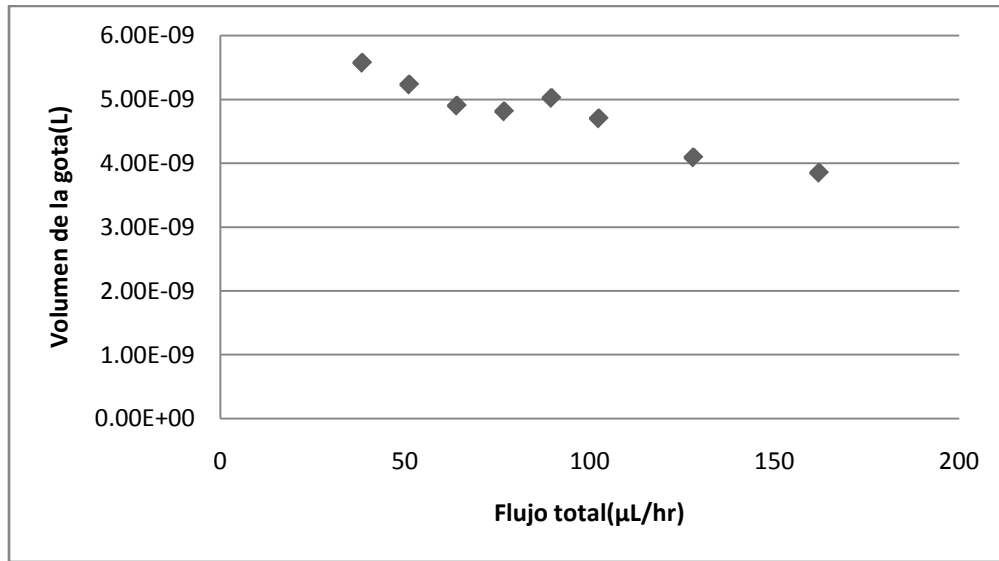
Gráfica 4.12 Gráfica que muestra el comportamiento del volumen de las gotas con respecto al aumento de la relación de flujo entre la fase acuosa y la fase orgánica manteniendo un flujo total constante= $200 \mu\text{L hr}^{-1}$

Tabla 4.7 Diseño en Autocad 2011 “fotolitografía suave” con un ancho de 234.3 μm y una profundidad de 130.1 μm , donde se aumentó de forma gradual el flujo total

RELACIÓN DE FLUJO (AGUA/ACEITE)= 0.24				
EXPERIMENTO	FLUJO TOTAL ($\mu\text{L hr}^{-1}$)	FRECUENCIA DE GOTAS (Hz)	VOLUMEN DE GOTAS (L)	FRECUENCIA DE GOTAS (gotas min^{-1})
1	38.4	0.4	5.57E-09	24
2	51.12	0.5	5.23E-09	30
3	64	0.6	4.90E-09	36
4	76.8	0.8	4.81E-09	48
5	89.6	0.9	5.02E-09	54
6	102.4	1	4.70E-09	60
7	128	1.2	4.09E-09	72
8	162	1.7	3.85E-09	102
9	320	3.4	nd	204



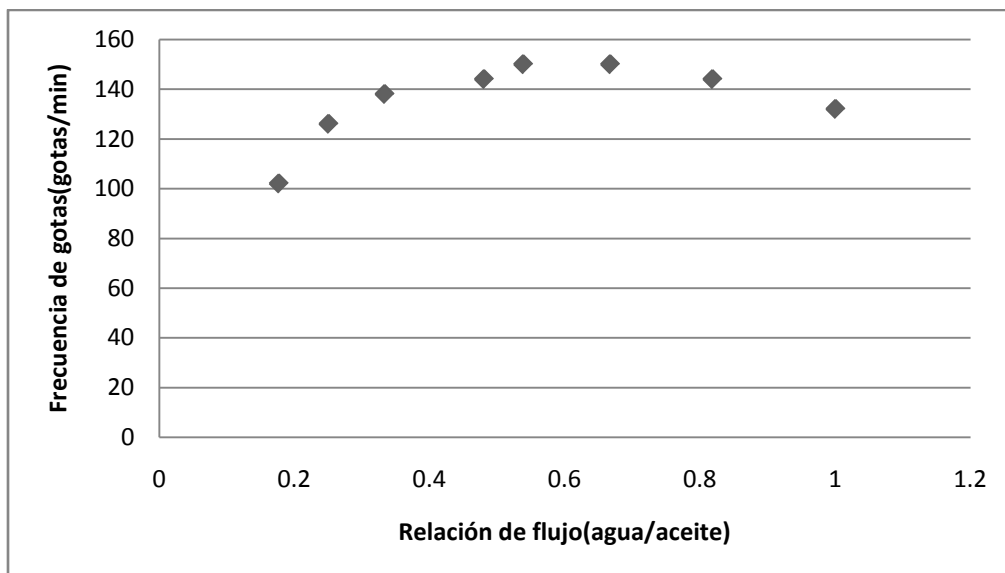
Gráfica 4.13 Gráfica que muestra el comportamiento de la frecuencia de las gotas generadas con respecto al aumento del flujo total manteniendo una relación de agua/aceite= 0.24



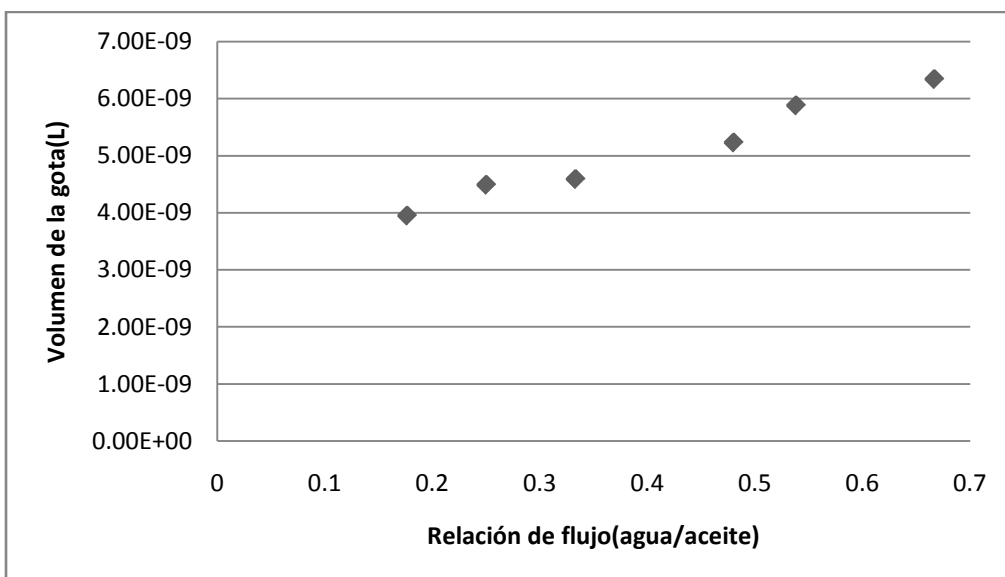
Gráfica 4.14 Gráfica que muestra el comportamiento del volumen de las gotas con respecto al aumento del flujo total manteniendo una relación de flujo de agua/aceite= 0.24

Tabla 4.8 Diseño en Autocad 2011 “fotolitografía suave” con un ancho de 234.3 μm y una profundidad de 130.1 μm, donde se aumentó de forma gradual la relación de flujo agua/aceite.

Flujo total = 200 μL hr ⁻¹				
EXPERIMENTO	RELACIÓN DE FLUJO (Fase ac/Fase org)	FRECUENCIA DE GOTAS (Hz)	VOLUMEN DE GOTAS (L)	FRECUENCIA DE GOTAS (gotas min ⁻¹)
1	0.1764	1.7	3.95E-09	102
2	0.25	2.1	4.49E-09	126
3	0.333	2.3	4.59E-09	138
4	0.48	2.4	5.23E-09	144
5	0.538	2.5	5.88E-09	150
6	0.6666	2.5	6.34E-09	150
7	0.818	2.4	nd	144
8	1	2.2	nd	132



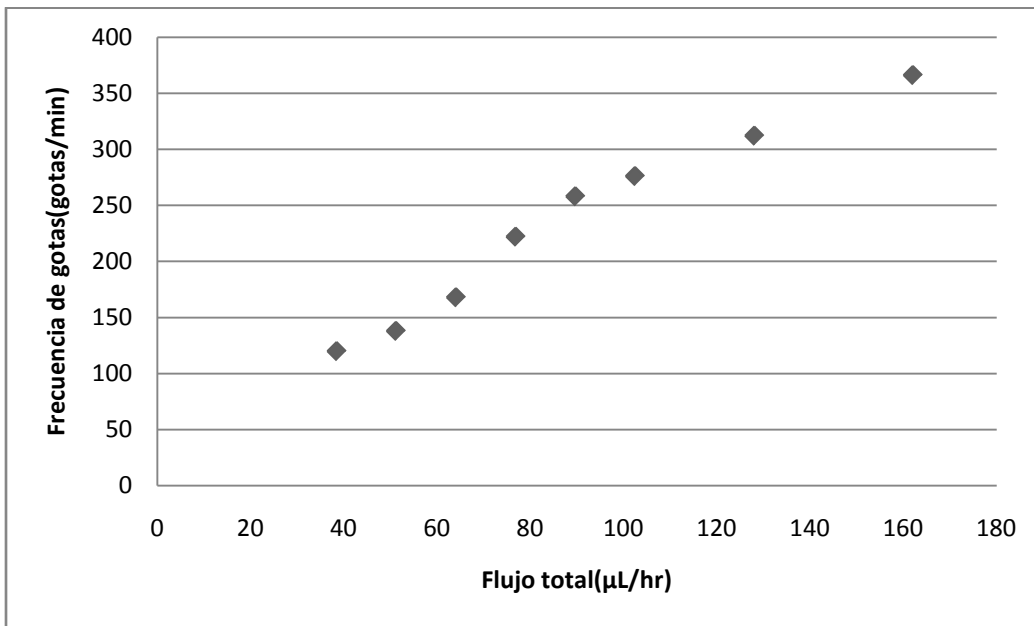
Gráfica 4.15 Gráfica que muestra el comportamiento de la frecuencia de gotas generadas con respecto al aumento de la relación de flujo entre la fase acuosa y la fase orgánica manteniendo un flujo total constante= $200 \mu\text{L hr}^{-1}$



