



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Fabricación de chips microfluídicos por
fresado CNC

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Físico

PRESENTA:

Francisco Páez Larios

TUTOR

Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille.

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2019





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.

Resumen

El presente trabajo tiene como objetivo el desarrollo de un protocolo de fabricación de chips microfluídicos en PMMA y PDMS por fresado CNC, una técnica de manufactura sustractiva que además de permitir el prototipado ultra rápido ha mostrado ser compatible con la producción a escala (300-2000 piezas/mes) de dichos componentes. El protocolo desarrollado para la fabricación de chips de PDMS consiste en el maquinado de un micro molde en PMMA que se replica por litografía suave en PDMS, esta réplica es sellada sobre vidrio, resultando así un circuito de microcanales cerrados. En PMMA la fabricación es directa, los microcanales se maquinan sobre el plástico que luego se sella sobre un sustrato plano del mismo material empleando etanol, presión y temperatura.

En el capítulo uno se presenta la microfluídica y la tecnología Lab-On-Chip como alternativa a los protocolos tradicionales para manejo de líquidos en investigación biomédica. Debido a que las ventajas de la microfluídica provienen de la reducción de la escala y el dominio de las fenómenos que dependen del área superficial sobre el volumen, es crítico para este proyecto caracterizar la rugosidad de las estructuras producidas así como su tamaño.

En el capítulo dos se describe el proceso de fabricación de los dispositivos Lab-On-Chip y se hace énfasis en el fresado CNC como alternativa a la fotolitografía para la manufactura de chips microfluídicos en PMMA y PDMS, los dos polímeros más usados en microfluídica. El capítulo tres comprende el desarrollo y los resultados de este trabajo.

Para optimizar la rugosidad y disminuir el tiempo de maquinado de los moldes y los microcanales, se caracterizaron dichas variables en términos de los parámetros de corte; se determinó que la rugosidad depende del diámetro de la fresadora, la velocidad de giro y la velocidad de desplazamiento; se encontró que controlando estos parámetros es posible obtener una superficie de rugosidad inferior a los 80 nm.

La caracterización de la resolución y exactitud del proceso de fresado se realizó maquinando pilares de sección transversal cuadrada cuyo lado se varió de 1mm a $10\mu\text{m}$. Se encontró una relación lineal y un desplazamiento de $30\mu\text{m}$ entre las dimensiones diseñadas y las dimensiones maquinadas.

Para los chips en PDMS, se mostró que la litografía suave es compatible con micromoldes de PMMA y cómo al tratarlos con solvente en forma de vapor se puede disminuir su rugosidad y mejorar el sellado de los microcanales.

La parte más delicada de la fabricación en PMMA es el sellado de los microcanales. Para este proceso, se encontraron los parámetros de presión, solvente y temperatura para producir chips sellados adecuadamente; se encontró que un punto crítico de esta etapa es no usar PMMA producido por extrusión.

Finalmente, se discute el atractivo y la importancia del desarrollo de estos protocolos, con respecto a las necesidades de un laboratorio como en el que se llevó a cabo esta investigación. Además, se presenta una aplicación de sumo interés donde se utilizaron los chips fabricados por estas vías.

Agradecimientos

Al Dr. Mathieu Hautefeuille, por su apoyo, crítica, y absoluta confianza. Aún cuando todo falla y nada sale, se puede aprender mucho.

A Lars Christensen, por sus invaluable tutoriales en diseño CAD y CAM en YouTube.

A Félix Cerón, Daniela Margarito, y Diego Zamarrón, por su ayuda en la caracterización por perfilometría de contacto y por tomografía de coherencia óptica.

A Ximena Monroy, por su ayuda en la preparación de PDMS y seguridad en el manejo de reactivos.

A Verence Bautista, Tatiana Fiordeliso, Natllely García, Jehú López y Cindy Peto, por el extenuante trabajo alrededor del biosensor de glucosa-insulina.

A mi jurado de tesis por sus correcciones, sugerencias a mi trabajo y su pronta respuesta a mis solicitudes.

A todos mis compañeros de μ NTec, por las pláticas, críticas y discusiones.

A María José Gonzáles, por sus correcciones de ortografía y uso del español.

Índice general

Resumen	III
Agradecimientos	V
Introducción	1
1. Microfluídica, Dispositivos Lab-On-Chip y Point-of-Care	3
1.1. Dispositivos Lab-On-Chip	3
1.2. Microhidrodinámica	6
1.2.1. Leyes de escalamiento	7
1.2.2. Ecuación de Stokes	8
1.2.3. Presión, tasa de flujo y resistencia microfluídica	12
1.3. Dispositivos Point-of-Care	14
1.4. Obstáculos para la tecnología LoC y PoC	15
2. Fabricación de chips microfluídicos	17
2.1. Orígenes	17
2.2. Prototipado ultra rápido	18
2.3. Microfresado CNC	19
2.4. Fabricación de chips microfluídicos poliméricos por fresado CNC	20
2.5. Objetivo de este trabajo de tesis	23
3. Desarrollo y Resultados	25
3.1. Operación del equipo de microfresado CNC Minimill4	25
3.1.1. Diseño en CAD y CAM	26
3.1.2. Preparación del equipo	27
3.1.2.1. Sujeción de la pieza de trabajo	27
3.1.2.2. Sistema de coordenadas sobre la pieza de trabajo	27
3.1.2.3. Maquinado de la pieza	29
3.2. Caracterización	29
3.2.1. Caracterización de la Rugosidad	31
3.2.1.1. Rugosidad y Ondulación	31
3.2.1.2. Coeficientes de Rugosidad	34
3.2.1.3. Resultados	34
3.2.1.4. Discusión	39
3.2.2. Caracterización de la resolución	41
3.2.2.1. Resultados	41
3.2.2.2. Discusión	44
3.3. Litografía suave y chips microfluídicos de PDMS	45
3.3.0.1. Resultados	47
3.3.0.2. Discusión	50
3.4. Chips microfluídicos de PMMA	51
3.4.0.1. Resultados	54

3.4.0.2. Discusión.	61
3.5. The big picture: Dispositivo Point-of-Care para detección dual de glucosa insulina	62
3.5.1. Contexto	62
3.5.2. Chip microfluídico y reacciones de detección	63
3.5.3. Preparación del chip	65
3.5.4. Detección electroquímica	66
3.5.5. Detección de fluorescencia	68
4. Conclusiones y perspectivas	69
A. Apéndice A: Procedimiento de operación del equipo de fresado CNC MiniMill4	71
B. Apéndice B: Procedimiento de elaboración de PDMS.	73
Bibliografía	75

Índice de figuras

1.1.	Composición esquemática de un dispositivo Lab-On-Chip.	4
1.2.	Ejemplo de un ensayo de electroforesis completamente integrado en un dispositivo Lab-On-Chip[8], nótese la presencia de microcanales, electrónica, calentadores, sensores de temperatura y control neumático.	5
1.3.	Enfoque chip in a Lab, a) Arreglo experimental alrededor de un chip, b) Chip altamente integrado para amplificación de material genético [16].	15
1.4.	Dispositivo <i>Point of Care</i> ideal. Acondicionamiento de la muestra, microfluídica, instrumentación y detección en un solo dispositivo portable, desechable y de bajo costo. [17].	16
2.1.	Proceso de fabricación por fresado CNC [28]	19
2.2.	Etapas de fabricación de un chip microfluídico en PDMS o termoplásticos. [29]	21
2.3.	Proceso de fabricación de un chip microfluídico en PDMS o en PMMA por microfresado CNC.	22
2.4.	Equipo MiniMill 4 de fresado CNC empleado en este trabajo.	24
3.1.	Proceso de fabricación de chips microfluídicos por fresado CNC y objetivos particulares de este trabajo.	25
3.2.	Flujo de trabajo para el modelado en 3D de un cilindro.	26
3.3.	Flujo de trabajo para el modelado CAM de una pieza	27
3.4.	Métodos de sujeción de la pieza a la mesa de trabajo.	28
3.5.	Sistemas de coordenados en un equipo CNC	28
3.6.	Arreglo para fijar el sistema de coordenadas de trabajo.	30
3.7.	Resultados preliminares: Pozos y microcanales en un portaobjetos de PMMA	31
3.8.	Estructura de cavidades cuadradas para evaluar la rugosidad.	31
3.9.	Parámetros de corte (feedrate,vel. spindle) empleados en cada cavidad para evaluar la rugosidad con las distintas fresadoras.	32
3.10.	Muestras de PMMA maquinadas.	33
3.11.	Perfilometría de contacto.	33
3.12.	Perfil primario (azul) y sus componentes de ondulación (rojo) y rugosidad (verde).	34
3.13.	Rugosidad R_a con la fresadora de $127\ \mu m$	35
3.14.	Rugosidad R_q con la fresadora de $127\ \mu m$	35
3.15.	Rugosidad R_a con la fresadora de $254\ \mu m$	36
3.16.	Rugosidad R_q con la fresadora de $254\ \mu m$	36
3.17.	Rugosidad R_a con la fresadora de $381\ \mu m$	37
3.18.	Rugosidad R_q con la fresadora de $381\ \mu m$	37
3.19.	Rugosidad R_a con la fresadora de $3,17mm$	38
3.20.	Rugosidad R_q con la fresadora de $3,17mm$	38
3.21.	Rugosidad R_a y R_q Como función del feedrate.	40
3.22.	Modelo CAD para evaluar la resolución.	41
3.23.	Pieza maquinada para evaluar la resolución.	42
3.24.	Pieza maquinada para evaluar la resolución.	43

3.25. Perfil de altura de los pilares por OCT	44
3.26. Medición de la altura de los pilares por OCT comparada con su altura esperada.	44
3.27. Litografía suave en PDMS[44].	46
3.28. Dimensión medida en la réplica en PDMS contra la dimensión del micromolde.	47
3.29. Molde en PMMA, su réplica en PDMS y chip sellado en vidrio.	48
3.30. Arreglo para aplicar un tratamiento con vapor de acetona a 40C para pulir el PMMA(El PMMA puede sostenerse empleando un trozo de cinta doble cara o un par de imanes, uno sobre el PMMA y otro sobre la caja petri).	49
3.31. Efecto del vapor de acetona en PMMA.	49
3.32. Comparación de la calidad de sellos que se obtiene gracias al tratamiento con vapor de acetona	50
3.33. Esquema del método 1.	52
3.34. Esquema del método 2.	53
3.35. Prensa de tornillo para aplicar presión.	53
3.36. Calidad de adhesión lograda empleando cloroformo.	54
3.37. Chip en PMMA fabricado con el método 1 usando una prensa neumática.	55
3.38. V:80 μ L etanol 100 %, P: 4bar,T: 70C t: 2min	56
3.39. V:300 μ L etanol 100 %, P: 4bar,T: 70C t: 2min	57
3.40. Arreglo para homogeneizar la presión usando una placa de unicell.	57
3.41. V:300 μ L etanol 100 %, P: 4bar,T: 70C t: 2min y bloque de unicell.	58
3.42. V:300 μ L etanol 100 %, P: 4bar,T: 70C t: 2min, un bloque de unicel y nuevo lote de PMMA	59
3.43. Ajustes al protocolo de pegado y sus resultados.	60
3.44. Esquema de detección de insulina[51]	64
3.45. Chip de detección dual.	65
3.46. Electrodo de fabricación propia(izquierda) electrodo comercial(derecha).	66
3.47. Corriente eléctrica en los electrodos de medición como función del tiempo[52]	67
3.48. Corriente eléctrica en los electrodos de medición como función del tiempo[52]	67
3.49. Curva de corriente en el fotodetector en función de la concentración de fluoresceína.	68
4.1. Chips microfluídicos fabricado gracias a este trabajo de tesis.	70

Índice de tablas

1.1. Comparación entre macro y microflujo	7
1.2. Magnitudes físicas y su dependencia.	8
1.3. Magnitudes físicas típicas en microfluídica.	8
1.4. Escalamiento de los términos en la ecuación NS	10
1.5. Velocidad, resistencia y tasa de flujo según su sección transversal	13
2.1. Propiedades de los polímeros comúnmente usados en dispositivos microfluídicos[29].	20
3.1. Parámetros de corte preliminares	30
3.2. Parámetros óptimos de corte para minimizar la rugosidad en una rutina de maquinado.	39
3.3. Parámetros de los ajustes lineales para cada eje.	44

Introducción

La salud es un privilegio del que no todos los ciudadanos gozan. En la última década, a nivel global, se han alcanzado importantes logros tales como el suministro masivo de vacunas, la mejora de la salud materno-infantil, la casi erradicación de la poliomielitis, una disminución del 50 % en la tasa de mortalidad por VIH y una reducción del 11 % en el riesgo de mortalidad por cáncer específico de cada edad [1]. Este progreso, por desgracia, no ha sido homogéneo para países desarrollados y para aquellos en desarrollo. A nivel nacional el contraste entre la Ciudad de México y, por ejemplo, municipios del sur-este del país puede ser abismal. Mientras en la capital los ciudadanos tenemos acceso a instituciones de *primer mundo* como el INER, el 25 % de los hogares del país no cuentan con acceso al agua potable[2].

El nivel de desarrollo de un país y la salud de la cual gozan sus ciudadanos son factores interdependientes y por tanto la pobreza es uno de los factores principales que impiden la mejora en las condiciones de salud de una comunidad. En países como México, el empleo de exámenes rutinarios para el diagnóstico de enfermedades o déficits orgánicos son de reciente implementación (el sistema Medibus de la CDMX, por ejemplo). Más aún, los protocolos para implementar tales pruebas no son universales pues dependen en gran medida de la localidad en la que se llevan a cabo, o simplemente son propuestas poco ambiciosas para la magnitud de los problemas que se desean atacar. Una de las principales causas de éste retraso, en términos de salud, es el nulo acceso a mucha de la tecnología de diagnóstico.

No es de sorprenderse. Tales estrategias, como la citometría de flujo o los ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas, fueron concebidas para realizarse en laboratorios: entornos limpios, almacenaje de reactivos refrigerados, abasto confiable y a tiempo de reactivos y consumibles, electricidad estable, sin mencionar el personal altamente entrenado para todas éstas técnicas. Surge así, como reto tecnológico, el desarrollo de herramientas de diagnóstico óptimas para su uso en entornos de medianos y bajos recursos. Estos métodos deberán de ser **rápidos, fáciles de usar, baratos, fácilmente interpretables, de fácil transportación y lo suficientemente robustos para soportar condiciones ambientales extremas**[3]. En otros casos, incluso se debe poder asegurar que tanto el médico como el paciente puedan dar seguimiento inmediato a su historial clínico de forma inmediata, lo que facilitará la implementación de una terapia para el paciente de forma oportuna y personalizada. La salud pública a nivel mundial se encuentra sumamente obstaculizada por la no existencia de tales herramientas de diagnóstico [3].

La microfluídica tiene el poder de resolver la carencia de dicha tecnología [4]. Esta técnica ha despertado un alto interés en la investigación biomédica, en particular en la forma en la que se hace diagnóstico y detección de enfermedades. Este interés tiene como origen dos bondades inherentes a ella: la posibilidad de usar bajos volúmenes de muestras y reactivos ($10^{-9} - 10^{-18}L$) y los efectos físicos consecuencia de la microescala. Mas aún, los sistemas microfluídicos permiten la miniaturización e integración de procesos complejos, lo que facilitará el acceso de los sectores con más retraso a las herramientas sofisticadas de diagnóstico actualmente sólo accesibles a un grupo reducido. El uso óptimo de estas bondades permitirá a investigadores, industria y especialistas de la salud, el desarrollo de soluciones de bajo costo, precisas, confiables y robustas que tendrán un impacto directo en la sociedad [3].

Este trabajo tiene como objetivo el desarrollo de un protocolo de fabricación de dispositivos microfluídicos para su uso en investigación biomédica. En el capítulo dos, se presentan los fenómenos físicos que dominan a micro escala y cómo su control contribuye directamente a las bondades de la microfluídica; a continuación se muestran las técnicas de fabricación comúnmente usadas para la producción de estos dispositivos y se hace énfasis en el microfresado CNC, una técnica de manufactura sustractiva que por sus beneficios, entre ellos su costo, se eligió para este trabajo. En el capítulo cuatro se presentan los resultados más representativos de este proyecto y se discute de forma breve su contexto y alcances. A manera de conclusión, en el capítulo 5 se hace una recapitulación de lo desarrollado en el texto, de los logros y el trabajo restante.