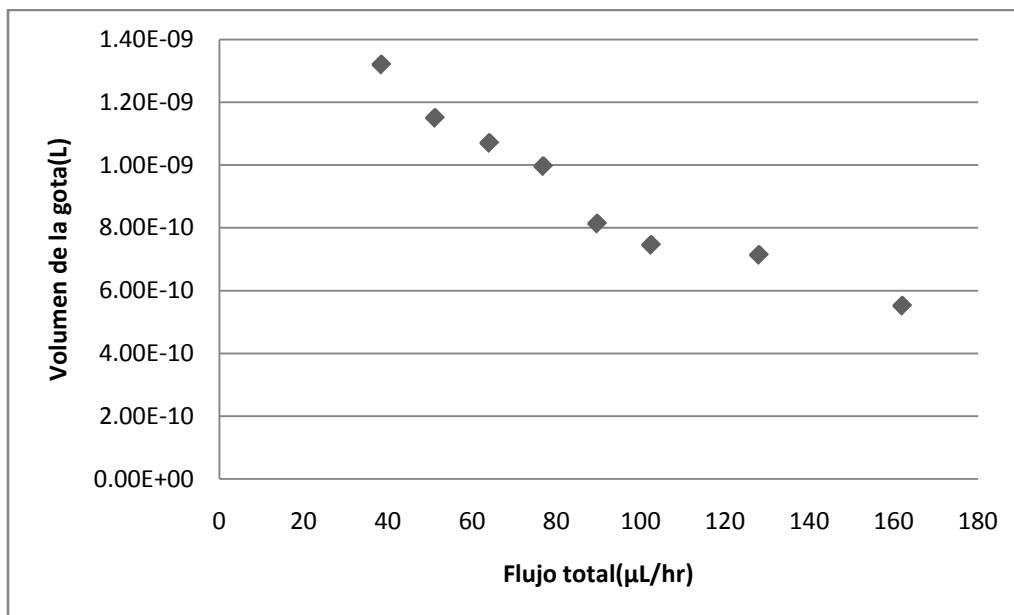
Gráfica 4.16 Gráfica que muestra el comportamiento del volumen de las gotas con respecto al aumento de la relación de flujo entre la fase acuosa y la fase orgánica manteniendo un flujo total constante= $200 \mu\text{L hr}^{-1}$

Tabla 4.9 Diseño en Corel Draw 5.0 “fotolitografía suave” con un ancho de 91.6 μm y una profundidad de 82.46 μm , donde se aumentó de forma gradual el flujo total

RELACIÓN DE FLUJO (AGUA/ACEITE)= 0.24				
EXPERIMENTO	FLUJO TOTAL ($\mu\text{L hr}^{-1}$)	FRECUENCIA DE GOTAS (Hz)	VOLUMEN DE GOTAS (L)	FRECUENCIA DE GOTAS (gotas min^{-1})
1	38.4	2	1.32E-09	120
2	51.12	2.3	1.15E-09	138
3	64	2.8	1.07E-09	168
4	76.8	3.7	9.96E-10	222
5	89.6	4.3	8.13E-10	258
6	102.4	4.6	7.45E-10	276
7	128	5.2	7.13E-10	312
8	162	6.1	5.51E-10	366



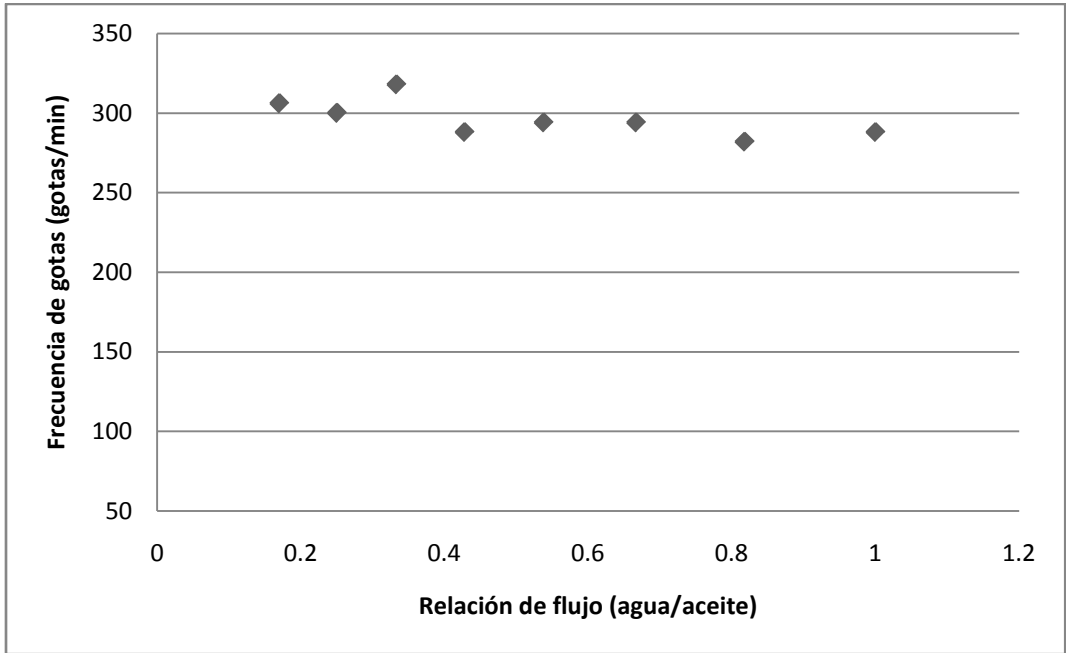
Gráfica 4.17 Gráfica que muestra el comportamiento de la frecuencia de las gotas generadas con respecto al aumento del flujo total manteniendo una relación de flujo agua/aceite= 0.24



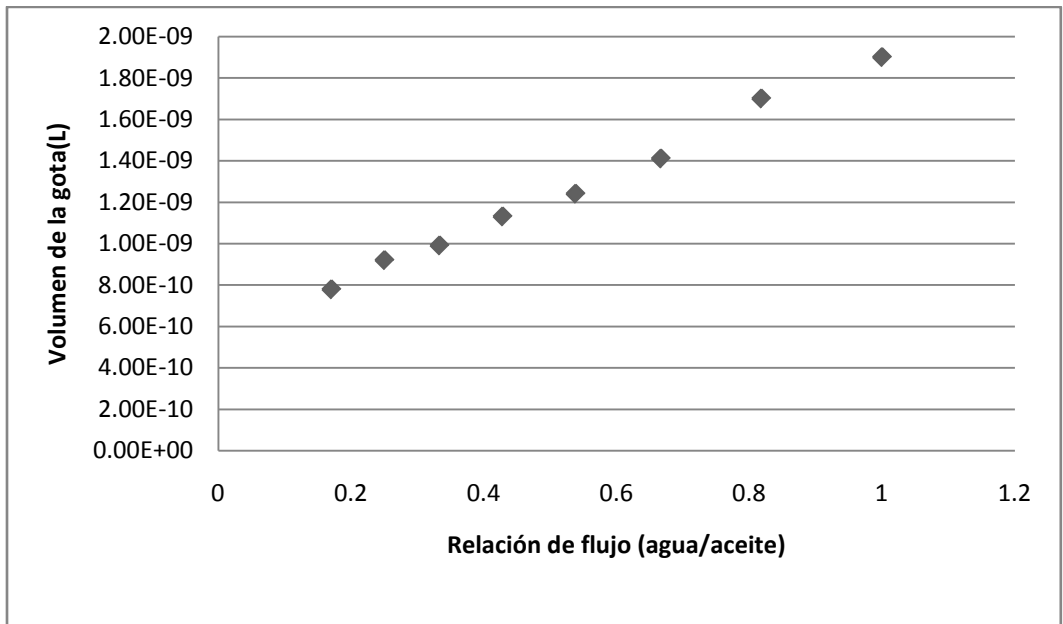
Gráfica 4.18 Gráfica que muestra el comportamiento del volumen de las gotas con respecto al aumento del flujo total manteniendo una relación de flujo agua/aceite= 0.24.