- Desarrollar un protocolo de operación del equipo y maquinado de moldes y microcanales para fabricación directa en PMMA e indirecta en PDMS.
- Caracterización de la rugosidad y la resolución alcanzables en las micro estructuras.
- Desarrollo de un protocolo de réplicas en PDMS y su sellado en vidrio.
- Desarrollo de un protocolo de sellado para chips de PMMA.

Capítulo 1

Microfluídica, Dispositivos Lab-On-Chip y Point-of-Care

Un chip microfluídico (dispositivo) es una red interconectada de microcanales y reservorios, cuya dimensión característica se encuentra en el intervalo que va de unas cuantas micras a cientos de ellas ($10^{-6}m - 10^{-4}m$), cuyo objetivo es el control de cantidades pequeñas de líquidos (μL - pL). Cuando en esta clase de dispositivos se integran funciones propias de un laboratorio, tales como análisis químico, manejo de células, secuenciación celular, síntesis de fármacos ó diagnóstico médico se les conoce como Lab-On-Chip (Laboratorio en un chip).

1.1. Dispositivos Lab-On-Chip

Los dispositivos Lab-on-chip son la consecuencia tecnológica natural de la microfluídica. Dicha teoría, descrita en este capítulo, permite que protocolos usualmente complejos y tardados se lleven a cabo en un solo dispositivo que no sólo es de menor costo si no que presenta las ventajas (y desventajas) inherentes de la microescala. Gracias a este comportamiento inusual (para nosotros, humanos macroscópicos) del microflujo y de los fenómenos de transporte, la microfluídica permite procesos que antes no eran posibles o que eran imprácticos de realizar con herramientas macroscópicas.

En los últimos 10 años, el gran interés que ha despertado ésta técnica ha llevado al desarrollo de un sinnúmero de procesos de fabricación que han permitido la integración de análisis químicos complejos y ensayos biológicos. Esta nueva *filosofía* Lab-On-Chip (LoC) representa un cambio de paradigma en la forma en que se hace diagnóstico en investigación bioquímica[5]. En contraste con laboratorios convencionales con personal especializado en el que se utilizan varios mililitros de reactivos, equipos especializados para mezclar (o separar) una sustancia, calentarla, concentrarla y analizarla, en un Lab-On-Chip esos procesos son realizados de manera automática y reproducible por actuadores, microcanales, válvulas, calentadores, sensores y electrónica de lectura y control. En su estado último un dispositivo LOC incluye todos los procesos, reactivos y componentes necesarios en un chip o una tarjeta desechable capaz de proporcionar una lectura a partir de una muestra *cruda* (ver figura 1.1). Usando esta aproximación, de integración y miniaturización, se han mostrado dispositivos microfluídicos que han logrado reducir laboratorios de $10m^2$ a $20cm^2$ [6], al mismo tiempo, la reducción de escala trae consigo consecuencias clave para el proceso[7]:

- Costo reducido: Un chip requiere de menor capital inicial de inversión y reduce significativamente el volumen de los materiales que pueden llegar a ser muy costosos.
- Mejor rendimiento: Mejor precisión y mayor rapidez gracias a la posibilidad de realizar procesos simultáneos de forma automatizada.

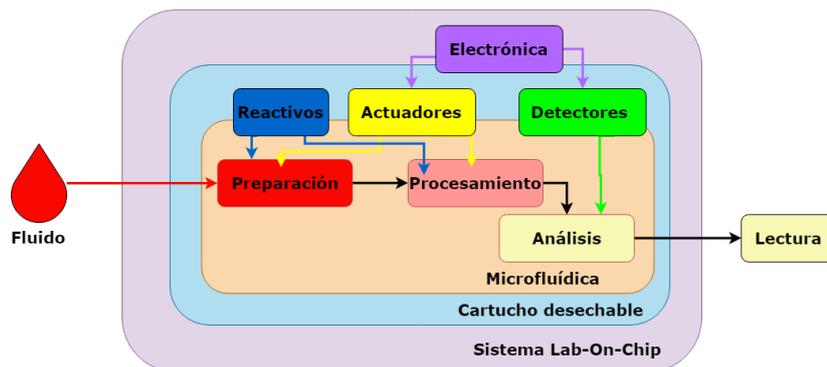


FIGURA 1.1: Composición esquemática de un dispositivo Lab-On-Chip.

- Manejo más seguro de materiales peligrosos.
- Paralelización masiva gracias al tamaño reducido de cada dispositivo.

En un Lab-On-Chip el control de un fluido puede lograrse mediante distintos mecanismos tales como una diferencia de presión, capilaridad, fuerza centrífuga, fuerzas electrocinéticas y fuerzas acústicas. Esto ha llevado a una clasificación del sinnúmero de LoC reportados según su mecanismo de actuación. Al momento de diseñar un chip microfluídico debe elegirse cuidadosamente un mecanismo de actuación acorde a las exigencias y contexto del objetivo que se persiga. La siguiente lista presenta los factores más importantes que deben de evaluarse en la etapa de diseño y que en conjunto moldearán un arquetipo del dispositivo y determinarán el mecanismo de actuación más adecuado para una cierta aplicación.

- Portabilidad: Tamaño, consumo de energía y facilidad de manipulación.
- Capacidad de análisis: Número de muestras/ensayos que se pueden analizar/realizar por unidad de tiempo.
- **Costo de la instrumentación requerida.**
- Costo de los reactivos y desechables que se emplean en cada ensayo.
- Diversidad de ensayos que se pueden realizar.
- **Resolución máxima y límites de detección.**

Los dos componentes que funcionan de forma conjunta al circuito microfluídico en un LoC son la instrumentación y la detección. La primera, además de encargarse del control de los procesos dentro del circuito microfluídico, es responsable de proveer una interfaz entre el usuario y la detección. Procesos en chip tales como la filtración, lavado, inyección y mezcla de reactivos y purificación, típicamente están determinados por canales microfluídicos de una forma específica en la que el flujo está sujeto a actuadores (válvulas, calentadores, bombas, etc.), sensores (de presión, temperatura, PH, etc.) y microcontroladores. En conjunto estos tres elementos controlan automática y sincrónicamente el fluido dentro del chip, lo que permite un proceso exitoso y reproducible (Figura 1.2).

El proceso muestra-lectura en un LOC culmina con la detección o medición del proceso de interés. De acuerdo con el mecanismo que se esté estudiando o empleando como núcleo de la detección, existen distintos tipos de detección que se han demostrado factibles en este tipo de dispositivos. Las tecnologías de detección más comunes incluyen detección

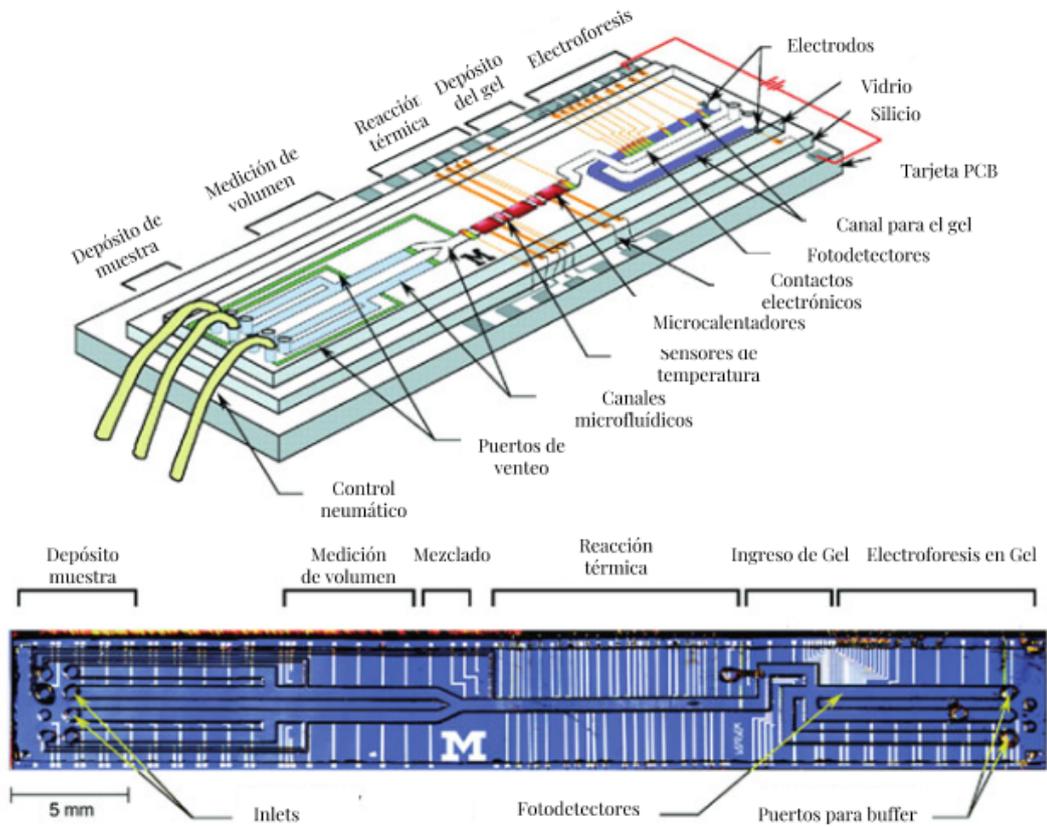


FIGURA 1.2: Ejemplo de un ensayo de electroforesis completamente integrado en un dispositivo Lab-On-Chip[8], nótese la presencia de microcanales, electrónica, calentadores, sensores de temperatura y control neumático.

óptica, electroquímica, magnética, impedométrica (conductancia o capacitancia), mecánica o térmica. Cada uno de ellos con distintos grados de sensibilidad, precisión, facilidad de integración y costo. Dos de los métodos que sobresalen de entre los demás por su sensibilidad y facilidad de implementación, respectivamente, son la detección óptica y eléctrica.

La facilidad de implementación de la detección eléctrica tiene como origen la amplia experiencia que se tiene gracias a la electrónica moderna en la medición de señales eléctricas. Corriente, capacitancia y conductancia son parámetros que se pueden asociar, por ejemplo, con el número de células que cruzan por un canal o la cantidad de moléculas presentes que se oxidan en una reacción, y que pueden ser medidos fácilmente con un osciloscopio, un microcontrolador o incluso un multímetro. Por otra parte, un obstáculo inherente a este método es que requiere de la integración de micro electrodos en la zona de interés. Aunque esto es un reto por si mismo, existen en la literatura múltiples métodos para abortar esta dificultad y que se suman a los ya bien conocidos por la microelectrónica de circuitos integrados.

La detección óptica es ampliamente usada en aplicaciones donde se requiere una alta sensibilidad. La integración de éste método de detección en dispositivos LOC tiene como origen el amplio uso de los marcadores fluorescentes y de absorción en la biología molecular y celular. Sin embargo, la translación de estos protocolos de detección a un chip requiere de un paso extra (a menudo laborioso), en el que se añade una molécula de propiedades ópticas bien conocidas para marcar los analitos de interés. Además de este paso, dicho método de detección requiere de un sistema óptico compuesto de lentes, filtros, espejos y fotodetectores que, aparte de ser voluminosos y delicados, tienen un costo elevado. Éstas desventajas, no obstante, están bien justificadas cuando la aplicación que se persigue lo amerita, como por ejemplo en la detección *on-chip* de moléculas individuales[9] o en la separación de células activada por fluorescencia[10].

La microfluídica, a través de la tecnología Lab-On-Chip, está destinada a revolucionar, tal como lo hizo la microelectrónica, nuestra vida diaria y la sociedad. El uso de esta técnica es hoy día una herramienta que está transformando el entendimiento actual de la biología y será, al igual que la microscopía, un parteaguas en la historia de la ciencia. Ya que el núcleo de esta revolución es el control de los fenómenos a microescala, es fundamental para el futuro desarrollo de nuevos y mejores Lab-On-Chip el entendimiento de la dinámica de fluidos en geometrías micrométricas.

1.2. Microhidrodinámica

Las ecuaciones que describen la conservación de masa, momento y energía en un fluido son válidas para los fenómenos que ocurren en todos los sistemas y dispositivos, sin importar que sean a macro o microescala. En términos prácticos, es decir, que persiguen alguna aplicación, dichas ecuaciones son la mayor parte del tiempo sumamente difíciles de resolver, por lo que es necesario restringir el problema a casos o situaciones especiales para lograr avanzar hacia una solución[7]. Sin embargo, existen casos fortuitos como el de la microfluídica, en el que las restricciones que se aplican a la teoría son precisamente las impuestas sobre el sistema por las condiciones físicas, y de esta forma se logra una excelente concordancia entre los resultados experimentales y teóricos. Más aún, los resultados de ejercicios teóricos o simulaciones numéricas se traducen directamente en ejemplos reales de los fenómenos estudiados.

TABLA 1.1: Comparación entre macro y microflujo

Característica	Macroflujo	Microflujo
Dinámica	Ecuación de Navier-Stokes	Ecuación de Stokes
Número de Reynolds	IMPORTANTE para evaluar transición de laminar a turbulento	Típicamente $Re \leq 1$
Rugosidad superficial	Despreciable	Se debe de evaluar cuidadosamente pues puede llegar a ser comparable con las dimensiones del canal causando campos de flujo complejos en las fronteras
Difusión	Presente pero comúnmente lenta y por tanto despreciable	Debido al tamaño reducido de las canales es importante y puede usarse para mezclar.
Tensión superficial	Despreciable	Puede contribuir fuertemente y ocasionar flujo pasivo.

1.2.1. Leyes de escalamiento

El gran poder de la microfluídica tiene como origen el dominio de los fenómenos que dependen del área sobre las fuerzas de cuerpo[7] [11]. Este resultado es consecuencia directa de la reducción de las dimensiones del sistema (de los metros a los micrómetros) y se vuelve evidente al analizar el cociente:

$$\kappa \equiv \frac{\text{Área superficial}}{\text{Volumen}} = \frac{A}{V} \sim \frac{l^2}{l^3} = l^{-1} \quad (1.1)$$

l es la dimensión característica del sistema y puede ser entendida de dos maneras:

- **Geometría isotrópica.** En este caso, las dimensiones de la geometría en las tres dimensiones espaciales son del mismo orden de magnitud. En este caso l representa de forma directa el tamaño del objeto.
- **Geometría anisotrópica** Este es el caso de microcanales, por ejemplo, cuya longitud es generalmente varios cientos de veces más grande que su ancho o su alto. En estos casos l se debe de entender como una cantidad que controla las dimensiones del sistema en conjunto: Diámetro hidráulico, ancho o alto del canal, etc. Cuando l disminuye, todas las dimensiones del sistema disminuyen manteniendo constante la razón de aspecto (ancho entre altura).

Ya que $\lim_{l \rightarrow 0} l^{-1} \rightarrow \infty$, se sigue que en microfluídica las cantidades que dependen del área, tales como la presión, los esfuerzos cortantes, el flujo de calor o la difusión, se vuelven dominantes. Este resultado se conoce como la regla o ley de escalamiento y deriva en que el flujo en macrocanales y microcanales sea fundamentalmente distinto. Tales diferencias se resumen en la tabla 1.1.

Los efectos mencionados en la tabla 1.1 pueden obtenerse a partir de la dinámica de fluidos. No obstante, una forma más elegante de abordar éste análisis es a través de la ley de escalamiento o, mejor dicho, las leyes de escalamiento (tabla 1.2), que muestran por medio de un análisis dimensional el comportamiento de las magnitudes físicas al hacer tender la longitud característica a cero[7].

TABLA 1.2: Magnitudes físicas y su dependencia.

Cantidad	Dependencia
Diámetro, altura o ancho del canal: $L \sim l$	l
Área superficial: $S \sim l^2$	l^2
Volumen: $V \sim l^3$	l^3
Fuerza gravitacional: $\rho v g \sim l^3$	l^3
Presión: $F/A \sim l$	l
Esfuerzos Cortantes: $\tau = F/A \sim l$	l
Fuerza viscosa: $\tau A \sim l^2$	l^3
Fuerza coulombiana: $-\rho_{\text{eléctrica}} \nabla \phi V \sim l^3/l$	l^2
Fuerza capilar: $\gamma L \sim l$	l

TABLA 1.3: Magnitudes físicas típicas en microfluídica.

Cantidad
Densidad ρ
Tensión superficial: γ
Volumen: V
Aceleración gravitacional: g
Presión: P
Esfuerzos Cortantes: τ
Viscosidad dinámica ν
Velocidad característica: U
Diámetro hidráulico: D_h
Campo de velocidades: \vec{v}

Mientras que en algunos casos la ley de escalamiento es obvia, tal es el caso de la masa y el volumen $m \sim v \sim l^3$, la mayoría de las veces la relación entre la cantidad física estudiada y la forma en la que escala involucra otras cantidades físicas[11]. En el caso en que dichas cantidades involucradas sean constantes (como g la aceleración de la gravedad) la ley de escalamiento se puede derivar directamente:

$$F_g = mg = \rho v g \sim v \sim l^3$$

Cuando además de constantes se involucran cantidades físicas que dependen también del tamaño (la diferencia de presión en un microcanal, el campo eléctrico entre dos placas, etc), la manera de proceder es asumir tales cantidades constantes estimando el valor máximo que pueden llegar a tener según las constricciones del sistema. Una lista de los magnitudes físicas usualmente encontrados en microfluídica se presenta en la tabla 1.3

1.2.2. Ecuación de Stokes

Escrita apropiadamente para la descripción de la dinámica de un fluido, la segunda ley de Newton se conoce como la ecuación Navier-Stokes (ec.1.2) del momento lineal y en ella puede apreciarse de forma clara la contribución de las distintas fuerzas al movimiento del fluido[7].

$$\vec{a}_{\text{Total}} = \Sigma \vec{F} = \vec{F}_{\text{presión}} + \vec{F}_{\text{viscosidad}} + \vec{F}_{\text{gravedad}} + \vec{F}_{\text{tens.sup.}} + \vec{F}_{\text{electrostática}}$$

$$\underbrace{\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v}}_{\vec{a}_{Total}} = - \underbrace{\frac{1}{\rho} \nabla p}_{\vec{F}_{presión}} + \underbrace{\nu \nabla^2 \vec{v}}_{\vec{F}_{viscosidad}} + \underbrace{\vec{g}}_{\vec{F}_{gravidad}} + \underbrace{\gamma \vec{l}}_{\vec{F}_{tens.sup.}} + \underbrace{\frac{\rho_{elec}}{\rho} \vec{E}}_{\vec{F}_{elec}} \quad (1.2)$$

Donde \vec{v} es el campo de velocidades, p la presión, ν la viscosidad dinámica, \vec{g} la fuerza gravitacional, γ el coeficiente de tensión superficial, ρ_{elec} la densidad de carga eléctrica y ∇ el operador $(\frac{\partial}{\partial x}, \frac{\partial}{\partial y}, \frac{\partial}{\partial z})$. La ecuación 1.2 junto con la ecuación de la continuidad $\nabla \cdot \vec{v} = 0$ se conocen como las ecuaciones de Navier-Stokes y describen en general la dinámica de los fluidos Newtonianos incompresibles. Por su naturaleza vectorial, son un conjunto de ecuaciones diferenciales parciales que pueden ser resueltas por métodos numéricos. Según la dificultad de la geometría y las condiciones iniciales, dicha solución puede requerir desde los recursos de una computadora personal hasta un equipo para súper cómputo. Para un fluido 2D en un campo gravitacional, en coordenadas rectangulares por ejemplo, las ecuaciones de Navier-Stokes toman la siguiente forma, donde p es el campo de presión, u y v son las componentes en X y en y del campo de velocidades respectivamente, $\nu \equiv \frac{\mu}{\rho}$ el coeficiente de viscosidad cinemática y g_i las componentes del campo gravitacional.

$$\begin{aligned} \frac{\partial u}{\partial x} + \frac{\partial v}{\partial y} &= 0 \\ u \frac{\partial u}{\partial x} + v \frac{\partial u}{\partial y} &= -\frac{1}{\rho} \frac{\partial p}{\partial x} + \nu \left(\frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial y^2} \right) + g_x \\ u \frac{\partial v}{\partial x} + v \frac{\partial v}{\partial y} &= -\frac{1}{\rho} \frac{\partial p}{\partial y} + \nu \left(\frac{\partial^2 v}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v}{\partial y^2} \right) + g_y \end{aligned}$$

Las leyes de escalamiento tienen un profundo impacto en la ecuación de Navier-Stokes. Cada una de las fuerzas en la ecuación 1.2 escala de manera distinta con la longitud, por lo que unas tiende a cero más rápido que otras o viceversa, unas divergen (dominan sobre las demás) más rápido al hacer $l \rightarrow 0$ (ver tabla 1.2). El dominio de una fuerza sobre otra se puede evaluar a través de los números adimensionales del problema, los cuales son cocientes entre las distintas fuerzas en la ecuación 1.2 y su análisis puede ser suficiente para la solución conceptual o incluso analítica de un problema[7].

Los números adimensionales más importantes en microfluídica son el número de Weber (We), el de Peclet (Pe), el capilar (Ca) y el de Reynolds (Re). La forma en la que se definen y escalan estos números según la longitud característica se detalla a continuación (ver tabla 1.3)[7].

$$We = \frac{F_{Inercial}}{F_{Tens.Sup.}} = \frac{\rho V (\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v}}{\gamma \cdot L} = \frac{\rho v^2 L}{\gamma} \sim l^3 \quad (1.3)$$

$$Pe = \frac{\text{Convección}}{\text{Difusión}} = \frac{v D_h}{D} \sim \frac{v D_h}{\nu} \sim l^2 \quad (1.4)$$

$$Ca = \frac{\text{Fuerza Viscosa}}{\text{Tensión superficial}} = \frac{\tau A}{\gamma L} \sim \frac{l^3}{l} = l^2 \quad (1.5)$$

$$Re = \frac{\text{Fuerza Inercial}}{\text{Fuerza viscosa}} = \frac{\rho U}{\nu} \sim l^2 \quad (1.6)$$

Una de las propiedades más fuertes de la microfluídica proviene de la forma en la que escala el número de Reynolds. Considérese primero la ecuación 1.2 (en ausencia de tensión

Término	Contribución	Escalamiento
1	Aceleración	l^2
2	Fuerza Inercial	l^2
3	Presión	1
4	Viscosidad	1
5	Fuerza gravitacional	l^2

TABLA 1.4: Escalamiento de los términos en la ecuación NS

superficial y fuerzas electrostáticas) en la que, a manera de artificio matemático, se hace un cambio a un grupo de variables normalizadas por su parámetro característico asociado, tiempo t , longitud l y velocidad U_0 :

$$\begin{array}{lll}
 w = U_0 \hat{w} & u = U_0 \hat{u} & v = U_0 \hat{v} \\
 x = l \hat{x} & y = l \hat{y} & z = l \hat{z} \\
 p = P_0 \hat{p} & t = T \hat{t} &
 \end{array}$$

En términos de las nuevas variables $\hat{x} \hat{y} \hat{z} \hat{u} \hat{v} \hat{w} \hat{p} \hat{t}$ la componente en Z (X y Y son análogas) se puede escribir como:

$$\frac{\rho U_0}{T} \frac{\partial \hat{w}}{\partial \hat{t}} + \frac{\rho U_0^2}{l} \left(\hat{u} \frac{\partial \hat{w}}{\partial \hat{x}} + \hat{v} \frac{\partial \hat{w}}{\partial \hat{y}} + \hat{w} \frac{\partial \hat{w}}{\partial \hat{z}} \right) = - \frac{P_0}{l} \frac{\partial \hat{p}}{\partial \hat{z}} + \frac{U_0 \mu}{l^2} \left(\frac{\partial^2 \hat{w}}{\partial \hat{x}^2} + \frac{\partial^2 \hat{w}}{\partial \hat{y}^2} + \frac{\partial^2 \hat{w}}{\partial \hat{z}^2} \right) + \rho g$$

Multiplicando todo por $l^2 / U_0 \mu$:

$$\underbrace{\frac{\rho l^2}{T \mu} \frac{\partial \hat{w}}{\partial \hat{t}}}_1 + \underbrace{\frac{\rho U_0^2 l}{\mu} (\vec{\hat{v}} \cdot \hat{\nabla}) \hat{w}}_2 = - \underbrace{\frac{P_0 l}{U_0 \mu} \frac{\partial \hat{p}}{\partial \hat{z}}}_3 + \underbrace{\hat{\nabla}^2 \hat{w}}_4 + \underbrace{\frac{\rho g l^2}{U_0 \mu}}_5 \quad (1.7)$$

Escrita en estas nuevas variables, adimensionales y normalizadas, el estudio de la ecuación NS es más sencillo pues las soluciones de la ecuación diferencial dependen únicamente de los coeficientes de cada término que son números reales, incluso si dos sistemas son diferentes (en tamaño, tiempo, velocidad, etc.) pero los cocientes son tales que los coeficientes de cada término son los mismos, ambos presentarán la misma dinámica. Más aún, al aplicar dicha ecuación a un sistema a micro escala, las reglas de escalamiento describen el comportamiento de dichos coeficientes al hacer $l \rightarrow 0$. El término 2 corresponde a los efectos inerciales del sistema y su coeficiente es exactamente el número de Reynolds. Obsérvese que según la ecuación 1.6 este número escala como l^2 y por consecuencia $Re \lll 1$ cuando $l < 1$, además en estas nuevas variables $\vec{\hat{v}} \cdot \hat{\nabla}$ ¹ está acotado por sus parámetros característicos l y U_0 (que se toman en cuenta en Re) de tal forma que el término 2 es despreciable comparado con el 4, que es del orden de la unidad. Cada uno de los 5 términos escalan conforme la tabla 1.4.

De la tabla 1.4 se concluye que la presión y la viscosidad dominan sobre la fuerza de gravedad y los efectos inerciales (de aceleración). Este es el origen del gran contraste que existe con los sistemas macroscópicos, donde típicamente los números de Reynolds que se encuentran son altos y los efectos de la gravedad (los que se deben a un cambio de altura, como en la ecuación de Torriceli o Bernoulli) son sumamente significativos.

¹ $\hat{\nabla} = \left(\frac{\partial}{\partial \hat{x}}, \frac{\partial}{\partial \hat{y}}, \frac{\partial}{\partial \hat{z}} \right)$

Más importante que la baja influencia de la gravedad es el hecho de que en estos sistemas, el número de Reynolds sea bajo: cuando esto sucede se dice que el flujo es laminar, mientras que el flujo turbulento está asociado con números de Reynolds altos.

El flujo laminar es una de las propiedades más explotadas de la microfluídica pues permite el uso del flujo para la manipulación de partículas, células, e incluso moléculas, ya que en este régimen la velocidad de una partícula inmersa en el fluido no es una función aleatoria del tiempo y está bien determinada a diferencia de en un flujo turbulento (caótico), en la que es imposible predecir la velocidad de una partícula en el tiempo.

Bajo los argumentos anteriores, el comportamiento de un fluido a microescala está regido por la ecuación 1.7 en la que los términos inerciales son despreciables, a dicha ecuación se le conoce como la ecuación de Stokes y para sus tres componentes se escribe como:

$$-\frac{1}{\rho}\nabla p + \frac{\mu}{\rho}\nabla^2\vec{v} + \frac{1}{\rho}\vec{F} = 0 \quad (1.8)$$

Para un microcanal, por ejemplo, de sección transversal circular de radio r_0 y de longitud L al que se aplica una diferencia de presión Δp , la solución de esta ecuación es sencilla. Por la simetría del sistema las componentes angular y radial deben de ser igual a cero, por lo que el campo de velocidades \vec{v} sólo es en dirección axial $\vec{v} = (u, 0, 0)$. Además dicha componente sólo depende del radio $u = u(r)$. Para este sistema la ecuación se escribe como²:

$$\mu\nabla^2\vec{v} = \nabla p = -\frac{\Delta p}{L}$$

Aprovechando la simetría del problema, escribimos el laplaciano en coordenadas cilíndricas y usando que $u = u(r)$ esta ecuación se reduce a:

$$\mu\frac{1}{r}\frac{d}{dr}\left(r\frac{du}{dr}\right) = -\frac{\Delta p}{L}$$

La velocidad $u(r)$ deberá ser máxima en el centro del canal y nula en las paredes³, es decir, $u(r_0) = 0$ y $\frac{du}{dr} = 0$ en $r = 0$. Bajo estas condiciones de frontera la velocidad dentro del microcanal está dada por:

$$u(r) = \frac{1}{4\mu}\left(\frac{\Delta p}{L}\right)(r_0^2 - r^2) = u_{max}\left[1 - \left(\frac{r}{r_0}\right)^2\right] \quad (1.9)$$

A este resultado se le conoce como ley de Poiseuille. Obsérvese que la velocidad como función del radio es una parábola cuyo valor máximo es $u_{max} = \frac{\Delta p r_0^2}{4\mu L}$. Una vez que se tiene este resultado se puede calcular la tasa de flujo Q , el volumen de líquido que circula en el canal por unidad de tiempo al calcular la integral de $u(r)$ sobre la sección transversal del canal. Nótese en la ecuación 1.11 cómo Q es directamente proporcional a ΔP :

$$Q = \int_{\mathcal{R}} u(r)dA = 2\pi \int_0^{r_0} u_{max}\left[1 - \left(\frac{r}{r_0}\right)^2\right] r dr \quad (1.10)$$

$$Q = \frac{\pi r_0^4}{8\mu L}\Delta P \quad (1.11)$$

Ya que la solución de la ecuación de Stokes puede ser tan complicada como la geometría en cuestión, la mayoría de las veces el análisis de un circuito microfluídico se realiza

²Se puede demostrar que en este tipo de sistemas el gradiente de presión es constante y su valor es $\nabla p = -\frac{\Delta p}{L}$.

³Esta condición se conoce como condiciones de frontera adherentes o de no resbalamiento y es justificable en casos en los que la superficie interna del micro canal no sea hidrofóbica

por métodos numéricos o incluso se prescinde de dicha solución empleando el concepto de resistencia microfluídica.

1.2.3. Presión, tasa de flujo y resistencia microfluídica

La resistencia microfluídica R es la oposición de un microcanal al paso de un fluido a través de él. De forma análoga a los circuitos eléctricos R es introducida por medio de la ecuación⁴:

$$Q = \frac{\Delta P}{R} \quad (1.12)$$

En esta relación notamos inmediatamente que la tasa de flujo es directamente proporcional a la diferencia de presión a lo largo de un canal, entre más grande sea ΔP más grande será la tasa de flujo Q . Más aún, Q es inversamente proporcional a R : entre mayor sea la resistencia de un microcanal menor será el flujo que este permite. De manera general el origen de la resistencia microfluídica es la fricción que ocurre entre las paredes de un circuito y el fluido[12], ya que reducir la dimensión característica de un sistema magnifica los efectos de área. Entre más se reduzca un micro canal, mas será su resistencia. En este factor además, se toma en cuenta la naturaleza del fluido. Es fácil de ver que un líquido viscoso requiere mucha más fuerza (presión) para hacerlo fluir a través de un canal en comparación con el agua o el alcohol. Este hecho se toma en cuenta en la resistencia microfluídica R (ver ec. 1.11) al ser inversamente proporcional a μ . Así, en forma análoga a la resistencia eléctrica en términos de la resistividad, la resistencia microfluídica depende de la geometría del micro canal (longitud y sección transversal) y del fluido. La tabla 1.5 muestra la resistencia R , la tasa de flujo Q y la solución a la ecuación 1.2.2 para los micro canales de sección transversal homogénea mas comúnmente encontrados en la literatura.

Este análisis en términos de Q , R y ΔP es válido en general para flujos en los que $Re \ll 1$ y la analogía en este régimen con los circuitos eléctricos es tan robusta que para dos secciones en serie de un circuito microfluídico caracterizado por resistencias R_1 y R_2 se puede definir una resistencia equivalente R_3 dada por:

$$R_3 = R_2 + R_1$$

La resistencia equivalente de dos secciones en paralelo se puede obtener por:

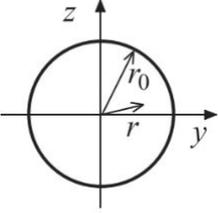
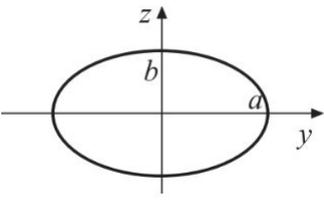
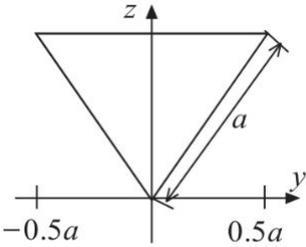
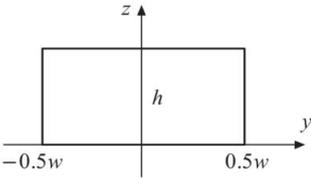
$$R_3 = \frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2}$$

Esta descripción en términos de presiones, flujos y resistencias permite el diseño práctico de circuitos microfluídicos sin necesidad de resolver la ecuación de Stokes para el campo de velocidades⁵. En un micro canal con geometría en Y de ramas asimétricas, se puede saber cuál será la tasa de flujo Q en cada una de las ramas a partir de su geometría, de la misma forma que se puede obtener la corriente que circula por dos resistencias de un arreglo en paralelo. En la práctica se suele usar el proceso inverso, si se requiere suministrar con precisión un volumen en un cierto tiempo, se calcula la tasa de flujo necesaria y la resistencia R que se necesita para una presión P . Es a partir de R que se diseña el micro canal adecuado con lo que se obtiene el volumen requerido[7][13].