Tabla 4.10 Diseño en Corel Draw 5.0 “fotolitografía suave” con un ancho de 91.6 μm y una profundidad de 82.46 μm, donde se aumentó de forma gradual la relación de flujo agua/aceite

Flujo total = 100 μL hr ⁻¹				
EXPERIMENTO	RELACIÓN DE FLUJO (Fase ac/Fase org)	FRECUENCIA DE GOTAS (Hz)	VOLUMEN DE GOTAS (L)	FRECUENCIA DE GOTAS (gotas min ⁻¹)
1	0.17	5.1	7.78E-10	306
2	0.25	5	9.19E-10	300
3	0.333	5.3	9.90E-10	318
4	0.428	4.8	1.13E-09	288
5	0.538	4.9	1.24E-09	294
6	0.6666	4.9	1.41E-09	294
7	0.818	4.7	1.70E-09	282
8	1	4.8	1.90E-09	288



Gráfica 4.19 Gráfica que muestra el comportamiento de la frecuencia de gotas generadas con respecto al aumento de la relación de flujo entre la fase acuosa y la fase orgánica manteniendo un flujo total constante= $100 \mu\text{L hr}^{-1}$



Gráfica 4.20 Grafica que muestra el comportamiento del volumen de las gotas con respecto al aumento de la relación de flujo entre la fase acuosa y la fase orgánica manteniendo un flujo total constante= $100 \mu\text{L hr}^{-1}$

Otra forma de determinar la frecuencia de las microgotas es con ayuda de un laser (“Coherent Shapphire[®]”) se excita a la fluoresceína que contienen las gotas. Al regresar a su estado basal, la fluoresceína emite luz (fluorescencia) la cual es detectada por un fotodiodo (“Hinds Instrument[®], modelo APD-100-001”), el cual manda la señal eléctrica a una tarjeta de conversión de datos (“National Instruments[®], NI USB 6351”), que a su vez genera una señal medible en el programa “Lab View” (Programado por el Dr. Naser Qureshi en apoyo al proyecto), (Figura 4.5).

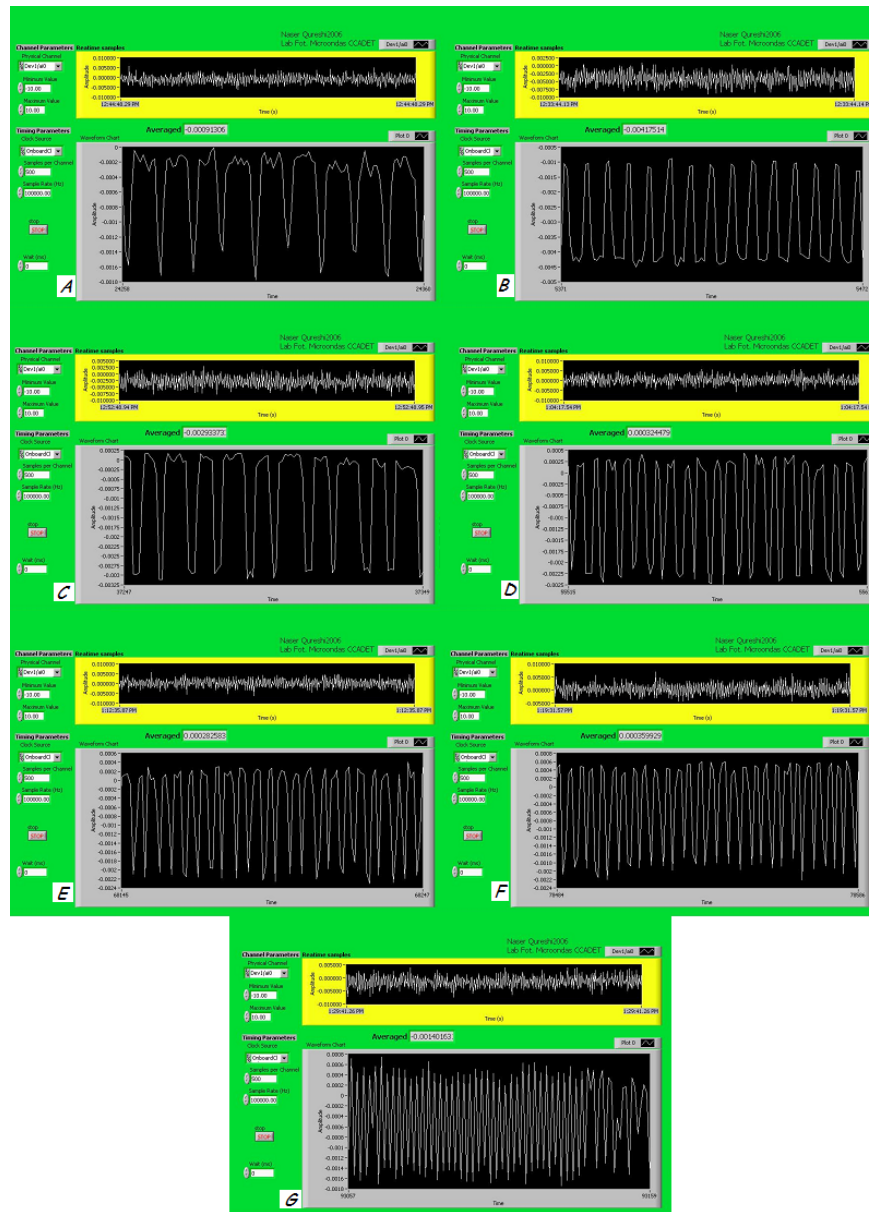


Figura 4.5 En la imagen se muestra una serie de figuras tomadas de las lecturas hechas del programa Lab-View, del microchip con un ancho de canales de $256.8 \mu\text{m}$ y una profundidad de $43.15 \mu\text{m}$, donde cada pico representa una gota. Se aprecia un aumento de la frecuencia muy estable

De igual manera, después de observar las graficas se apreció que en el caso de los microchips construidos por fotolitografía suave el que se construyó con un ancho de canales de $91.6\ \mu\text{m}$ y una profundidad de $82.46\ \mu\text{m}$, se genera un frecuencia de gotas de $366\ \text{gotas}\ \text{min}^{-1}$ con un flujo total de $162\ \mu\text{L}\ \text{hr}^{-1}$ (Gráfica 4.17). En comparación con el microchip construido con un ancho de canales de $234.3\ \mu\text{m}$ y una profundidad de $130.1\ \mu\text{m}$, donde se genera una frecuencia de gotas de $204\ \text{gotas}\ \text{min}^{-1}$ utilizando un flujo total de $320\ \mu\text{L}\ \text{hr}^{-1}$. (Gráfica 4.13). Por lo tanto en primero fue el diseño en donde se generó una frecuencia de gotas mayor utilizando una cantidad de reactivos menor y tal como se muestra en la Figura 4.6, la frecuencia aumentó de manera estable conforme se fue aumentando el flujo total.

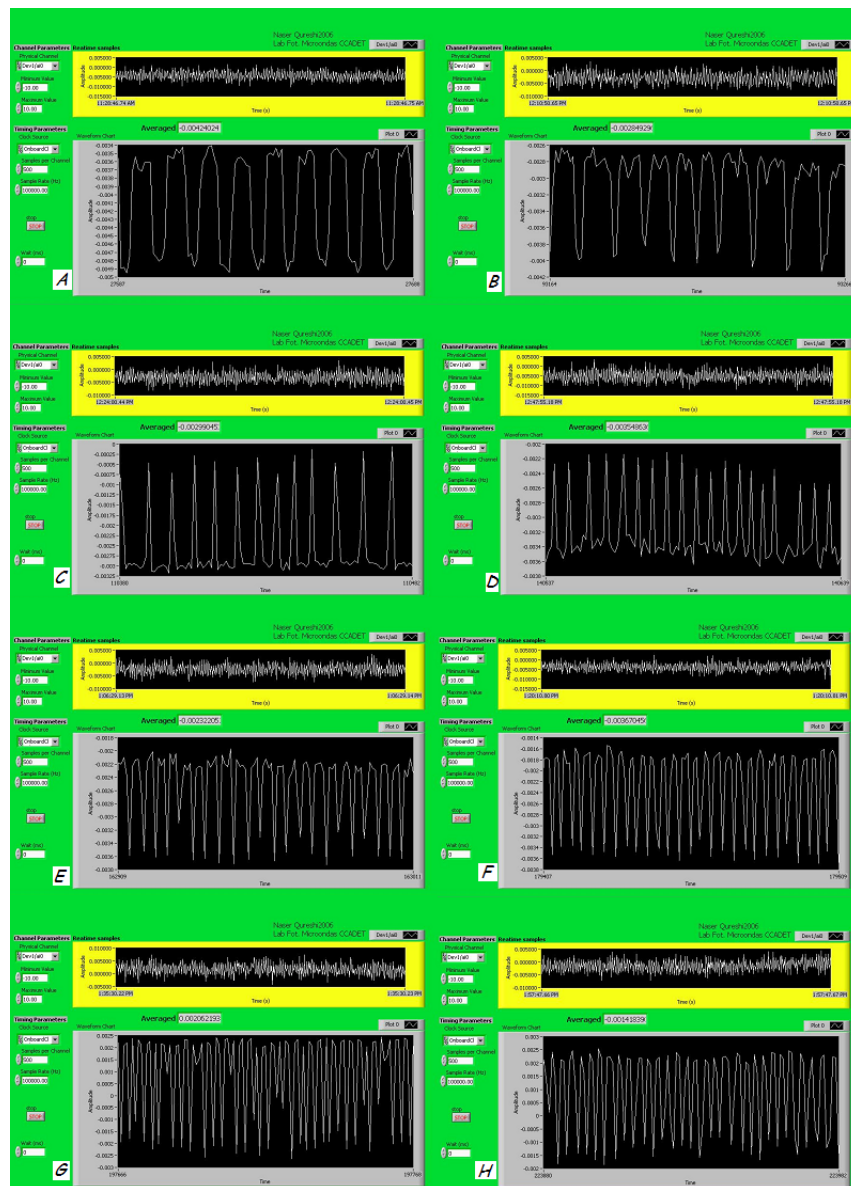


Figura 4.6 En la imagen se muestra una serie de figuras tomadas de las lecturas hechas del programa Lab-View, donde cada pico representa una gota, en el microchip construido con un ancho de canales de $91.6\ \mu\text{m}$ y una profundidad de $82.46\ \mu\text{m}$.

4.4 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Después de analizar las graficas anteriores, se observa como en todos los microchips con el aumento del flujo total aproximadamente entre 75 % y 80 %, afecta de manera importante la frecuencia de las gotas, aumentando este parámetro entre 60 % y 70 %. Por ejemplo en el microchip construido con un ancho de canales de 91.6 μm y una profundidad de 82.46 μm , se aumento el flujo desde 38.4 $\mu\text{L hr}^{-1}$ hasta 162 $\mu\text{L hr}^{-1}$, hubo un aumento de la frecuencia de las gotas desde 120 gotas min^{-1} hasta 366 gotas min^{-1} (ver Tabla 4.9). También se observa como el aumento del flujo total disminuye el volumen de las gotas, aunque de una manera menos significativa. Por ejemplo el volumen se redujo solamente 2.4 veces ($\sim 60\%$) cuando el flujo se aumentó 4.2 veces (de 38.4 $\mu\text{L hr}^{-1}$ a 162 $\mu\text{L hr}^{-1}$) ($\sim 420\%$)

Se aprecia también que el aumento en la relación de flujo (agua/aceite) disminuye de manera marginal la frecuencia de las gotas. Por ejemplo, en el microchip construido con un ancho de canales de 91.6 μm y una profundidad de 82.46 μm (Tabla 4.10), se aumentó la relación de flujo (agua/aceite) desde 0.17 hasta 1 (5.9 veces o un 590 %), y la frecuencia disminuyó apenas en 1.06 veces (6.0 %). Sin embargo, el aumento en la relación de flujo (agua/aceite) afecta de forma importante el volumen de las microgotas. Por ejemplo, en el microchip construido con un ancho de canales de 91.6 μm y una profundidad de 82.46 μm (Tabla 4.10), cuando se aumentó la relación de flujo (agua/aceite) desde 0.17 hasta 1 (5.9 veces), el volumen de las gotas aumentó en un 244 % (2.44 veces).

Se observó que en el caso de la técnica de Shrinky-Dinks, el volumen de las gotas que se generan en un mismo análisis tiende a ser inestable ya que observando la Figura 4.3, y tomando el volumen de la gota más pequeña y el volumen de la gota mas grande, se determinó que la diferencia de volúmenes es de un 27 %. Mientras que realizando lo mismo en con las gotas generadas en un microchip construido por fotolitografía suave (Figura 4.4), la diferencia del volumen fue de 14 %.

Se puede determinar con esto que en el caso de los Shrinky-Dinks, el microchip que se construyó con un ancho de canales de 256.8 μm y una profundidad de 43.15 μm genera una frecuencia de gotas de 330 gotas min^{-1} con un flujo total de 150 $\mu\text{L hr}^{-1}$ (gráfica 4.7), mientras que el diseño que se construyó con un ancho de canales 314 μm y una profundidad de 47.55 μm , genera una frecuencia de gotas de 264 gotas min^{-1} utilizando un flujo total de 225 $\mu\text{L hr}^{-1}$ (gráfica 4.3). Si se toma en cuenta el número de gotas (potenciales microreactores) por unidad de tiempo (es decir la frecuencia de las gotas) como el criterio más importante para determinar la eficiencia de los microchips, es evidentemente que funciona mejor el primero ya que se genera una frecuencia mayor con una menor cantidad de reactivos.

Son muchos los factores que se pueden tomar en cuenta para determinar cuál es el mejor método de construcción de microchips aplicados a microfluidos, sin embargo después de analizar los resultados se observa que con las dos metodologías se obtienen resultados satisfactorios, dado que en los dos microchips elegidos se observa que se logran producir microgotas de una forma estable y además existe un control favorable de las propiedades de las gotas.

Sin embargo, se observó que el microchip construido con la técnica de fotolitografía suave genera gotas más estables, a pesar de que la frecuencia obtenida es muy similar a condiciones parecidas de flujo, entre las dos técnicas. El control y geometría de las gotas se ve más beneficiada con la técnica de fotolitografía suave, es decir las gotas tienen una forma más uniforme, además de que la forma y el tamaño son casi iguales entre las gotas.

Sin embargo, por cuestiones de metodología, equipo y material necesario para poder llevar a cabo la construcción de microchips a través de fotolitografía suave es mucho más costoso. Tomando en cuenta solo el material de construcción de los microchips por cada técnica, sin incluir los equipos, el costo utilizando litografía suave es de aproximadamente \$31,505 pesos, con el que se pueden construir aproximadamente entre 50 y 70 microchips (\$525 pesos por chip en promedio). Mientras que el costo aproximado de los Shrinky-Dinks es de \$12,182 pesos, con el que se pueden construir aproximadamente entre 100 y 150 microchips (\$97 pesos por chip en promedio). Para estos cálculos los precios consideran la cantidad mínima de material y reactivos que se puede adquirir, y se determinó una cantidad aproximada de microchips que se pueden construir con esta mínima cantidad de material y reactivos.

En cuestión de precios se debe ver a futuro, ya que las gotas generadas por fotolitografía suave son aproximadamente entre 8 % y 10 % más pequeñas que las generadas en Shrinky-Dinks, por lo que esta proporción será el mismo que aumente en el gasto de los reactivos cuando se lleve a cabo la reacción enzimática dentro de los microchips.

La construcción de microchips por Shrinky-Dinks es mucho más sencilla y rápida que la fotolitografía suave, ya que para la segunda se necesitan equipos mucho más sofisticados, que no son fáciles de conseguir.

4.5 CONCLUSIONES

Se determinó que el aumento del flujo total en todos los microchips en aproximadamente entre 75 % y 80 %, afecta de manera importante la frecuencia de las gotas, aumentando este parámetro entre 60 % y 70 %. Se determinó también que el aumento en la relación de flujo (agua/aceite) afecta el volumen de las gotas, ya que aumentando esta relación de aproximadamente 0.15 a 1 se aumento el volumen de las gotas de un 50 % hasta un 60 %.

Se concluyó que para el caso de los microchips fabricados por la técnica de fotolitografía suave el dispositivo que mejor funcionó fue el construido con un ancho de canales de 91.6 μm y una profundidad de 82.46 μm . Y en el caso de los construidos por Shrinky-Dinks el que mejor funcionó fue el que se construyó con un ancho de canales de 234.3 μm y una profundidad de 130.1 μm .

Tomando en cuenta todos estos factores, se concluye que el uso de las dos técnicas es recomendable para un experimento como el que se realizó, sin embargo para un análisis cuantitativo de las propiedades de las microgotas es recomendable el uso de la técnica de fotolitografía suave, ya que puede haber una diferencia de hasta 27 % en el volumen de las gotas

en un mismo ensayo dentro de un microchip construido por Shrinky-Dinks. Mientras que en la fotolitografía suave se presenta una diferencia de volumen entre las gotas de hasta 14 %.

Sin embargo, la técnica de Shrinky-Dinks es muy recomendable ya que también ofrece buenos resultados, y es una muy buena forma de hacer análisis cuando se requiere un análisis rápido y no se cuenta con los recursos ni el equipo necesario para realizar fotolitografía suave.

CAPÍTULO 5. ACOPLAMIENTO DE UN HPLC A UN MICROCHIP DE MICROFLUIDOS

5.1 INTRODUCCIÓN A HPLC

La cromatografía líquida es un método de separación en la que se hace pasar una mezcla de componentes líquidos a través de una columna cromatográfica. Esto se hace haciendo pasar una fase móvil que contiene todos los componentes a separar a través de una fase estacionaria que consiste en una columna empacada de partículas sólidas que son las encargadas de la separación de la mezcla [29].

Algunos de los métodos de cromatografía líquida se mencionan a continuación [30]:

- Cromatografía por adsorción. Es el principio que se utiliza en la cromatografía de capa fina, y en columna. Se realiza por medio de un material relativamente polar que es utilizado como fase estacionaria, siendo la sílica la más popular, pero también es muy utilizada la alúmina y el óxido de magnesio y la fase móvil es relativamente no polar.
- Cromatografía en fase inversa. Tiene las siguientes características:
 - a) La fase estacionaria es no polar.
 - b) La fase móvil es relativamente polar.
 - c) Un disolvente polar como el agua eluye mas lentamente que un disolvente menos polar, como el acetonitrilo.
- Cromatografía con fases unidas químicamente. La fase estacionaria está unida a su soporte por una reacción química a través de un enlace covalente. Seleccionando adecuadamente diferentes componentes reaccionantes se pueden generar un gran número de fases estacionarias.
- Cromatografía de intercambio iónico. La fase estacionaria contiene grupos iónicos (por ejemplo, NR^3 , SO^3), que interactúan con los grupos iónicos de la muestra.
- Cromatografía de pares de iones. Se utiliza mucho para la separación de compuestos iónicos. Se resuelven algunos problemas que se presentan en la Cromatografía de Intercambio iónico.
- Cromatografía de exclusión molecular. En este método primero eluyen las partículas más grandes y después las más pequeñas, se utiliza cuando se tienen compuestos con una diferencia de masa molecular de por lo menos 10%. Se subdivide en:
 - a) Cromatografía de permeación en gel. Se usan disolventes orgánicos.
 - b) Cromatografía de filtración en gel. Se usan soluciones acuosas.
- Cromatografía iónica. Se usa principalmente para separar los iones ácidos y bases fuertes (por ejemplo, Cl^- , NO^3 , Na^+ , K^+). Es solo una forma especial de la cromatografía de Intercambio iónico, solo que el equipo utilizado es diferente.
- Cromatografía de afinidad. En este método, las interacciones bioquímicas proporcionan los medios de separación. La fase estacionaria contiene moléculas las cuales solo pueden adsorber las moléculas de la muestra. Se utiliza principalmente para aislar proteínas [30].