⁴La tasa de flujo Q y la diferencia de presión P que causa el flujo son análogas a la corriente I , al voltaje V en la ley de Ohm

⁵Este proceso es análogo a la electrónica, donde para diseñar circuitos no es necesario resolver para el campo eléctrico.

TABLA 1.5: Velocidad, resistencia y tasa de flujo según su sección transversal

Sección transversal	Resultados
	$u(r) = \frac{\Delta P}{4\mu L} r_0^2 \left(1 - \left(\frac{r}{r_0}\right)^2\right)$ $Q = \frac{\pi r_0^4}{8\mu L} \Delta P$ $R = \frac{8\mu L}{\pi r_0^4} \sim l^{-3}$
	$u(y, z) = \frac{\Delta P}{2\mu L} \frac{a^2 b^2}{a^2 + b^2} \left(1 - \frac{y^2}{a^2} - \frac{z^2}{b^2}\right)$ $Q = \frac{\pi}{4\mu L} \frac{a^3 b^3}{a^2 + b^2} \Delta P$ $R = \frac{4\mu L}{\pi} \frac{a^2 + b^2}{a^3 b^3} \sim l^{-3}$
	$u(y, z) = \frac{u_0}{a^3} \left(\frac{\sqrt{3}}{2} a - z\right) (z^2 - 3y^2)$ $u_0 = \frac{a^2}{2\sqrt{3}\mu L} \Delta p$ $Q = \frac{\sqrt{3}}{320} \frac{a^4}{\mu L} \Delta P$ $R = \frac{320\mu L}{\sqrt{3}a^4} \sim l^{-3}$
	$u(y, z) = \frac{4h^2}{\pi^3 \mu L} \Delta P$ $\sum_{n, \text{impar}} \frac{1}{n^3} \left[1 - \frac{\cosh\left(\frac{n\pi y}{h}\right)}{\cosh\left(\frac{n\pi w}{2h}\right)} \right] \sinh\left(\frac{n\pi z}{h}\right)$ $Q = \frac{h^3 w \Delta P}{12\mu L} \left[1 - \sum_{n, \text{impar}} \frac{192h}{n^5 \pi^5 w} \tanh\left(\frac{n\pi w}{2h}\right) \right]$ $R = \frac{12\mu L}{h^3 w} \left[1 - \sum_{n, \text{impar}} \frac{192h}{n^5 \pi^5 w} \tanh\left(\frac{n\pi w}{2h}\right) \right]^{-1} \sim l^{-3}$

Si lo que se desea es un sistema en el que la velocidad de partículas (células por ejemplo) tenga un valor fijo v_0 , el diseño se hace a partir del perfil de velocidad (ver tabla 1.5), se iguala v_0 al valor de u en el centro del canal y se calcula la geometría requerida para producir

dicha velocidad por una diferencia de presión ΔP con la que se cuenta. Gracias a que el flujo dentro de este canal es laminar ($Re \ll 1$), las partículas embebidas en el fluido circularán con la velocidad apropiada [14].

En algunos casos, como el de desarrollo de plataformas biomiméticas para cultivo celular, el número de Peclet ($Pe = \frac{\text{Convección}}{\text{Difusión}}$) juega un papel más importante que el de Reynolds. Puesto que el ambiente propio de las células emplea la difusión en lugar de la convección para suministro de nutrientes, es importante que en estos sistemas el número de Peclet se mantenga por debajo de 1 [15] (ver ec. 1.4). Una vez que se conoce la viscosidad dinámica del fluido ν se puede variar el diámetro hidráulico⁶ D_h para asegurar que $Pe \ll 1$ en un rango de velocidades v .

1.3. Dispositivos Point-of-Care

Una de las críticas más duras hacia los dispositivos Lab-On-Chip es el hecho de que la mayoría de las veces estos resulten ser un *Chip in a Lab*. Esta crítica no es infundada, debido a la complejidad y cantidad de instrumentos de control y medición que algunos sistemas microfluídicos requieren. La implementación de un experimento de este tipo resulta impráctica y costosa con lo que se pierde uno de los mayores atractivos de la tecnología. A pesar de sus inconvenientes, dichos arreglos pueden alcanzar tal nivel de integración y de control de fluidos que justifica su uso, como es el caso del dispositivo mostrado en la figura 1.3 en el que en un solo chip se lleva a cabo la captura, lisado y amplificación del material genético de células individuales. Este enfoque, sin embargo, es particularmente inadecuado para una de las aplicaciones más prometedoras de la microfluídica: el diagnóstico clínico y la detección de biomoléculas.

La respuesta a esta tendencia *Chip in a Lab* es una nueva generación de dispositivos de detección conocidos como *Point-of-Care* (PoC) cuya microfluídica es desechable, y la instrumentación alrededor de ellos es autónoma⁷, apta para ambientes no especializados, portable e idealmente de bajo costo (ver figura). Las pruebas caseras de embarazo y los medidores portátiles de glucosa en sangre son el mejor ejemplo de este tipo de dispositivos.

Los sistemas Point-of-Care hacen posible la aplicación rápida y *en el lugar de acción*, de ensayos de diagnóstico cuyo resultado puede evitar la hospitalización de un paciente o incluso hacer la diferencia entre la vida y la muerte en el caso de algunas infecciones. Este tipo de pruebas pueden ser aplicadas por profesionales de la salud, cuidadores o incluso los pacientes. Al no requerir de personal o instalaciones específicas, la tecnología PoC encuentra una gran ventana de oportunidad en poblaciones alejadas de las ciudades o de bajos recursos cuyo acceso a los sistemas de salud convencionales es difícil o en muchos casos inalcanzable.

Esta forma de detección, reduce los costos alrededor del cuidado de la salud, pues disminuye la necesidad de un hospital, un laboratorio con un técnico entrenado; los resultados no necesitan esperar para ser entregados ni analizados y se reduce al mínimo la necesidad de repetir pruebas debido a un mal manejo de las muestras. Más aún, gracias a que los lectores PoC son más especializados (y menos versátiles) su costo es menor y se amortiza sobre los cientos de pruebas que se pueden realizar. Queda a discusión el costo del cartucho microfluídico que está sujeto a la complejidad del ensayo que realiza, así, **es fundamental trabajar en la reducción de costos de este componente** para lograr desatar el prometedor futuro de los dispositivos PoC.

⁶ $D_h = 4\text{Area} / \text{Perimetro}$

⁷Que no requiere de más instrumentos

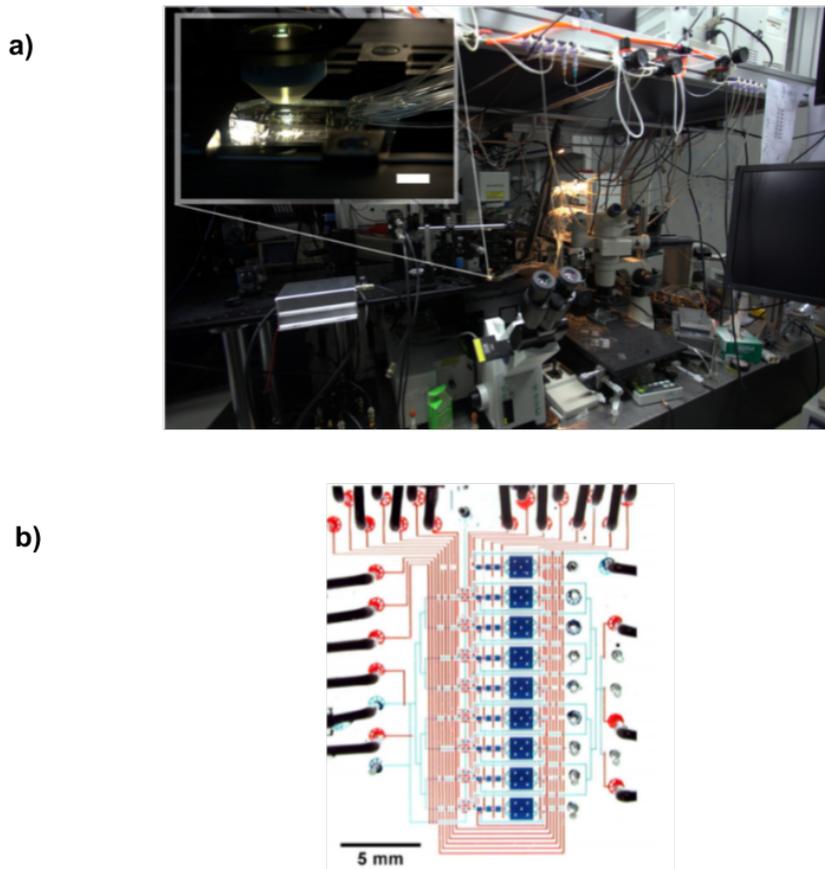


FIGURA 1.3: Enfoque chip in a Lab, a) Arreglo experimental alrededor de un chip, b) Chip altamente integrado para amplificación de material genético [16].

1.4. Obstáculos para la tecnología LoC y PoC

La figura 1.4 muestra una idealización que a la fecha no ha sido materializada. Si bien hay casos de rotundo éxito (las tiras para medición de glucosa y la prueba de embarazo), es generalmente aceptado que estos ejemplos son sólo la punta del iceberg y no son representativos del potencial de la microfluídica [18] [19]

A pesar del debate que existe entre los miembros más prominentes de la comunidad Lab-on-Chip, el acuerdo común es que el retraso de la revolución microfluídica se debe principalmente a dos motivos: la insuficiente colaboración de las distintas disciplinas (ingeniería, física, química, biología) en aras de un objetivo común y la carencia de un protocolo para la fabricación en masa de chips microfluídicos.

El primero de los motivos ha disminuido significativamente en los últimos años. Mientras que en el albor del desarrollo de esta rama la tendencia era desarrollar dispositivos para los que posteriormente se buscaba una aplicación, en la actualidad los laboratorios y centros de investigación parten de un problema a solucionar para el cual se emplea la microfluídica como herramienta en aras de una solución.

Ya que la estructuración de un material con canales de longitud característica en el orden $10^{-5}m$ no es sencilla, la fabricación de la microfluídica en POC y LOC es un reto por si misma y tiene que tomarse en cuenta durante todo el proceso de desarrollo. Más aún, a pesar de que existen numerosos métodos para fabricar microcanales, éstos son sólo adecuados para prototipado o producción de chips individuales y son apenas compatibles con los protocolos

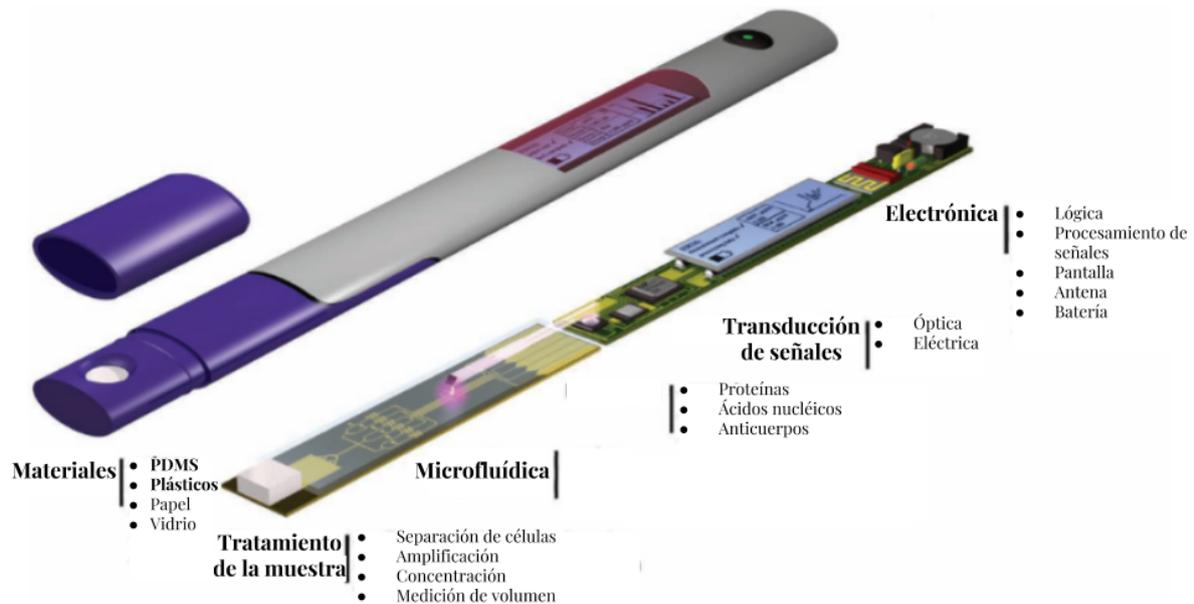


FIGURA 1.4: Dispositivo *Point of Care* ideal. Acondicionamiento de la muestra, microfluídica, instrumentación y detección en un solo dispositivo portátil, desechable y de bajo costo. [17].

actuales de fabricación en masa que permiten la reducción exponencial de los costos de fabricación. En este contexto, **el objetivo de este trabajo es el desarrollo de un protocolo de fabricación de chips microfluídicos que sea compatible con la producción en masa y el prototipado de estos.** El capítulo siguiente está dedicado a las distintas técnicas de fabricación, a los materiales que se emplean en la producción de dispositivos Lab-On-Chip y la técnica desarrollada en este proyecto.

Capítulo 2

Fabricación de chips microfluídicos

En este capítulo se presentan brevemente las distintas técnicas que se emplean para la manufactura de dispositivos microfluídicos, así como los materiales más comúnmente usados. Por su bajo costo y versatilidad, se hace énfasis en el microfresado CNC como método empleado para lograr el objetivo de este trabajo, pues permite la estructuración de dos de los polímeros más usados en microfluídica hoy día: PDMS y PMMA.

2.1. Orígenes

En la última mitad del siglo pasado, la industria electrónica desarrolló técnicas para la manufactura de microestructuras en silicio, gracias a las cuales hoy es posible la microelectrónica moderna[20]. Técnicas como la fotolitografía, la deposición de películas metálicas y el ataque químico dieron origen a los primeros dispositivos microfluídicos en vidrio y en silicio en la década de los 90s [21, 22, 23]. A partir de estas pruebas de concepto comenzó una carrera por el desarrollo de más y mejores dispositivos que eventualmente dio origen a la filosofía *Lab-on chip*. Poco después de que se publicara el uso de las técnicas de manufactura en silicio y vidrio para la micromanipulación de fluidos, la comunidad científica se dio cuenta de la falta de compatibilidad de estos materiales con la aplicación que se perseguía. A pesar de que su resistencia a altas temperaturas y a los solventes es excelente, el silicio es opaco a la luz visible y UV, lo que impide la visualización dentro de él. Aunque el vidrio no presenta esta desventaja, ambos materiales son no permeables a gases, lo que imposibilita su uso en una de las aplicaciones más prometedoras: el cultivo celular [5, 4]. Aunado a esto, la fabricación de microestructuras por fotolitografía y ataque químico en silicio y vidrio son procesos muy costosos por las instalaciones altamente especializadas que se requieren (cuarto limpio, alineadora de máscaras, mesas para ataque químico, etc.) y más aún, debido a la alta toxicidad de los reactivos empleados (*HF*), resultan sumamente dañinos para la salud y el medio ambiente, llegando incluso a ser mortales en algunos casos.

Hacia finales de la década de los 90, la microfabricación de sistemas integrados representaba un campo con un futuro prometedor del que sólo se vislumbraba el comienzo, sin embargo, el progreso de ésta tecnología hacia nuevos fenómenos en microfluídica se encontraba constreñido principalmente por la lentitud y alto costo del micromaquinado de silicio. Como respuesta a este rezago, en 1998, el grupo de George Whitesides propuso el uso de polidimetilsiloxano (PDMS), un polímero suave, transparente, biocompatible y permeable a gases, para la fabricación de microcanales[23]. La propuesta de Whitesides consiste en un método de réplica-molde en el que el PDMS se deja curar sobre un micromolde estructurado por fotolitografía.¹

¹Técnica en la que una resina fotosensible sobre un sustrato se expone selectivamente al UV empleando una máscara. Las zonas donde la resina no es expuesta se remueven empleando un solvente, resultando así un relieve sobre el sustrato.

Esta técnica se conoce actualmente como *litografía suave* y representa el cambio de paradigma que desató el *boom* de la microfluídica. Hoy en día la litografía suave es una técnica empleada por la industria y la academia para el desarrollo de dispositivos *LoC* y *PoC*. Respecto al micromaquinado en silicio y vidrio, el uso de PDMS es un proceso de bajo costo pues además de que este material es más barato, se suprime el uso de las instalaciones para el ataque químico o por plasma; respecto a la fotolitografía, en lugar de emplear una máscara metálica, de cromo por ejemplo, se puede emplear una impresión de alta resolución en una transparencia; mientras que en silicio cada dispositivo se tiene que fabricar individualmente, en la litografía suave se puede replicar el mismo molde varias veces y sobre todo el tiempo de fabricación se reduce drásticamente a menos de 24H [23].

2.2. Prototipado ultra rápido

La litografía suave presentada por Whitesides emplea la fotolitografía como técnica de fabricación de micromoldes. Pese a sus ventajas respecto a métodos anteriores, aún hoy dicha tecnología resulta inaccesible para muchos laboratorios que carecen de las instalaciones necesarias. Si bien se puede evitar el uso de un cuarto limpio, es necesario contar con un sistema de alineación de máscaras y exposición a UV; el alto costo y fragilidad de los materiales (oblas de silicio y fotoresinas) presenta una barrera sólo sorteable por centros especializados con el presupuesto necesario. Esto lleva a un uso limitado de la microfluídica y deriva en el retraso de su desarrollo. En la actualidad, uno de los obstáculos que frena la revolución *Lab on Chip* y *Point of Care* es inherente a la fotolitografía, que al requerir de varios pasos hace incompatible la litografía suave con la exigencia actual de prototipado ultrarápido (de diseño a dispositivo en unas cuantas horas). En términos de escalabilidad, la litografía suave no es compatible con la producción en masa debido a que los micromoldes de silicio son delicados y, por tanto, poco robustos, de fabricación costosa (alrededor de 6000 \$ por una oblea de 10 cm) y el proceso de fabricación de canales es difícil de automatizar, llegando incluso a ser un proceso artesanal para algunos autores[24].

La carencia de instalaciones adecuadas y personal entrenado, junto con la necesidad de una alternativa a la fotolitografía, adecuada para la producción en masa, han llevado al desarrollo de métodos alternativos de micromanufactura que no sólo acercan la microfluídica a una comunidad científica más amplia (biólogos, químicos, médicos, etc.) si no que son de ultra bajo costo (50\$ por dispositivo). La réplica de alambres, hojas encogidas de poliestireno (Shrinky Dinks) y de estructuras hechas por impresión 3D y xurografía, han demostrado ser una alternativa factible para la fabricación de chips microfluídicos en ambientes no convencionales [25, 26, 27, 24] que además presentan una ventaja de sumo valor: el prototipado ultra rápido. Típicamente el proceso de desarrollo de un chip microfluídico requiere de varias iteraciones que solucionan las distintas carencias que cada uno presenta, empleando fotolitografía, este proceso de prototipado requiere de tantos moldes como versiones de chip se tengan y por tanto, el costo de desarrollo puede llegar a ser muy elevado.

En aplicaciones donde la resolución de los microcanales requeridos es del orden de los cientos de micras, estas herramientas han demostrados ser valiosas para el desarrollo de prototipos y pruebas de concepto, aunque fallan en términos de escalabilidad, resolución y rugosidad. Estos dos últimos factores son de importancia particular en estudios de biología celular y donde intervengan interacciones con los sustratos, ensayos ELISA por ejemplo, donde la rugosidad de las superficies puede magnificar la relación volumen-área superficial o incluso impedir la visualización por microscopía 1.

Existe pues, una necesidad no satisfecha de un método de fabricación de circuitos microfluídicos que sea de bajo costo (respecto a la fotolitografía), adecuado para la producción en masa y que además permita una baja rugosidad(400nm) y resolución de hasta

10 μm (el tamaño de una célula). En este trabajo se propone el microfresado CNC como técnica para satisfacer dicha área de oportunidad.

2.3. Microfresado CNC

El microfresado CNC o fresado CNC de alta resolución, es una técnica de manufactura sustractiva en la que una herramienta rotatoria de corte remueve material de un sustrato al desplazarse, con resolución micrométrica ($\sim 10\mu\text{m}$) en una trayectoria definida por control numérico computarizado (ver figura).

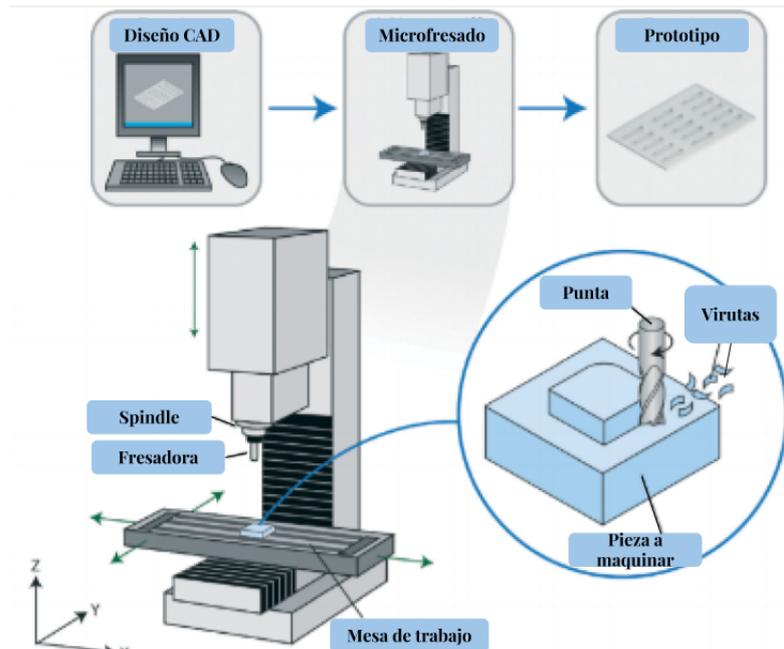


FIGURA 2.1: Proceso de fabricación por fresado CNC [28]

Gracias a que a partir de un modelo CAD en 3D se puede obtener la trayectoria de corte para producir tal pieza, este método se ha vuelto una herramienta muy usada para el prototipado ultrarápido, pues en un diseño sencillo el tiempo de maquinado puede ser tan corto como 3 minutos. Además de su rapidez, el gran atractivo de este método proviene de su versatilidad: escogiendo adecuadamente el tamaño y material de la fresadora, es posible maquinar áreas grandes (600cm^2) y pequeñas (1cm^2) en diversos materiales (plásticos, metales, ceras, madera, etc.) con baja y alta resolución ($1\text{mm} - 10\mu\text{m}$). Más aún, los equipos de fresado CNC modernos permiten producción en paralelo de varias piezas de forma completamente automatizada: preparan el sustrato a maquinar en el área de corte, fijan su sistema de coordenadas, cambian entre distintas herramientas e incluso realizan rutinas de acabado para mejorar la calidad de las superficies. [28, 29].

En los últimos años, esta técnica ha sido propuesta en diversas ocasiones como una alternativa a la fotolitografía para producción de dispositivos microfluídicos. Pese a que el fresado CNC no alcanza la resolución submicrométrica, en la mayoría de las aplicaciones una resolución de decenas de micras es suficiente, además, su versatilidad permite no sólo la fabricación de canales en PDMS si no en plásticos y metales [28].

En la actualidad, los dos métodos más empleados para la manufactura a escala de plásticos son el *Hot embossing* y el *Moldeo por inyección*. Estas técnicas aprovechan la maleabilidad de los plásticos a temperaturas superiores a su transición vítrea para estructurarlos empleando un molde. Estos métodos son empleados exitosamente en microfluídica por compañías

como *Microfluidic Chip Shop*. Sin embargo, en contraste con el fresado CNC, no son adecuados para el desarrollo de prototipos pues el costo de implementar una línea de producción en estas técnicas es elevado ($\sim 300k\$$) y requieren de un molde cuya fabricación debe ser resuelta por separado, por ejemplo por CNC. Una alternativa es el contratar una compañía de manufactura, con la desventaja de que el tiempo de espera por un prototipo incrementa. Así, el fresado CNC no sólo es atractivo para el desarrollo y prototipado de chips microfluídicos, si no también es posible alcanzar la producción a mediana escala ($300 - 2000\text{chips/mes}$) [29].

2.4. Fabricación de chips microfluídicos poliméricos por fresado CNC

Todo dispositivo microfluídico debe ser de un material compatible con la aplicación que con él se persiga. Debido a que en la mayoría de las aplicaciones microfluídicas lo que se busca es la biocompatibilidad y la resistencia química, los dos materiales más empleados son el PDMS y los termoplásticos. Desde la publicación en 1998 por Whitesides del uso de PDMS en microfluídica [23], este material se ha posicionado como el más utilizado en esta rama, lo cual no es de sorprenderse: además de que su estructuración por litografía suave está bien comprendida y es relativamente fácil de implementar, sus propiedades como la permeabilidad a gases, transparencia, biocompatibilidad y elasticidad han permitido el desarrollo de una amplia gama de dispositivos basados en ellas [29]. Un ejemplo son los llamados órganos en un chip, que son sistemas microfluídicos que explotan estas cualidades para emular las condiciones fisiológicas en un organismo y proveer a un cultivo celular de un entorno realista (un órgano en miniatura) en el que se pueden estudiar eventos como el suministro de un fármaco [30].

El uso de termoplásticos en microfluídica es una tendencia relativamente reciente, aunque se ha hablado de ella desde principios de los 2000's [31]. Su introducción a este campo proviene de la necesidad de un material compatible al mismo tiempo con aplicaciones en biología y con los métodos de manufactura a escala. A la fecha, se ha reportado el uso de plásticos como el poliestireno (PS), el policarbonato (PC), la familia de las olefinas cíclicas (COC, COP, CBC) y el polimetilmetacrilato (PMMA), que destacan por su estabilidad mecánica, baja absorción de agua y resistencia química a ácidos, bases y solventes, lo que los hace ideales para aplicaciones bioanalíticas como la cromatografía líquida de alta presión (HPLC). La tabla 2.1 muestra las principales propiedades (concernientes a la microfluídica) de estos termoplásticos así como del PDMS.

TABLA 2.1: Propiedades de los polímeros comúnmente usados en dispositivos microfluídicos [29].

Polímero Propiedades	Termoplásticos				
	PDMS	PC	PMMA	PS	COC/COP/CBC
Mecánica	Elastómero	Rígido	Rígido	Rígido	Rígido
Resistencia a solventes	Pobre	Buena	Buena	Pobre	Excelente
Resistencia a ácidos y bases	Pobre	Buena	Buena	Buena	Buena
Transmitancia en el visible	Excelente	Excelente	Excelente	Excelente	Excelente
Transmitancia en el UV	Buena	Pobre	Buena	Pobre	Excelente
Biocompatibilidad	Buena	Buena	Buena	Buena	Buena
Costo	$\sim 3k\$(1kg)$	$\sim 60\$/kg$	$\sim 40 - 80\$/kg$	$\sim 60\$/kg$	$\sim 400 - 500\$/kg$

El diagrama 2.2 muestra el proceso a seguir para la fabricación de un chip microfluídico polimérico (PDMS o plástico). El proceso se divide en tres etapas: diseño, fabricación de

canales y sellado e interfase. Es en la segunda etapa en la que el fresado CNC tiene una valiosa aportación.

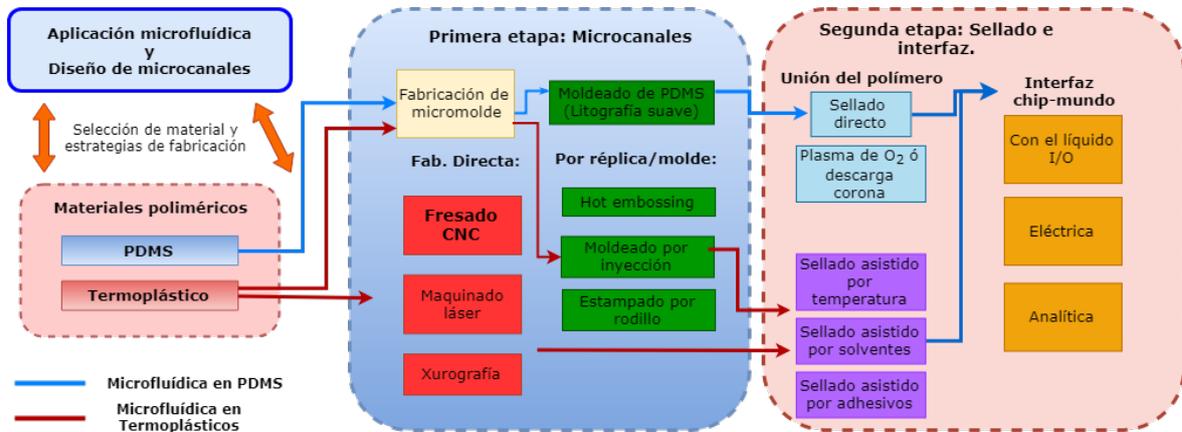


FIGURA 2.2: Etapas de fabricación de un chip microfluídico en PDMS o termoplásticos. [29]

1. **Diseño:** En esta primera etapa se busca el diseño del circuito microfluídico que permitirá la aplicación que se desea. En función de esta, se debe seleccionar el material en el que se fabricará el dispositivo. Considerando las propiedades enunciadas en la tabla 2.1 hay que ponderar cada uno de los materiales así como su costo y el proceso por el cual se va a estructurar. Si el dispositivo es un diseño bien estudiado y terminado, se recomienda proceder a la producción en masa por moldeo por inyección, por ejemplo. No obstante, si se está trabajando en el desarrollo de un prototipo, se recomiendan las técnicas rápidas (impresión 3D, xurografía, **microfresado CNC**) pues se facilita la identificación de los posibles errores y las posibilidades de mejora.
2. **Fabricación de los microcanales.** El microfresado CNC permite la fabricación indirecta de microcanales en PDMS y la fabricación directa e indirecta en termoplásticos. En la figura 2.3 se esquematiza el proceso de fabricación de chips microfluídicos en PMMA y PDMS² por medio de ésta técnica.
 - **Fabricación indirecta: PDMS** En el caso del PDMS la fabricación de microcanales se lleva a cabo por litografía suave. El PDMS en forma líquida se mezcla con su agente curante en una proporción 10:1 (M/M) y se vierte sobre un molde con estructuras en relieve. Después de dejarse curar a 60 deg C durante al menos una hora (ver apéndice B) el polímero solidifica replicando la topografía del molde (ver figura litografía suave). En litografía suave convencional, el molde a replicar se fabrica por fotolitografía a la que, como se discutió arriba, el fresado CNC es una alternativa. Si en lugar de remover con la fresadora el circuito microfluídico deseado se remueve el material que lo rodea, lo que se obtiene es el negativo del canal en relieve que al replicarse en PDMS producirá el microcanal abierto deseado (figura 2.3).
 - **Fabricación directa: Termoplásticos** La fabricación directa en plásticos se logra al utilizar la fresadora para remover el material en el área de los microcanales. En esta aproximación, el tamaño que se puede alcanzar para un microcanal depende del diámetro de la fresadora empleada (existen compañías que ofrecen fresadoras de hasta 25um). Como ventaja, el maquinado directo de microcanales es mucho

²Por sus propiedades (tabla 2.1), costo y disponibilidad

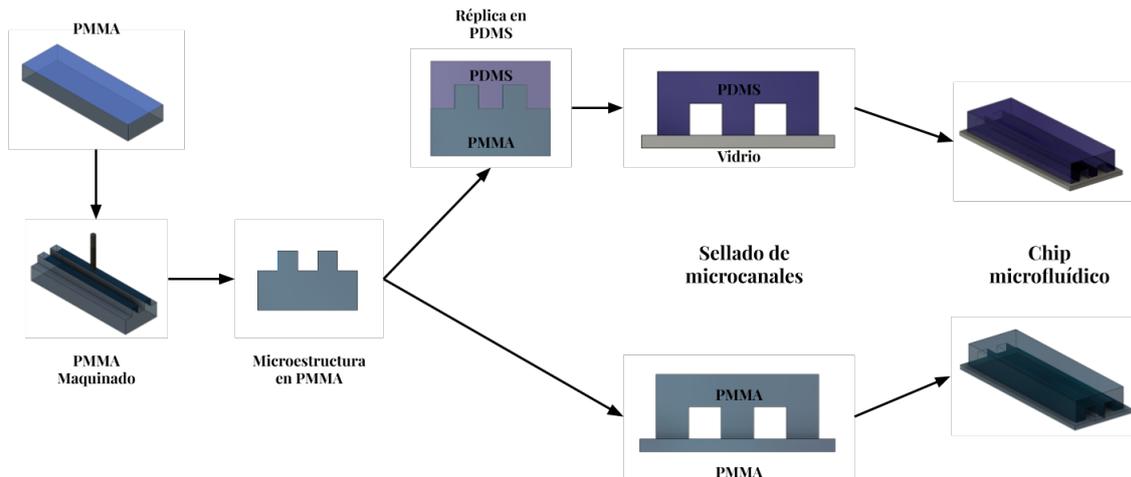


FIGURA 2.3: Proceso de fabricación de un chip microfluídico en PDMS o en PMMA por microfresado CNC.

más rápido que el maquinado de moldes gracias a que se remueve una menor cantidad de material. Por ejemplo, un canal de 50 μm se puede fabricar en 2 minutos al desplazar la fresadora a una velocidad de $25\text{mm}/\text{min}$ [28].