Son varias fuerzas tanto físicas como químicas las que son responsables de la retención de solutos en la columna cromatográfica.

Y son las diferencias entre las magnitudes las que determinan la resolución y por lo tanto la separación de los componentes de la fase móvil. Las fuerzas elementales que actúan en la separación son las siguientes:

- 1) Fuerzas de Van der Waals
- 2) Interacciones dipolo
- 3) Interacciones de enlace hidrógeno
- 4) Interacciones dieléctricas
- 5) Interacciones electrostáticas o Coulombianas

Cualquier variable que afecta estas fuerzas intermoleculares influye en el grado de separación obtenida mediante el paso de la fase móvil por la columna cromatográfica.

El HPLC preparatorio solo se refiere al proceso de aislamiento y purificación de compuestos generalmente en cantidades de gramos a miligramos. En este es importante el grado de pureza del soluto y el rendimiento de procesamiento que es la cantidad de compuesto producido por unidad de [31].

El HPLC analítico sin embargo, se enfoca en obtener información de la muestra, como la identificación, cuantificación y resolución del compuesto [31].

En la actualidad la técnica de HPLC ha llegado a ser una de las herramientas más importantes en un laboratorio para la separación y detección de compuestos químicos [32].

Un cromatograma proporciona información tanto cualitativa como cuantitativa: cada compuesto tiene su propia elusión (es decir, la curva que aparece en la pantalla), por lo que el área y la altura son proporcionales a la cantidad de sustancia.

El ejemplo que se muestra a continuación es el cromatograma de la cafeína. La Figura 5.1 muestra el pico de una solución de cafeína de 0.53 mg mL^{-1} .

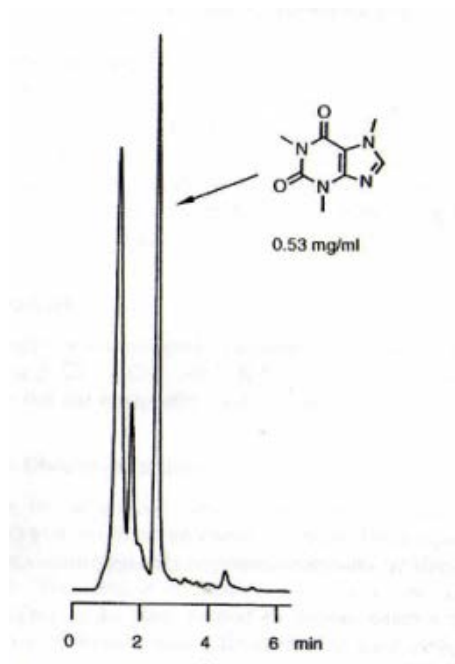


Figura 5.1 Separación por HPLC de cafeína. Condiciones: columna. 15 cm x 2 mm, fase estacionaria. YMC 120 ODS-Aq, 3 μM ; fase móvil, 0.3 ml min^{-1} agua-acetonitrilo (8:2). Tomada de [30]

Un HPLC puede ser diseñado y construido como un conjunto de módulos pero también como un único equipo. El concepto de los módulos es más flexible en caso de falla, ya que si llega a fallar solo es un módulo el que presenta dicho fallo. Además de que las piezas no necesariamente deben ser del mismo fabricante.

Los elementos básicos del HPLC son lo que se muestran en la Figura 5.2: Depósito del disolvente, línea de transferencia, bomba de alta presión, dispositivo de inyección de la muestra, la columna cromatográfica, el detector, el registrador de datos generalmente junto con el evaluador de datos. Aunque la columna es por lo general la parte más pequeña, es la más importante. Por lo general se usa un termostato para controlar la temperatura. Si la adquisición de datos se hace mediante un ordenador, este también se puede usar para controlar todo el sistema.

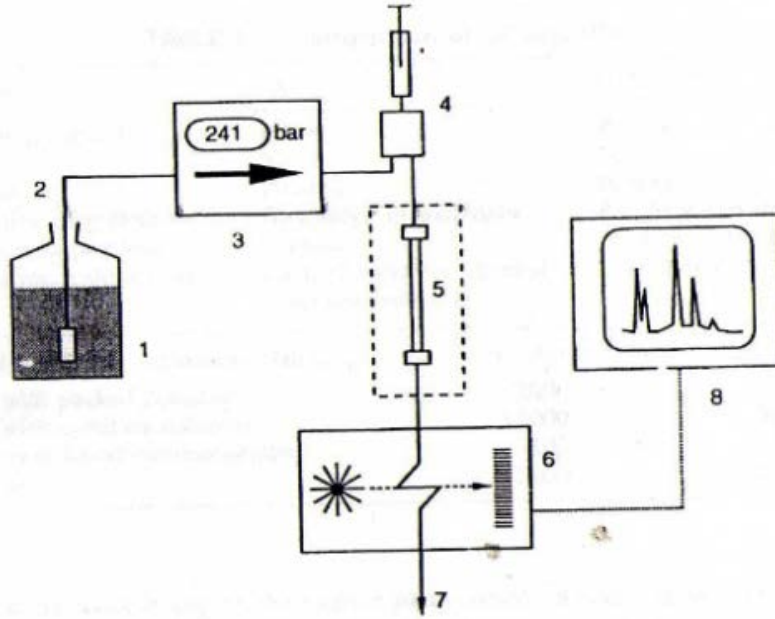


Figura 5.2 Diagrama esquemático de una unidad de HPLC. 1=Depósito de disolvente; 2=Línea de transferencia; 3=Bomba (con manómetro); 4= Inyección de muestra; 5= columna (con termostato); 6= Detector; 7= Residuos; 8= Adquisición de datos. Tomado de [29]

5.2 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO QUE PERMITA ACOPLAR UN HPLC A UN MICROCHIP MICROFLUIDICO

En este trabajo se planeó acoplar un equipo de HPLC a un microchip que se utiliza para la formación de microgotas. Esto se hace con el objetivo de que las microgotas generadas en los microchips funcionen como microreactores en los que los diferentes compuestos químicos separados de forma rápida por el HPLC se mezclen con los componentes de una reacción enzimática. Entre los productos de esta reacción se encuentra un compuesto fluorescente que puede reportar el grado de inhibición de la reacción por parte de los compuestos separados por el HPLC. Un esquema de esta metodología se muestra en la Figura 5.3.

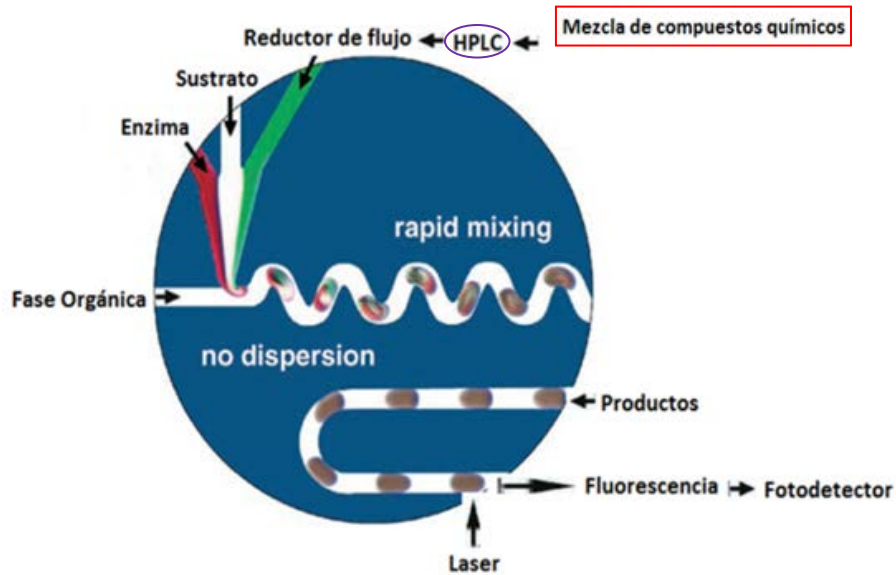


Figura 5.3 Se muestra el funcionamiento esencial del sistema para este trabajo, donde se observa la función que tiene el HPLC, que es el de inyectar, varios compuestos químicos separados de forma rápida, hasta que alguno inhiba la fluorescencia en la reacción. Modificada de [33]

En esta parte hay que mencionar que el HPLC con el que se cuenta para este trabajo maneja flujos de salida en unidades de mL min^{-1} , y cabe señalar que el flujo mínimo que se recomienda manejar es de aproximadamente 0.1 mL min^{-1} , ya que es el flujo mínimo reportado al que el HPLC todavía hace una buena separación de los compuestos de la fase acuosa. Esto representa un problema para trabajar con los microchips, ya que estos funcionan con flujos en unidades de $\mu\text{L hr}^{-1}$. Por lo tanto, se debe diseñar un dispositivo que permita reducir el flujo de salida, del HPLC para acoplarlo a los microchips.

Este dispositivo se diseñó y fabricó con la misma técnica de los microchips mencionados anteriormente. A continuación se describen algunas particularidades.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 PRIMER DISEÑO

Se consideró un diseño, el cual es independiente al microchip con 8 divisiones simétricas como el que se muestra en la Figura 5.4.

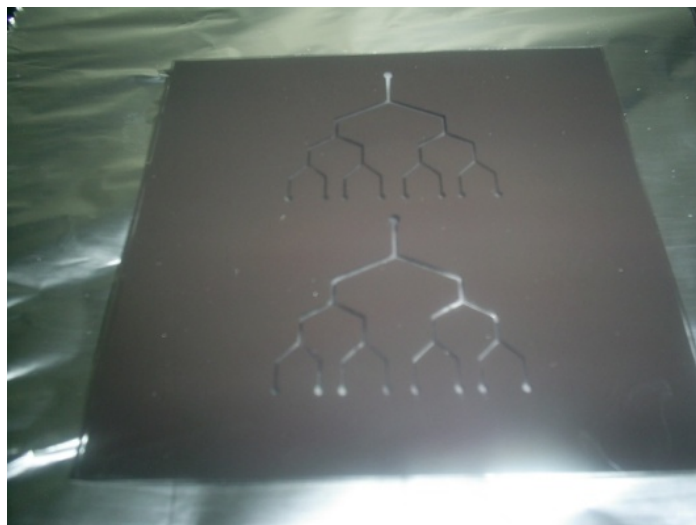


Figura 5.4 Diseño de dispositivo de reducción de flujo, en una máscara para ser construido por fotolitografía suave. Tiene una entrada y 8 salidas.

Después de realizar el procedimiento de construcción por la técnica de fotolitografía suave, se conectó el dispositivo a una microbomba en la cual se simula el flujo del HPLC, estableciendo un flujo de 0.1 mL min^{-1} . En la Figura 5.5 se aprecia ya un dispositivo en funcionamiento en donde se observa la división del flujo y se aprecia que esta división se forma de manera eficiente.

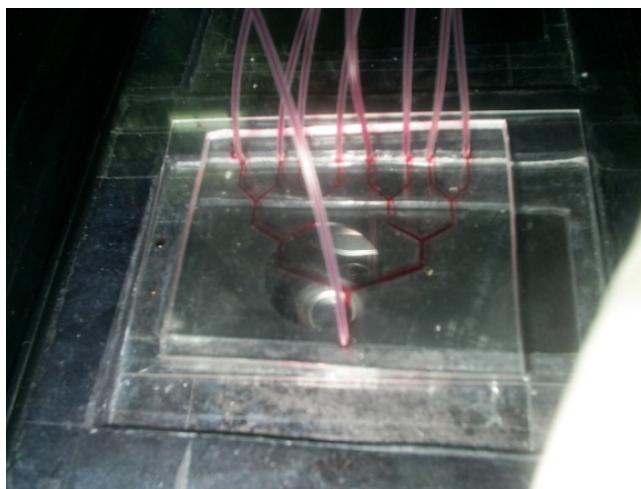


Figura 5.5 Dispositivo de división de flujo puesto en funcionamiento, se aprecia que la división de flujo se lleva a cabo de forma adecuada

Una de las salidas del dispositivo se conectó a la entrada central de fase acuosa de un microchip que sirve para formar microgotas como el mostrado en la Figura 4.2. Las otras dos entradas de agua provienen directamente de dos microbombas y corresponden a agua con colorantes naturales. A pesar de múltiples intentos, nunca se pudo establecer un control adecuado en los flujos para formar las gotas, ya que se apreció que la resistencia en la salida del dispositivo de división de flujo que se conecta al microchip es mucho mayor, que en las salidas que están a la atmósfera. Por tal razón, la corriente proveniente del divisor no fluye de manera correcta y los otros dos líquidos que venían directamente de jeringas conectadas a las bombas invadían al canal que tenía el líquido proveniente del dispositivo de reducción de flujo.

Después de este problema se decidió disminuir el número de salidas abiertas del dispositivo, probando dispositivos con 2, 3 y 4 salidas con el fin de ver si haciendo esto la presión del flujo procedente del dispositivo divisor aumentaba. En la Figura 5.6, se puede observar un dispositivo con solo 2 salidas y una de ellas conectada al microchip de formación de microgotas. A pesar de haber reducido el flujo solo a la mitad y observar que los flujos en las dos salidas eran estables, al momento de conectar una de las salidas al microchip de microgotas, el flujo que entra al microchip se desestabiliza rápidamente, y los otros dos flujos de fase acuosa lo invaden, lo cual es sumamente complicado revertir.

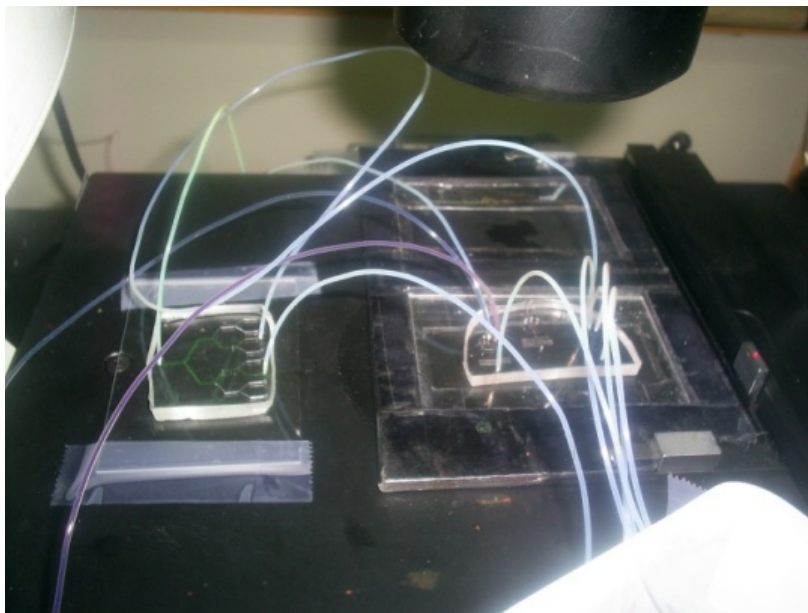


Figura 5.6 Conexión entre el dispositivo de reducción de flujo con solo dos salidas, una de las cuales está conectada al microchip elegido que se construye por fotolitografía suave.

De tal manera que a pesar de que solo fueron dos salidas en el dispositivo divisor de flujo, no se logra una estabilidad en la presión de los flujos dentro del microchip de microgotas, ya que la resistencia sigue siendo mucho mayor en la salida conectada al microchip que la salida que está a la atmósfera. Cabe señalar que en este caso se lograron formar microgotas pero solo con los flujos de agua laterales, mientras el flujo del divisor de flujo estaba invadido, como se observa en la Figura 5.7.

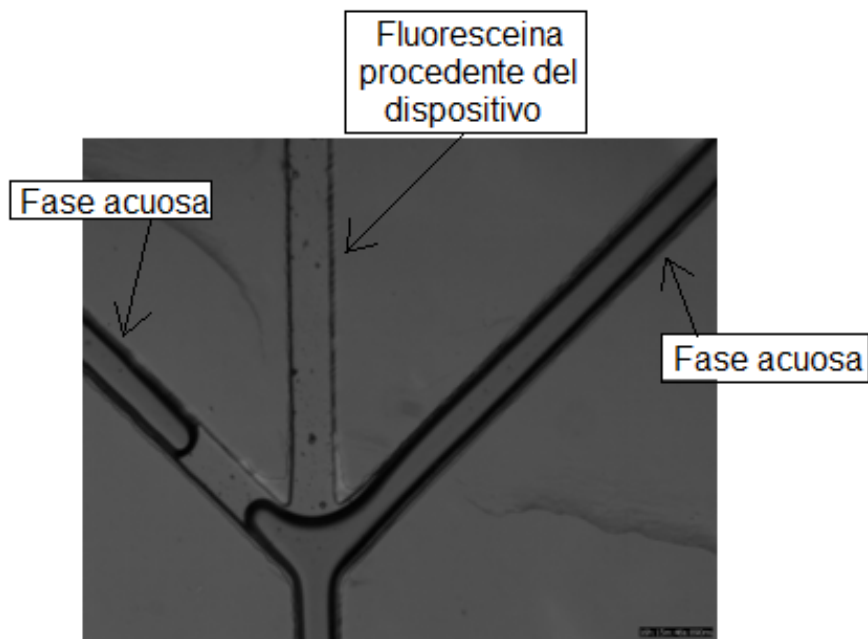


Figura 5.7 En esta imagen se puede observar que no se logra una estabilidad entre los flujos, ya que los flujos provenientes de las microbombas invaden al flujo proveniente del dispositivo, a pesar de aumentar el flujo, la presión sigue siendo mucho menor

Se concluyó que este dispositivo divisor no es eficiente para acoplar el HPLC a los microchips para microgotas, ya que la resistencia ejercida por el microchip conectado es mucho mayor que la que ejerce la atmósfera en la salida que no se conecta. Para tratar de revertir este comportamiento, se probó aumentar el flujo del dispositivo divisor hasta 0.15 mL min^{-1} , 0.2 mL min^{-1} y 0.3 mL min^{-1} , pero el resultado fue el mismo: el imposible control de la presión de los flujos y por lo tanto, que no se pudieran generar microgotas correctamente con los tres flujos.