- Fabricación indirecta: Termoplásticos** En termoplásticos, la fabricación indirecta emplea la plasticidad de estos materiales para transferir una estructura de un molde a su superficie. Este proceso se logra calentando el molde y el plástico por encima de la temperatura T_g de transición vítrea del material y aplicando presión³ en un ciclo que depende del material, la temperatura y la resolución deseada [32]. Este método es el más atractivo para la producción a escala de chips, aunque la fabricación del molde debe realizarse por separado. Aunque se ha reportado el uso de micromoldes de silicio, se prefiere el uso de metales al ser más resistentes y compatibles con métodos de fabricación accesibles como el fresado CNC.

- Sellado e interfaz.** Los métodos mencionados en la sección anterior producen canales abiertos (de tres paredes), es decir, la fabricación de un microcanal completo requiere de un paso extra: el sellado sobre un sustrato. En PDMS este proceso se realiza comúnmente sobre vidrio o PDMS y se encuentra bien estudiado desde 1998 [23]; en él un tratamiento de plasma ioniza los grupos de la superficie dejando enlaces disponibles que se unen unos con otros al poner ambas superficies en contacto. Pese a que el método publicado por Whitesides emplea un equipo de plasma de oxígeno para activar las superficies, actualmente pueden usarse equipos de bajo costo como bobinas Tesla cuya descarga corona es suficiente para producir dicho fenómeno. En la práctica este proceso es relativamente fácil de implementar y de corta curva de aprendizaje.

En la actualidad el sellado de microcanales en plásticos sigue siendo un tema de investigación y es, según algunos autores, la razón principal que impide la comercialización en masa de chips microfluídicos [33]. En estos materiales, de forma opuesta al PDMS, la estructuración de microcanales es sencilla de implementar mientras que el sellado,

³La compresión del molde con el material se puede realizar empleando una prensa, un rodillo o mediante un tornillo que inyecta el plástico derretido en una cavidad con el molde, estos procesos se conocen como *Hot embossing*, *Roller imprinting* e *Injection Molding* respectivamente.

que usualmente se hace sobre otro sustrato del mismo material, es un reto aún no superado. Se han propuesto en la literatura métodos como el *asistido por temperatura* [34] en el que se lleva el material a una temperatura superior a su T_g para fundir la placa maquinada y el sustrato. Aunque es un método directo de implementar su desventaja es que deforma la geometría de los canales. El uso de adhesivos es otra aproximación cuyo éxito ha llegado al nivel comercial [29], no obstante éste método resulta poco atractivo para la mayoría de la comunidad por la alta probabilidad de que el adhesivo llene los canales y los bloquee. Un método prometedor es el *asistido por solventes* [35], en el cual un solvente orgánico incompatible con el material se usa para atacar las superficies y promover la movilidad de sus moléculas, cuando ambos sustratos se ponen en contacto y se aplica presión, la difusión de las moléculas de una con la otra entrecruzan las superficies y logran una unión resistente a altas presiones (28 MPa). Aunque se encuentran publicados diversos protocolos, la implementación de estos en otros laboratorios resulta complicada, lo que frecuentemente se debe a que los materiales empleados son diferentes con cada proveedor. Así, cada vez que se desea fabricar chips en estos termoplásticos es necesario desarrollar un protocolo de pegado adaptado al material disponible.

2.5. Objetivo de este trabajo de tesis

En las secciones previas se ha presentado a los *Lab on Chip* como respuesta a la necesidad de una alternativa para la investigación biomédica y los métodos de diagnóstico convencionales. Para que este cambio de paradigma sea posible, se deben de resolver fundamentalmente el reto de la fabricación escalable de estos dispositivos, para el cual el fresado CNC de alta resolución ($\sim 10\mu m$) presenta una valiosa aportación.

El Laboratorio Nacional de soluciones biomiméticas para diagnóstico y terapia es una institución que busca conectar la tecnología de punta con las necesidades de la sociedad en el área de la salud. En particular, en el laboratorio de micro y nanotecnología $\mu NTec$ se propone el uso de la microfluídica y la tecnología *Lab on Chip* en aras de este objetivo y en este trabajo de tesis se explora, según lo mostrado a lo largo de éste capítulo, el fresado CNC como técnica para lograrlo.

El objetivo general de este proyecto es el desarrollo de un protocolo de fabricación de dispositivos microfluídicos para su uso en investigación biomédica. La figura 2.4 presenta el equipo de microfresado CNC alrededor del cual se desarrolla este trabajo, utilizándolo para la producción de chips microfluídicos en PDMS y PMMA⁴. Este proyecto se dividió en los siguientes objetivos particulares cuyos resultados se presentan en el capítulo siguiente:

- Desarrollar un protocolo de operación del equipo y maquinado de moldes y microcanales para fabricación directa en PMMA e indirecta en PDMS.
- Caracterización de la rugosidad y la resolución alcanzables en las micro estructuras.
- Desarrollo de un protocolo de réplicas en PDMS y su sellado en vidrio.
- Desarrollo de un protocolo de sellado para chips de PMMA.

⁴ termoplástico que se elige por su disponibilidad, costo, y previa experiencia con él

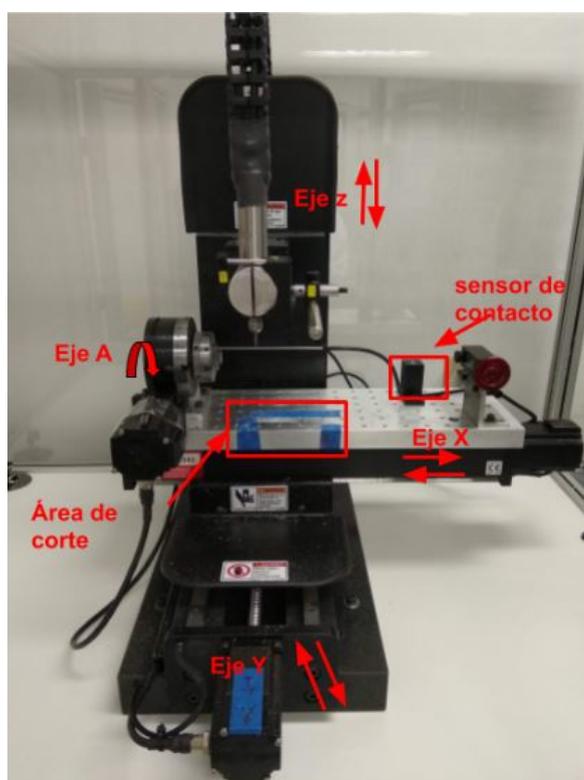


FIGURA 2.4: Equipo MiniMill 4 de fresado CNC empleado en este trabajo.

Capítulo 3

Desarrollo y Resultados

A lo largo de este capítulo se describe el trabajo realizado para lograr la fabricación de chips microfluídicos en PDMS y PMMA empleando microfresado CNC. Cada uno de los objetivos particulares presentados en el capítulo 2 corresponde a una etapa a desarrollar y consolidar en el proceso de fabricación cuyo esquema se presenta en la figura 3.1:

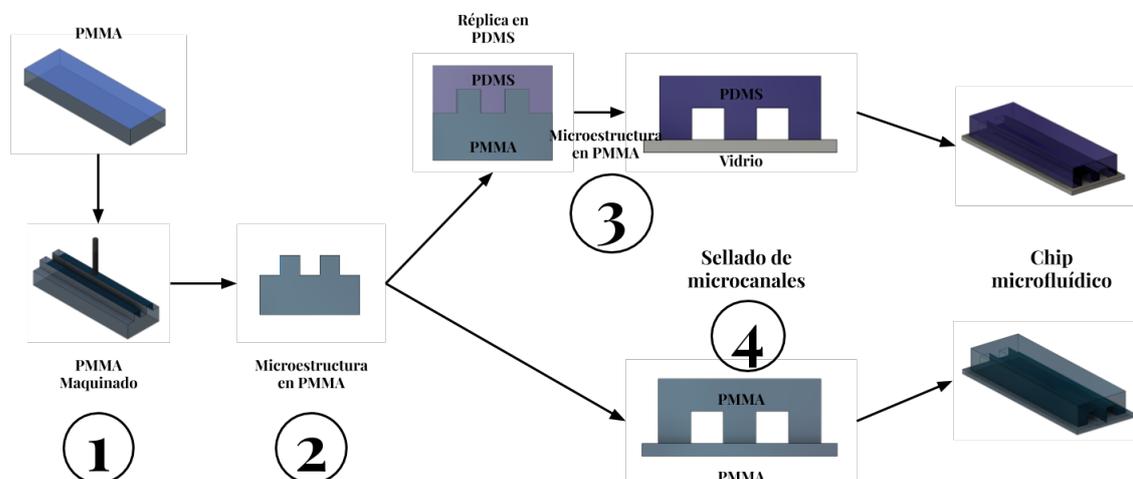


FIGURA 3.1: Proceso de fabricación de chips microfluídicos por fresado CNC y objetivos particulares de este trabajo.

1. Desarrollar un protocolo de operación del equipo y maquinado de moldes y microcanales para fabricación directa en PMMA e indirecta en PDMS.
2. Caracterización de la rugosidad y la resolución alcanzables en las micro estructuras.
3. Desarrollo de un protocolo de réplicas en PDMS y su sellado en vidrio.
4. Desarrollo de un protocolo de sellado para chips de PMMA.

3.1. Operación del equipo de microfresado CNC Minimill4

El maquinado de una pieza por fresado CNC requiere de tres etapas.

1. Diseño en CAD y CAM.
2. Preparación del equipo.
3. Maquinado de la pieza.

3.1.1. Diseño en CAD y CAM

El diseño asistido por computadora (CAD) y el maquinado asistido por computadora (CAM) son dos técnicas que han permitido el avance de la manufactura a un ritmo sin precedentes. Por una parte el diseño CAD, que consiste en el modelado 3D de objetos en una computadora, no sólo permite la creación de diseños y piezas de alta complejidad si no que facilita el prototipado ultra rápido al sólo requerirse *un par de clicks* para modificar dimensiones y características entre un modelo y su versión siguiente. Tal velocidad de prototipado para la mejora de un diseño no sería posible sin el maquinado asistido por computadora, método en el que un diseño CAD se traduce en instrucciones numéricas (Control Numérico Computarizado) para la producción de dicho modelo por una máquina. En conjunto, estas herramientas facilitan la automatización de una serie de procesos que anteriormente requerían de la intervención humana. De esta forma, la precisión y eficiencia de la manufactura se incrementan.

El diseño CAD y CAM en este trabajo se realizaron en el software *Autodesk Fusión 360*. La mayor ventaja de este software es que en él se implementan en un mismo entorno el diseño CAD y CAM de una pieza: cualquier modificación en el modelo 3D se traduce sin esfuerzo en el archivo (.NC) con las instrucciones para la fabricación de una pieza.

Un diseño a maquinar comienza con un modelo en 3D que a su vez inicia como un dibujo 2D de dimensiones fijas que se extruye. A manera de ejemplo, la figura 3.2 presenta el flujo de trabajo para crear un cilindro con una cavidad en el centro.

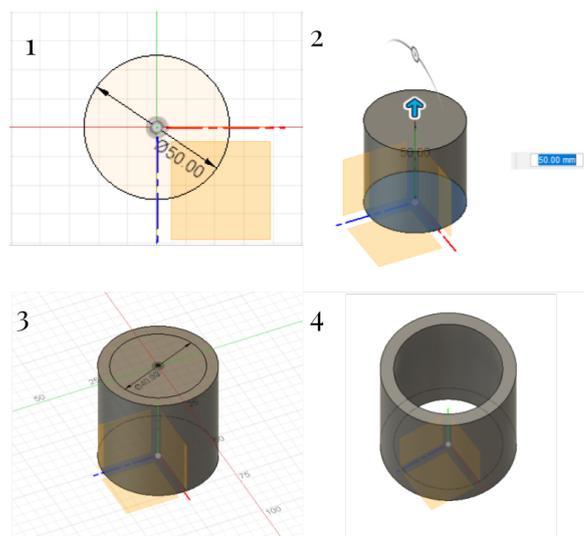


FIGURA 3.2: Flujo de trabajo para el modelado en 3D de un cilindro.

Una vez que se tiene el modelo 3D deseado, se procede a la fase de CAM. El primer paso de esta rutina consiste en construir un modelo del sustrato que se va a emplear para maquinar la pieza. Una vez que se cuenta con él, se identifican las zonas de material a remover, se selecciona la herramienta adecuada para tal propósito¹ y se especifican las características de la trayectoria que seguirá para la remoción del material (velocidad, número de pasadas, dirección, traslape, etc.). La figura 3.3 presenta el flujo de trabajo de esta etapa, así como una simulación del proceso.

La etapa de diseño concluye en el momento en que se tiene una trayectoria de corte que produce la pieza deseada y que satisface los parámetros del operador. Para finalizar, basta

¹Seleccionar una herramienta no es un proceso trivial: tamaño, material, forma y velocidad de corte son algunos de los factores a considerar que se ha reportado en la literatura afectan drásticamente el proceso. Una discusión en esta área se presenta en las secciones siguientes.

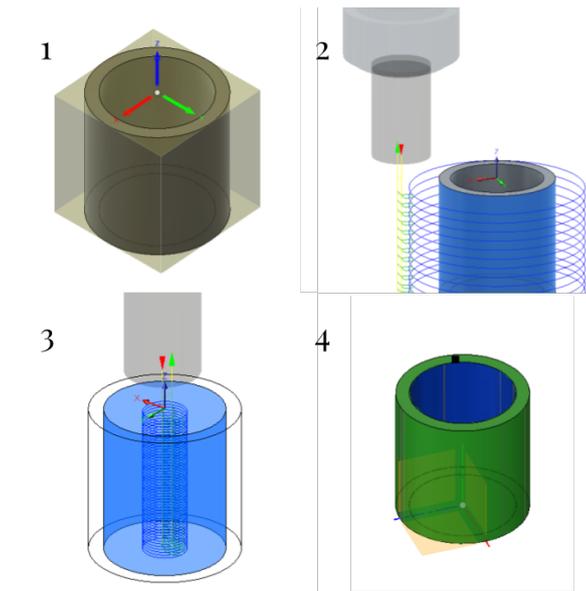


FIGURA 3.3: Flujo de trabajo para el modelado CAM de una pieza

con exportar dicha trayectoria a un archivo .NC que contiene las instrucciones de corte en el formato GCODE.