5.3.2 SEGUNDO DISEÑO

Se diseñó un dispositivo con un principio diferente, ya que después de probar el primer dispositivo de reducción se creyó que la distancia que tiene que recorrer el flujo en microtubería afecta, ya que recorre primeramente la distancia que conecta la bomba (que simula el flujo del HPLC) al dispositivo de reducción de flujo, y además la microtubería que conecta la salida del dispositivo de reducción de flujo con el microchip de microgotas. Esta razón combinada con la presión ejercida por los flujos provenientes directamente de las microbombas afectaría el funcionamiento del dispositivo. Por lo que se diseñó un dispositivo de reducción de flujo que se introduce en el microchip a utilizar como se muestra en la Figura 5.8

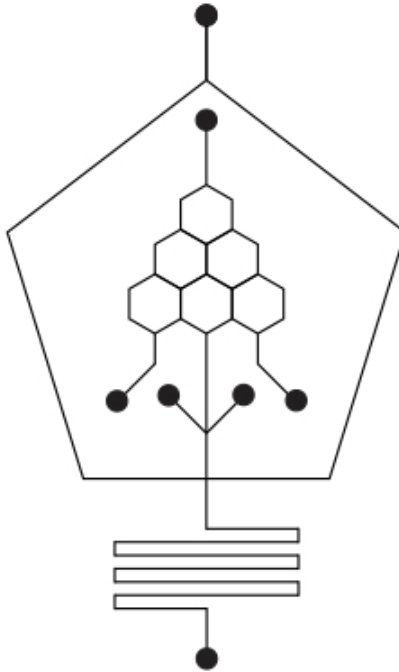


Figura 5.8 Diseño del reductor de flujo dentro del microchip.

A pesar de que este dispositivo se realizó con el objetivo de poder controlar de mejor forma la presión, el resultado fue muy similar a lo observado anteriormente, ya que los flujos de los canales laterales tienden a invadir el canal que procede del diseño de división de flujo, aunque este se encuentre dentro del mismo microchip, como se muestra en la Figura 5.9

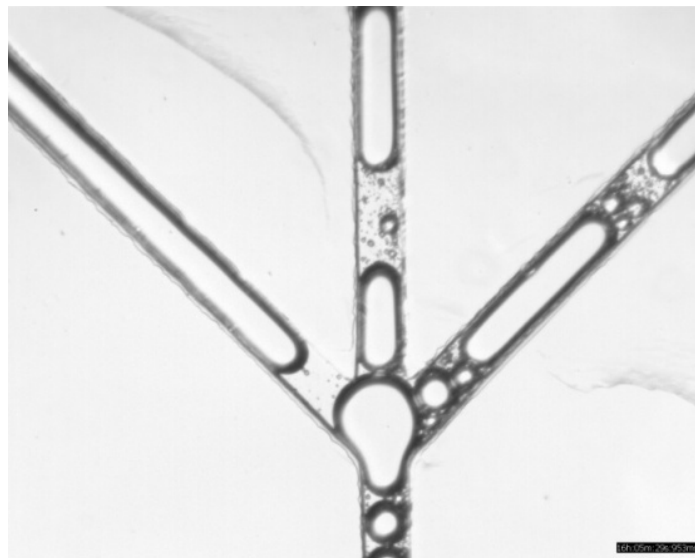


Figura 5.9 Se aprecia como no existe una estabilidad en los flujos, los provenientes de los costados tienden a invadir de manera muy fácil del canal del centro que proviene del diseño de división de flujo

Aún cuando se aumentó de forma considerable el flujo de la bomba que simula el flujo del HPLC, la resistencia ejercida por el microcanal proveniente del dispositivo reductor de flujo es mucho mayor que las dos salidas a la atmósfera, por lo que es muy difícil tener un flujo estable en este canal y consecuentemente los dos canales laterales lo invaden.

5.4 ANÁLISIS DE RESULTADOS

A pesar de que los divisores de flujo funcionan adecuadamente cuando están aislados, al conectar alguna de las salidas al microchip de microgotas, este ejerce mucha resistencia al flujo y por lo tanto la mayor cantidad de flujo prefiere irse a las otras salidas con menor resistencia. En el caso del segundo diseño el resultado fue el mismo, el flujo de salida por las tres salidas era muy parecido antes de iniciar un flujo de las dos fases acuosas laterales, pero al empezar a funcionar con ellas, el flujo central del dispositivo disminuyó considerablemente aumentando los otros dos flujos de salida. Este aumento en la resistencia ejercida por el microchip no permite lograr una estabilidad dentro de este. Aunque en algunos casos se lograron hacer microgotas, no se logró que estas se formen de manera estable e incluyendo los tres componentes.

5.5 SUGERENCIAS

Después de haber observado los resultados, se sugiere construir un dispositivo el cual permita reducir el flujo sin tener que dividirlo, es decir algo que permita poder abrir y cerrar el flujo como una microválvula, la cual funcione con un mecanismo electrónico o manual el cual permita abrir y cerrar dicha válvula.

5.6 CONCLUSIONES

Después de haber diseñado y construido dos dispositivos de reducción del flujo de salida de un HPLC, se concluye que no es la manera adecuada para generar microgotas a partir del HPLC.

CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo se logró caracterizar el proceso de construcción de moldes para dispositivos de microfluidica través de la técnica de Shrinky-Dinks y de fotolitografía suave. Se adecuaron los materiales y equipos logrando establecer una metodología reproducible para ambos métodos. También se logró establecer una técnica para la preparación de PDMS con el que se construyen los microchips utilizando los moldes fabricados a partir de las técnicas ya mencionadas.

Se lograron caracterizar los canales de los microchips construidos, obteniendo las medidas exactas de profundidad y ancho de los microcanales y verificando la precisión de los métodos de construcción con ayuda del Polytec MSA-40. Se observó una geometría de semicírculo para los microcanales construidos por Shrinky Dinks, mientras que los fabricados por fotolitografía suave mostraron una geometría rectangular.

A pesar de que las dimensiones reales de los canales construidos con la técnica de Shrinky-Dinks fueron muy diferentes a las que se diseñaron en el software, se encontró que el error producido es a consecuencia de no contar con una impresora con la resolución necesaria para llegar a un ancho de canales menor a 234.3 μm . Sin embargo, con el trabajo mostrado en esta tesis, es posible predecir el tamaño de los canales con respecto al diseño que se realice.

En el caso de los microcanales construidos con la técnica de fotolitografía suave se presentó también una diferencia entre el tamaño real y el diseñado, esto debido a que se pierde la escala al pasar de cualquiera de los dos programas de diseño empleados a formatos de archivos PDF. Sin embargo, ahora también es posible predecir el tamaño final de los canales con respecto al diseño que se realice. El límite inferior en el ancho de los canales por litografía suave (considerando tener canales sin tanta rugosidad ni tantas imperfecciones) es de 91.6 μm .

En este trabajo, se encontró que las condiciones óptimas de operación del horno de plasma fue a un tiempo de operación de 0.3 minutos y con una potencia de 35 Watts, con lo cual se logró que el PDMS se pegara a la superficie de vidrio. Estas condiciones permiten la oxidación necesaria de las dos superficies para que se peguen, y que no se presente la sobreoxidación que afecta la adherencia de estas superficies.

Se lograron generar microgotas de forma muy estable utilizando cualquiera de los dos métodos de microfabricación, las cuales tienen características que benefician el análisis dentro de los microchips, tales como una frecuencia y volúmenes estables.

La caracterización de las microgotas formadas dentro de los microchips reveló que cuando se cambia de forma gradual el flujo total (agua + aceite) dentro del dispositivo, la frecuencia de las microgotas aumenta de forma proporcional, mientras que el volumen de las gotas disminuye también de forma proporcional. Por otro lado, cuando se cambió de forma gradual la relación de flujo entre la fase acuosa y la fase orgánica, se observó que aumentando la relación de flujo (agua/aceite), la frecuencia de gotas no varía mucho (menos del 6 %), pero el volumen de las gotas si aumenta considerablemente (50 a 60 %).

Se logró determinar que las dos técnicas ofrecen una serie de ventajas y desventajas con respecto a la otra técnica, por ejemplo la técnica de Shrinky Dinks es bastante más económica que la fotolitografía suave. También la construcción por Shrinky-Dinks es mucho más rápida y no necesita equipos muy especializados a diferencia de la fotolitografía Suave.

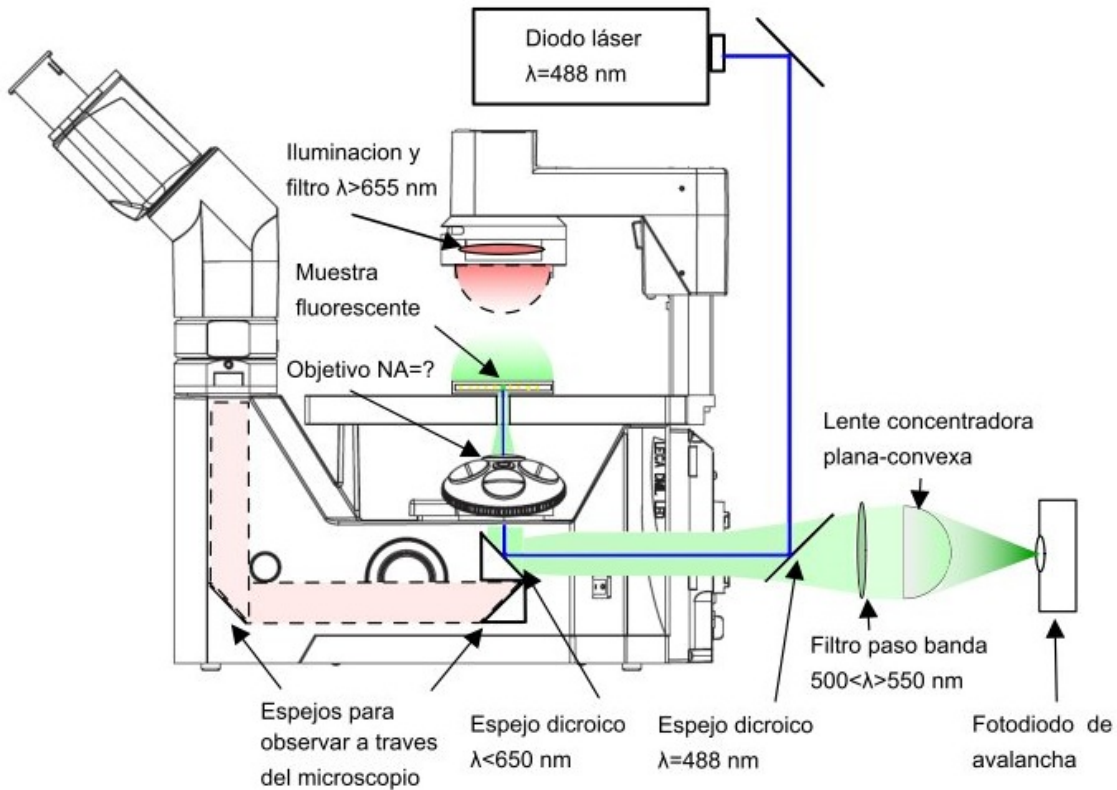
Por otra parte la construcción a través de la técnica de fotolitografía suave ofrece ventajas como que los canales quedan con menos rugosidades, permite un mejor control de la frecuencia, una mayor homogeneidad en el volumen de las gotas generadas (14 % de diferencia vs. 27% a las generadas en un chip construido por Shrinky-Dinks) y finalmente un volumen en promedio 8 % a 10 % menor que el de las gotas formadas en microchips construidos por Shrinky-Dinks. Por tal razón cuando se necesita hacer análisis cuantitativos funciona mejor la técnica de fotolitografía suave.

En este trabajo se pusieron en funcionamiento dos dispositivos reductores de flujo que se utilizarían para acoplar un dispositivo de HPLC a los microchips, llegando a la conclusión de que ninguno de los dos es factible para la construcción de un dispositivo de esta naturaleza ya que en ninguno se llegó a un estabilidad de los flujos y no se lograron formar microgotas de forma eficiente.

Finalmente se concluye que se lograron establecer bases firmes para poder diseñar y construir microchips de manera confiable por dos métodos diferentes, estableciendo una metodología confiable y reproducible en los dos métodos. Estos microchips posteriormente permitirán llevar a cabo reacciones químicas o enzimáticas en microgotas, las cuales se pueden analizar por separado.

Se puede concluir también que se generó un método eficaz para la comparación del funcionamiento de los microchips, el cual permite elegir entre uno y otro para la generación de microgotas.

ANEXO A. SISTEMA DE FLUORESCENCIA LASER EXPERIMENTAL



El sistema láser para detectar la fluorescencia fue montado en el laboratorio por el Ing. Benjamín Vázquez como parte de su proyecto de maestría. A continuación se muestra un esquema y una explicación del montaje tomado del borrador de su tesis con su permiso. “En esta imagen se presenta el arreglo fluorescente experimental. En este la luz proviene de un diodo láser que tiene una longitud de onda = 488 nm. El haz de luz láser incide en un espejo dicroico (mostrado en 3.7.1) que al ser de banda angosta permite el paso de luz y refleja únicamente el haz del láser hacia un segundo espejo dicroico (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 $> 650\text{ nm}$. 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 la refleja y la envía hacia el espejo dicroico número 1(3.7.1) el cual la transmite hacia un tercer filtro (3.7.3), cuya función es transmitir únicamente la luz emitida por fluorescencia. Una vez que esta luz atraviesa este último filtro se dirige a una lente concentradora que se enfoca sobre un fotodiodo de avalancha, el cual manda la señal a una tarjeta de conversión de datos” [27].

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Victor L. Streeter, E. Benjamín Wilie. *"Mecanica de fluidos"*. McGraw Hill. 8va. Edición. 1988.
- [2] Robert L. Mott. *"Mecánica de Fluidos"*. Pearson Education. 6ta edición. México 2006
- [3] Andrew J. deMello. *"Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems"*. Nature. Vol 442/27 July 2006. PP: 394-302
- [4] Patrick Tabeling. *"Introduction to Microfluidics"*. Oxford University Press. 1995
- [5] Paul McWorther. (2003). *"About MEMS"*. [WWW].URL: www.memx.com
- [6] Todd M. Squires, Stephen R. Quake. *"Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale"*. Reviews of modern physics, Volume 77, July 2005. PP: 977-1026
- [7] Sandia National Laboratories. (2007) *"Sandia MEMS Bug"*. [WWW].URL: http://he.wikipedia.org/wiki/%D7%A7%D7%95%D7%91%D7%A5:Sandia_MEMS_bug_1b.jpg
- [8] Sandip Ghosal. *"Microfluidics"*. Department of Mechanical Engineering, Northwestern University, 2145 Sheridan Rod, Evanston, IL 60208
- [9] Sara Reedy. (Agosto, 2010). *"MEMS the Word"*. [WWW].URL: http://www.lightreading.com/blog.asp?blog_sectionid=958&doc_id=195905
- [10] Keith E. Harold, Avraham Rosooly. *"Lab-on-a-chip Technology (Vol 1): Fabrication and microfluidics"*. Caister Academic Press. August 2009.
- [11] Diskr Janasezk, Jucham Franzke and Andreas Manz. *"Scaling and the design of miniaturized chemical analysis systems"*. Nature Publishing Group. Vol 442/27 July 2006. PP: 374-380
- [12] James Q. Boedicker, Liang Li, et. al. *"Detecting bacteria and determining their susceptibility to antibiotics by stochastic confinement in nanoliter droplets using plug-based microfluidics"*. Lab on a Chip. Vol. 8. 2008. PP: 1275-1282
- [13] B.H. Lapizco-Encinas. Revista Mexicana de Ingeniería Química. Vol 7, No. 3, 2008
- [14] Mark J. Jackson, M. Eng. *"Micro and Nanomanufacturing"*. Purdue University. Ed. Springer. United States. 2007.
- [15] Edited by William J.B. Zimmerman. *"Microfluidics: History, theory and applications"*. Springer wien Ney York. 2006. PP: 13-17
- [16] *"La Litografía"*. [WWW].URL: http://www.artemiranda.com/tutoriales/tut_litografia.htm
- [17] Mark J. Madou. *"Fundamentals of Microfabrication. The Science of miniaturization"*. CRS Press. Second edition. 2001.
- [18] Chang Liu. *"Recent developments in Polymer MEMS"*. Advanced Materials, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Vol 19. 2007. PP: 3783-3790
- [19] Anthony Grimes, David N. Breslauer, et. al. *"Shrinky-Dink microfluidics: rapid generation of deep and rounded patterns"*. The Royal Society of Chemistry. 2008. PP: 170-172

- [20] Kenny Chau, Brent Millare, et. al. *"Dependence of the quality of adhesion between poly(dimethylsiloxane) and glass surfaces on the composition of the oxidizing plasma"*. *Microfluidics and Nanofluidics*. Vol. 10. 2011. PP: 907-917
- [21] Y. Milántiev, S. Temkó. *"Física del plasma"*. Editorial Mir Moscú. 1983
- [22] *"Plasma Technology"*. Electronic Diener. Second Edition. Germany 2008.
- [23] Xavier Casadevall i Solvas, Monpichar Srisa-Art, *"Mapping of fluidic Mixing in Microdroplets with 1 μ m, Time resolution Using Fluorescence lifetime Imaging"*. *Journal of Visualized Experiments*. Vol. 82. 2010. PP: 1-7
- [24] Luis M. Fidalgo, Graeme Whyte, et. al. *"From Microdroplets to Microfluidics: Selective Emulsion Separation in Microfluidic Devices"*. Inter Science. Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. Vol. 47. 2008 . PP: 2042-2045
- [25] Ansgar Huebner, Luis F. Olguin, et. al. *"Development of Quantitative Cell-Based Enzyme Assays in Microdroplets"*. *Analytical Chemistry*, Vol. 80, No. 10. 2008. PP: 3890-3896
- [26] Fabienne Courtois, Luis F. Olguin, et. al. *"An integrated Device for monitoring Time-Development in Vitro Expresion From Single Genes in Picolitre Droplets"*. Wiley-VCH Verlag GmbH& Co. KGaA, Weinheim. Vol 9. 2008. PP: 439-446
- [27] Benjamín Vázquez. *"Sistema de fluorescencia laser para medición continua de fluorescencia dentro de microgotas"*. Proyecto de tesis de maestría. Facultad de Ingeniería UNAM.
- [28] Fabienne Courtois, Luis F. Olguin, et. al. *"Controlling the retention of small Molecules in Emulsion Microdroplets for use in Cell-Based Assays"*. *Analytical Chemistry*, Vol. 81, No. 8. 2009. PP: 3008-3016
- [29] A. Fallow. R.F.G Boot, et. al. *"Applications of HPLC in Biochemistry"*. Ed. Elsevier, Vol. 17 1993
- [30] Veronika R. Meyer. *"Practical High performance liquid chromatography"*. Ed Wiley. 4th. Edition
- [31] Vandecasteele Karel, Gaus Irina, et. al. (Julio 2000) *"HPLC (High-performance Liquid Chromatography)"*. [WWW].URL: <http://html.rincondelvago.com/hplc.html>
- [32] Rubén Darío Cortez. *"Cromatografía de Líquida de Alta Eficiencia"*. [WWW].URL: <http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/hplc.htm>
- [33] Helen Song, Delai L. Chen, et. al. *"Reactions in Droplets in Microfluidic Channels"*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 2006. PP: 7336-7356