3.1.2. Preparación del equipo

Como resultado de este trabajo, se desarrolló un procedimiento técnico (ver apéndice A) de operación del equipo CNC Minimill 4 (figura 2.4). La parte central de este procedimiento es fijar el sustrato a maquinar (pieza de trabajo) sobre la mesa de trabajo y sobre él definir un sistema de coordenadas sobre el cual se trabajará el maquinado. De estos dos puntos depende la precisión² y la exactitud³ de las geometrías maquinadas y por tanto la calidad de la pieza final.

3.1.2.1. Sujeción de la pieza de trabajo

En maquinado tradicional, donde las tolerancias admitidas en las piezas están ente las $10\mu m$ y $100\mu m$, se suelen emplear abrazaderas o mordazas para fijar la pieza a la mesa de trabajo de las máquinas, debido a su practicidad. En rutinas de precisión en plásticos estos métodos son inadecuados pues la fuerza ejercida sobre el sustrato deforma el material(3.4), esto resulta en una reducción en la exactitud de las dimensiones de la geometría maquinada. En este trabajo, como alternativa, se empleó cinta adhesiva doble cara para sujetar el material a la mesa de trabajo, la cual elimina la presión sobre el material y con ella los errores de maquinado originados por el *warpage* y vibraciones del material(3.4)[28].

3.1.2.2. Sistema de coordenadas sobre la pieza de trabajo

En un sistema de control numérico existen dos sistemas de coordenadas principales sobre los que se define el movimiento de la máquina. El *sistema de coordenadas absoluto* es aquel cuyo origen esta referido a los límites de carrera de los motores, y es a partir del cual el equipo reconoce la posición de la mesa de trabajo, del spindle y sus diferentes componentes respecto a sí mismo. Para fijar este sistema de coordenadas, se emplea una rutina de *Home*

²**Precisión:**Consistencia entre varias estructuras.

³**Exactitud:**Capacidad de lograr dimensiones programadas.

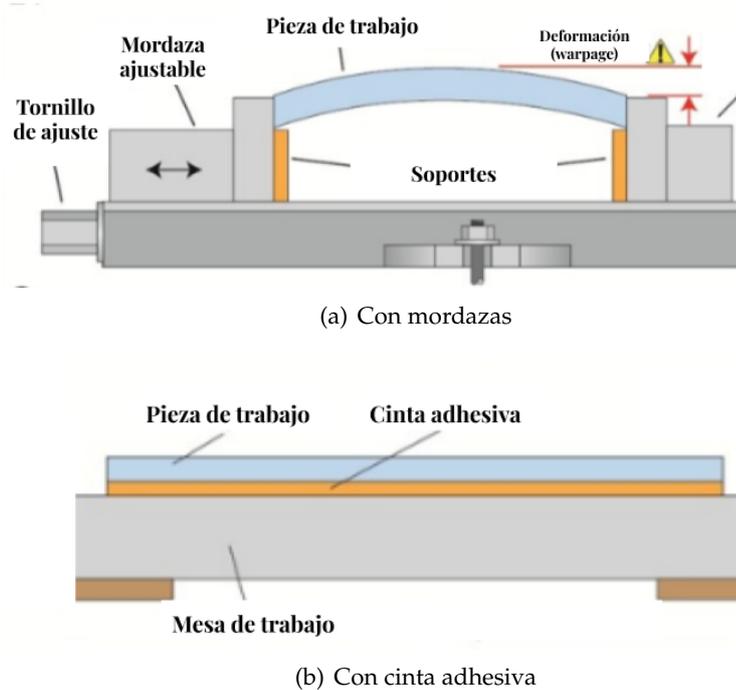


FIGURA 3.4: Métodos de sujeción de la pieza a la mesa de trabajo.

en la que los motores se desplazan hasta activar los switches de límite de carrera en todos los ejes; es en esta posición que se fija el origen absoluto de la máquina y gracias a que esta es fija (y repetible), con hasta $5\mu\text{m}$ de precisión, el equipo puede regresar siempre a las posiciones predeterminadas de los distintos componentes y evitar colisiones de un eje con los otros.

El *sistema de coordenadas de trabajo* se emplea para el maquinado de la pieza y su origen puede desplazarse a voluntad por el usuario. Gracias a este sistema, el usuario puede maquinar distintas piezas de forma versátil pues en la etapa de diseño se puede especificar algún punto del sustrato como origen de las trayectorias de corte, por lo que se puede colocar dicho material a maquinar en cualquier punto de la mesa de trabajo sin comprometer su precisión e integridad.

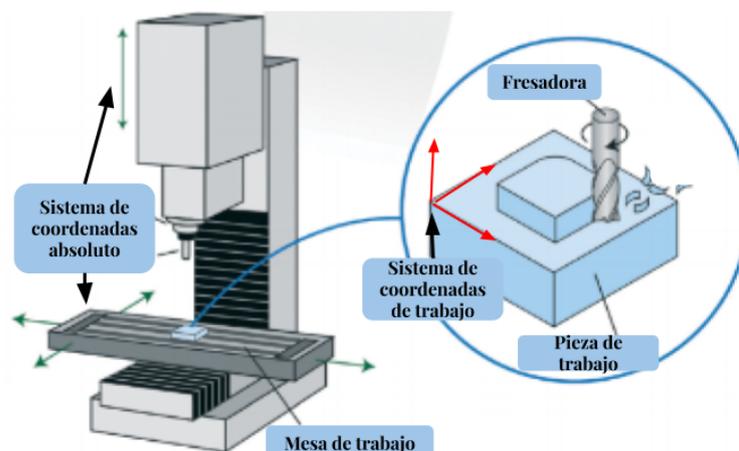


FIGURA 3.5: Sistemas de coordenados en un equipo CNC

Comúnmente, se elige el centro de la pieza de trabajo o una de sus esquinas como origen relativo de la máquina. Para todas las rutinas programadas en esta tesis y como estándar en

el procedimiento desarrollado, se emplea la esquina inferior izquierda de los sustratos⁴ como origen de las rutinas de corte; así, una vez fijo el portaobjetos de PMMA con cinta doble cara a la mesa de trabajo, la siguiente tarea es determinar la posición XYZ en coordenadas absolutas de dicha esquina.

Para fijar el sistema de coordenadas de trabajo, se han mostrado en la literatura diversos métodos que incluso se han traducido a soluciones disponibles en el mercado. Dos métodos comúnmente empleados y que no requieren de una herramienta especial, son el uso de una hoja de papel que, a mano, se desliza suavemente sobre la superficie del sustrato a medida que se acerca lentamente la fresadora a él, en el momento en que la fresadora hace contacto con la hoja, esta evita su movimiento, por lo que operador puede fijar la coordenada absoluta actual de la fresadora más el espesor de la hoja de papel como origen de ese eje. El segundo método consiste en visualizar cuidadosamente, al desplazar lentamente la fresadora al sustrato, el punto de contacto con el sustrato.

Debido a las dimensiones de las geometrías que se desean en microfluídica, las fresadoras empleadas para este propósito son micrométricas de diámetro $381\mu\text{m}$, $254\mu\text{m}$ y $127\mu\text{m}$, para las rutinas de corte en las que se dese remover porciones macrométricas (cm^2) de material se emplea una fresadora de 3.17 mm. Como consecuencia de su reducido tamaño, el punto de contacto de estas con la hoja de papel es difícil de *sentir* por lo que este método no es adecuado para este trabajo. Es este mismo tamaño el que impide la inspección empleando el segundo método, sin embargo, como solución a esta dificultad se propuso el uso de un microscopio USB montado sobre la mesa de trabajo para visualizar la posición de contacto (figura 3.6) que se identifica al observar el PMMA removido del sustrato en forma de un polvo blanco fino.

Una vez que se tiene el sustrato sujeto a la mesa y el sistema de coordenadas de trabajo fijo en él, el equipo se encuentra listo para proceder a la rutina de corte.

3.1.2.3. Maquinado de la pieza

Durante esta última etapa, la rutina de corte CAM de su correspondiente diseño CAD guía la fresadora sobre el sustrato para la producción de la pieza. Es en esta etapa que se debe tener extrema precaución con el equipo pues la fuerza de los motores y el filo de la fresadora (que gira a 60 kRPM) son suficientes como para triturar y cercenar piel y huesos.

En la etapa de diseño CAM, además de determinarse la trayectoria que seguirá la fresadora sobre el sustrato, se especifica su velocidad de desplazamiento (*Feed Rate*) y de rotación (*RPM*). Es un hecho bien conocido que estos parámetros son críticos para un trabajo exitoso pues de ellos depende la calidad de las superficies (*rugosidad*) y la integridad de la herramienta de corte⁵. Tomando como referencia el trabajo de Guckenberget al [28], para las primeras pruebas en este trabajo se emplearon las velocidades de corte de la tabla 3.1 con las fresadoras de 3.17 mm, $381\mu\text{m}$, $254\mu\text{m}$ y $127\mu\text{m}$.

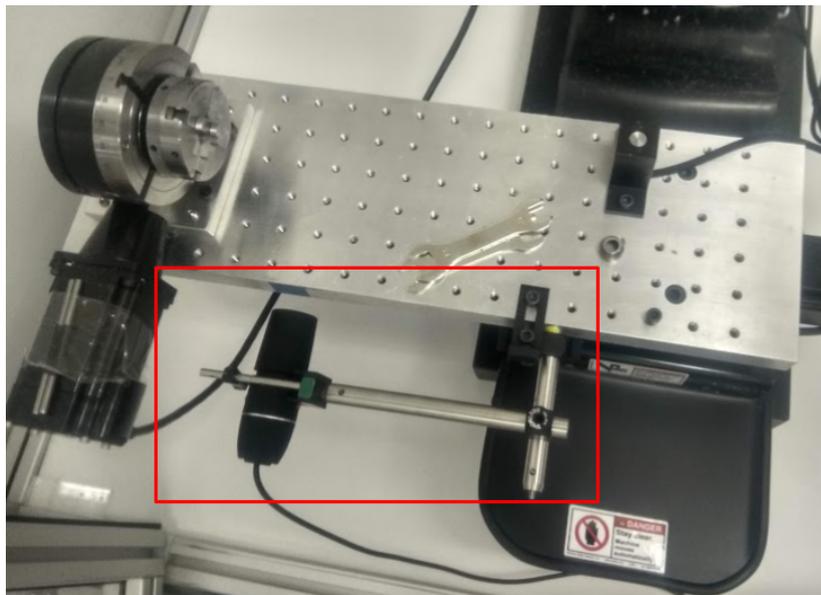
Empleando estos parámetros de forma conjunta con el procedimiento de operación del equipo se logró exitosamente maquinar los primeros resultados de este trabajo (fig. 3.7).

3.2. Caracterización

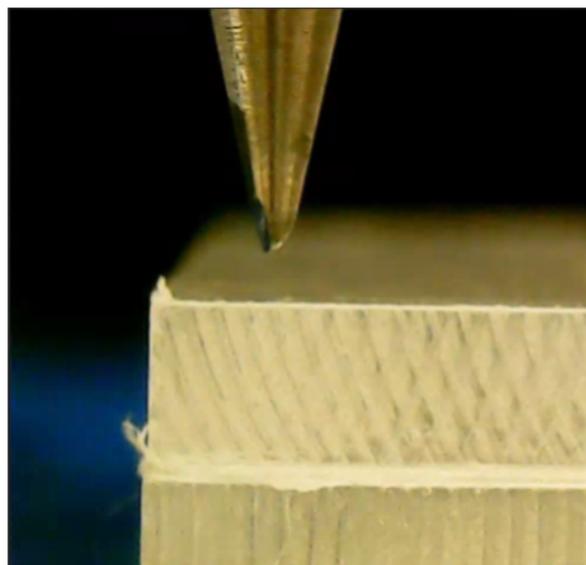
Tras consolidar un procedimiento de operación, el siguiente paso hacia la fabricación de dispositivos microfluídicos por fresado CNC es la caracterización de los modelos maquinados. Como se discutió en el capítulo 1, a microescala las fuerzas que dependen del área

⁴A pesar de que es posible maquinar sustratos de cualquier geometría, en este trabajo se emplearon exclusivamente portaobjetos de PMMA de 75X25X2 mm

⁵Una fresadora que se emplea a velocidades de desplazamiento o giro inadecuadas puede perder su filo o romperse.



(a) Microscopio USB



(b) Detalle con el microscopio de la fresadora y la superficie de la pieza de trabajo

FIGURA 3.6: Arreglo para fijar el sistema de coordenadas de trabajo.

TABLA 3.1: Parámetros de corte preliminares

Diámetro	Vel. Desplazamiento (mm/min)	Vel. Giro(kRPM)
127 μm	5	5
254 μm	25	5
381 μm	25	5
3,17mm	100	5

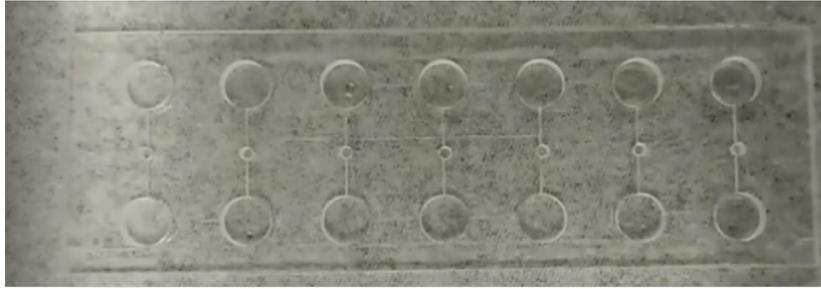


FIGURA 3.7: Resultados preliminares: Pozos y microcanales en un portaobjetos de PMMA

dominan sobre las que dependen del volumen. Al mismo tiempo el tamaño de los microcanales (ancho y largo) determina la resistencia microfluídica R cuyo valor es fundamental para conocer el flujo que origina una diferencia de presión ΔP . Así, los dos factores críticos para la microfluídica a caracterizar en esta etapa son la rugosidad y la resolución (tamaño de los microcanales) que el equipo permite.

3.2.1. Caracterización de la Rugosidad

La rugosidad de una superficie que se obtiene por micro fresado CNC depende de tres parámetros: el tamaño de la micropunta de corte, el *feed rate*⁶ y la velocidad de giro del spindle⁷ [28]. Para evaluar el papel de estos tres factores se diseñaron 4 estructuras (una por cada punta de corte con que se cuenta) en la que se maquinaron cavidades cuadradas (fig. 3.8) variando el *feed rate* y las velocidad del spindle. Para la fresadora de 3.17mm las dimensiones de las cavidades fueron de 17x5x0.2mm mientras que para las micrométricas fueron de 5x0.625x0.050mm. Cada una de las cavidades se realiza con uno de los pares (*feedrate, vel. giro*) que se muestran para cada pieza en la figura 3.9 y las muestras obtenidas de dicho proceso se presentan en la figura 3.10.



FIGURA 3.8: Estructura de cavidades cuadradas para evaluar la rugosidad.

3.2.1.1. Rugosidad y Ondulación

La caracterización de la rugosidad se realizó por perfilometría de contacto (KLA Tencor D-600), técnica en la cual una aguja se desplaza a velocidad constante sobre un sustrato y

⁶Velocidad de desplazamiento de los motores

⁷Herramienta rotatoria

5 kRPM 50 mm/min	7,5 kRPM 50 mm/min	10 kRPM 50 mm/min	12kRPM 50 mm/min
5 kRPM 25 mm/min	7,5 kRPM 25 mm/min	10 kRPM 25 mm/min	12kRPM 25 mm/min
5 kRPM 5 mm/min	7,5 kRPM 5mm/min	10 kRPM 5mm/min	12kRPM 5mm/min

(a) Fresadora de $127\mu m$

5 kRPM 100 mm/min	7,5 kRPM 100 mm/min	10 kRPM 100 mm/min	12kRPM 100 mm/min
5 kRPM 50 mm/min	7,5 kRPM 50 mm/min	10 kRPM 50 mm/min	12kRPM 50 mm/min
5 kRPM 25 mm/min	7,5 kRPM 25 mm/min	10 kRPM 25 mm/min	12kRPM 25 mm/min
5 kRPM 5 mm/min	7,5 kRPM 5mm/min	10 kRPM 5mm/min	12kRPM 5mm/min

(b) Fresadora de $254\mu m$

5 kRPM 100 mm/min	7,5 kRPM 100 mm/min	10 kRPM 100 mm/min	12kRPM 100 mm/min
5 kRPM 50 mm/min	7,5 kRPM 50 mm/min	10 kRPM 50 mm/min	12kRPM 50 mm/min
5 kRPM 25 mm/min	7,5 kRPM 25 mm/min	10 kRPM 25 mm/min	12kRPM 25 mm/min
5 kRPM 5 mm/min	7,5 kRPM 5mm/min	10 kRPM 5mm/min	12kRPM 5mm/min

(c) Fresadora de $381\mu m$

5 kRPM 1000 mm/min	7,5 kRPM 1000 mm/min	10 kRPM 1000 mm/min	15 kRPM 1000 mm/min
5 kRPM 500 mm/min	7,5 kRPM 500 mm/min	10 kRPM 500 mm/min	15 kRPM 500 mm/min
5 kRPM 250 mm/min	7,5 kRPM 250 mm/min	10 kRPM 250 mm/min	15 kRPM 250 mm/min
5 kRPM 100 mm/min	7,5 kRPM 100 mm/min	10 kRPM 100 mm/min	15 kRPM 100 mm/min

(d) Fresadora de $3,17mm$

FIGURA 3.9: Parámetros de corte (feedrate, vel. spindle) empleados en cada cavidad para evaluar la rugosidad con las distintas fresadoras.

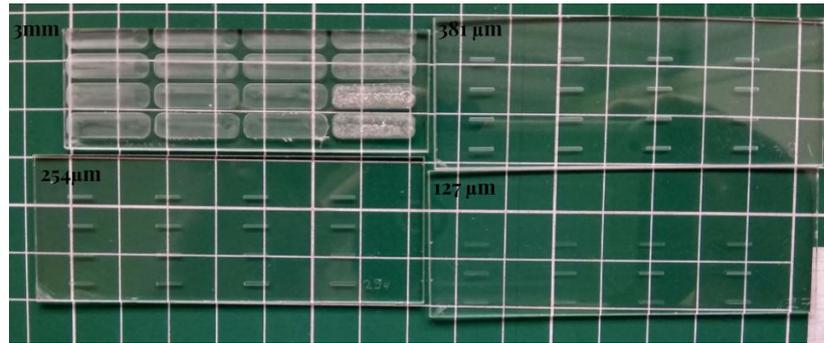


FIGURA 3.10: Muestras de PMMA maquinadas.

detecta las variaciones de altura en dicha trayectoria (fig. 3.11). Típicamente el perfil primario⁸ de una superficie corresponde a una superposición de muchas longitudes de onda, que según su tamaño (en forma descendente) se separan en forma, ondulación y rugosidad. Para separar las distintas componentes de un perfil primario, en analogía con el análisis de señales, se emplean filtros pasa bandas según la información que se requiera estudiar. Ya que las frecuencias de corte en estos filtros pasa bandas son un parámetro libre, para este trabajo se tomó como referencia la *norma internacional ISO4288* que establece que para un perfilómetro de contacto, cuya punta tiene un radio de curvatura de $2\mu\text{m}$ se emplea para obtener el perfil de rugosidad un filtro pasa altas con una frecuencia de corte $\lambda_c = 800\mu\text{m}$ [36, 37, 38]. Debido a la periodicidad de la rugosidad esperada por el proceso de fresado y encontrada posteriormente en los perfiles, se aplicó según la *norma internacional ISO 16610*, a los datos obtenidos un filtro pasa altas gaussiano robusto⁹[39, 40]. La figura 3.12 muestra un típico perfil primario y sus correspondientes perfiles de rugosidad y ondulación.

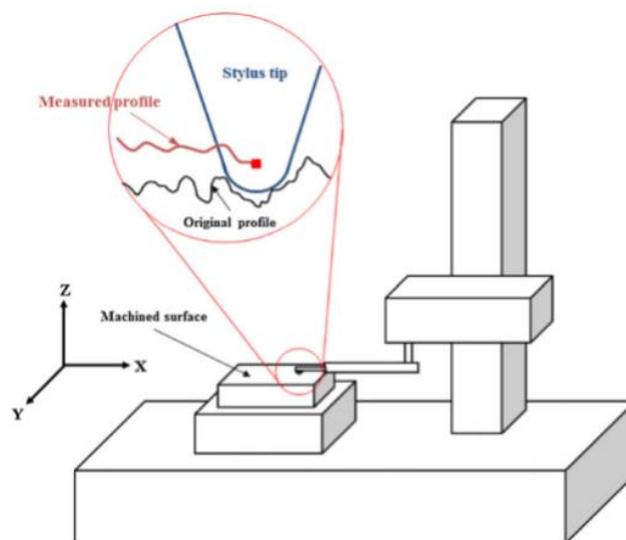


FIGURA 3.11: Perfilometría de contacto.

⁸El que se obtiene de los datos crudos de una medición

⁹Las frecuencias de corte para separar un perfil primario en sus componentes se indican en la norma ISO4288, mientras que la forma del filtro, gaussiana robusta, es indicada por la norma ISO16610

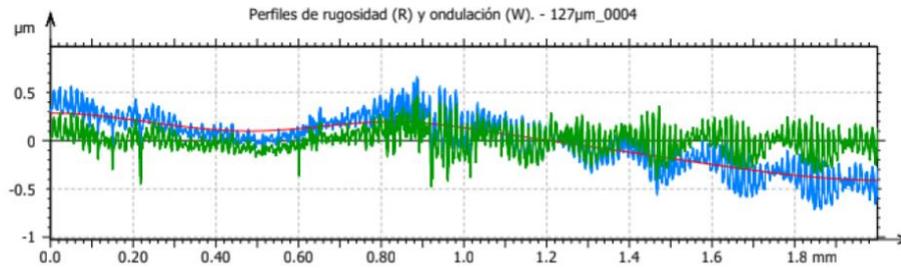


FIGURA 3.12: Perfil primario (azul) y sus componentes de ondulación (rojo) y rugosidad (verde).

3.2.1.2. Coeficientes de Rugosidad

De forma general, los perfiles de rugosidad de una superficie son demasiado complejos para evaluarse con un sólo coeficiente [8, 41]. Para entender mejor las propiedades en un perfil se han desarrollado un amplio número de parámetros que describen tanto las variaciones verticales (parámetros de amplitud) como longitudinales (parámetros de espaciamento) de la altura, una lista exhaustiva de ellos puede ser consultada en el trabajo de Soliman et. al. [41]. El parámetro más empleado en la literatura para reportar la rugosidad es el promedio aritmético de las alturas R_a al que también se le conoce como línea promedio central (CLA) y se define como el promedio del valor absoluto de todas las alturas medidas en el perfil (ver eq. 3.1). Gracias a su fácil definición y cálculo, este coeficiente presenta una buena descripción de los cambios en la altura y puede emplearse como primera aproximación para describir una superficie, no obstante, se ha de tomar con cautela ya que no es susceptible a las pequeñas variaciones de perfil a perfil y puede, en casos específicos, representar erróneamente una superficie [8]. Para entender más a fondo un perfil de rugosidad se emplea el *coeficiente de rugosidad RMS* R_q (eq. 3.2) que al promediar el cuadrado de las alturas es más sensible a pequeños cambios y grandes desviaciones del promedio [41].

$$R_a = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i| \quad (3.1)$$

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i^2} \quad (3.2)$$

3.2.1.3. Resultados

Las figuras siguientes presentan los resultados de la caracterización de la rugosidad de una rutina de maquinado como función del tamaño de la fresadora, su *Feed Rate* y su *velocidad de spindle*. Para cada uno de los perfiles primarios obtenidos se calcularon los valores R_a y R_q de los perfiles de rugosidad, que se obtienen después aplicar el filtro gaussiano pasa altas. Estos valores se mapean según sus condiciones de maquinado en el plano FeedRate-Vel.Spindle con un punto azul y para indicar su valor se emplea la escala de colores mostrada a su derecha.

Fresadora 127 μm :

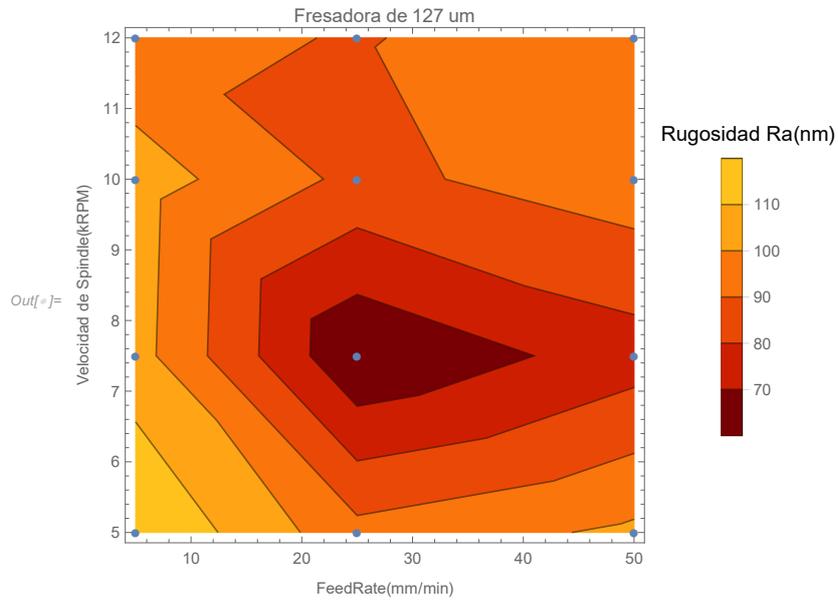


FIGURA 3.13: Rugosidad Ra con la fresadora de 127 μm

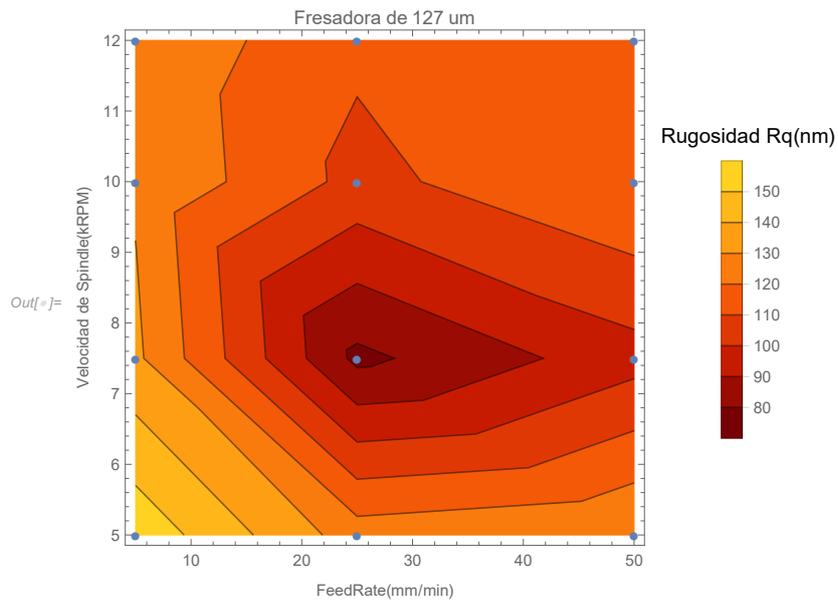


FIGURA 3.14: Rugosidad Rq con la fresadora de 127 μm

Fresadora $254\mu m$:

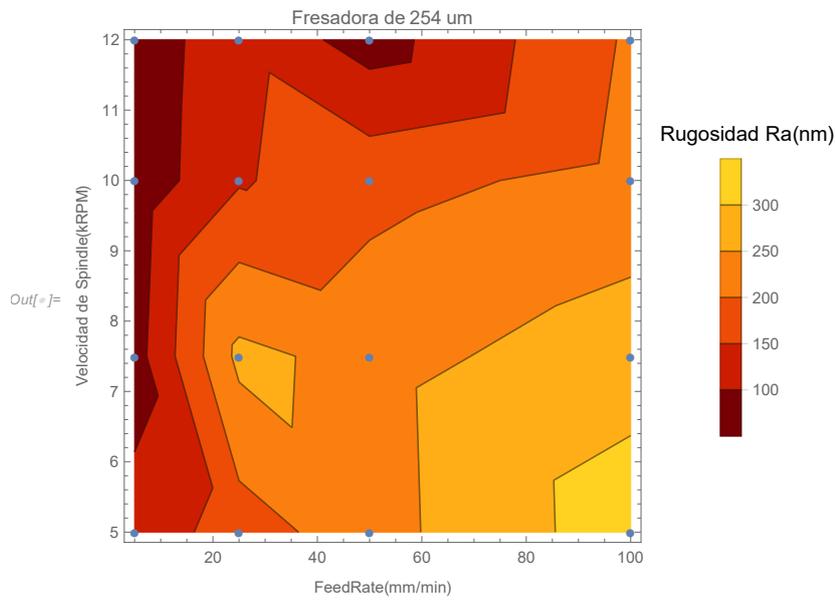


FIGURA 3.15: Rugosidad R_a con la fresadora de $254\mu m$

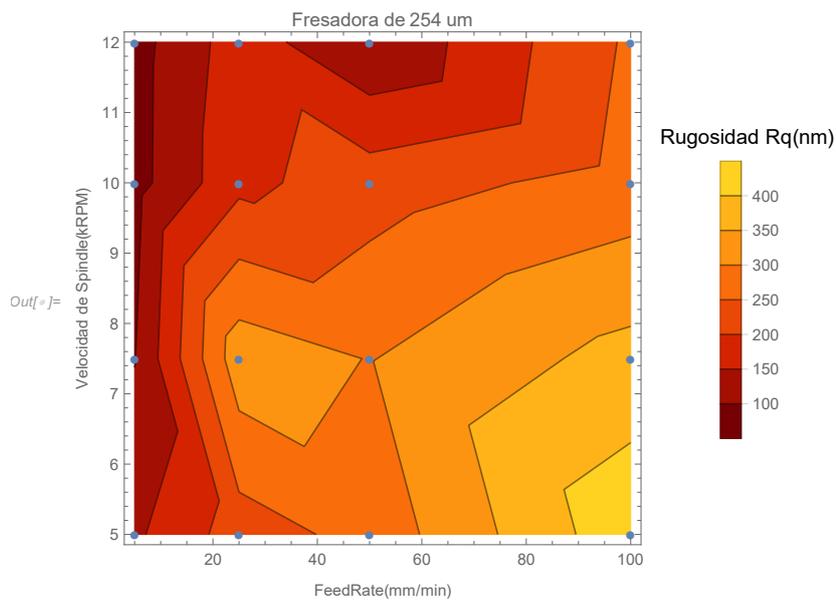


FIGURA 3.16: Rugosidad R_q con la fresadora de $254\mu m$

Fresadora $381\mu\text{m}$:

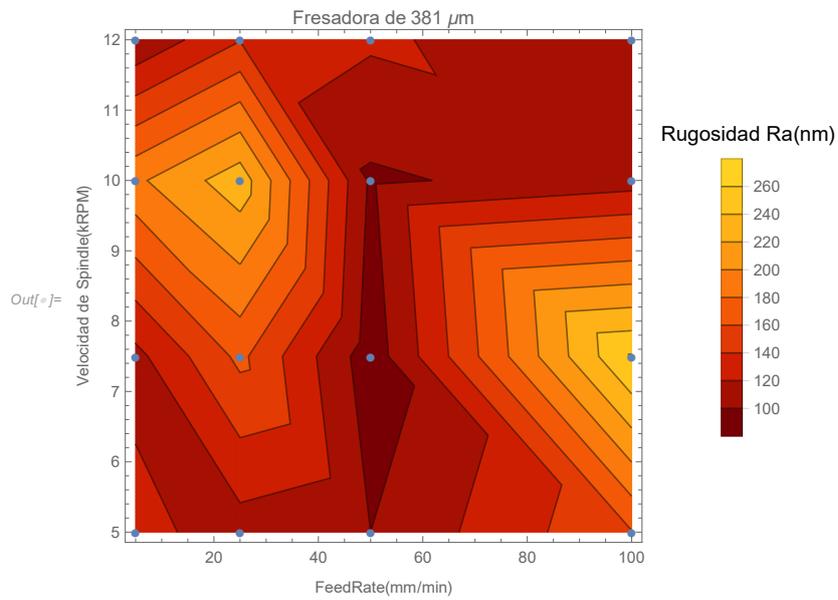


FIGURA 3.17: Rugosidad R_a con la fresadora de $381\mu\text{m}$

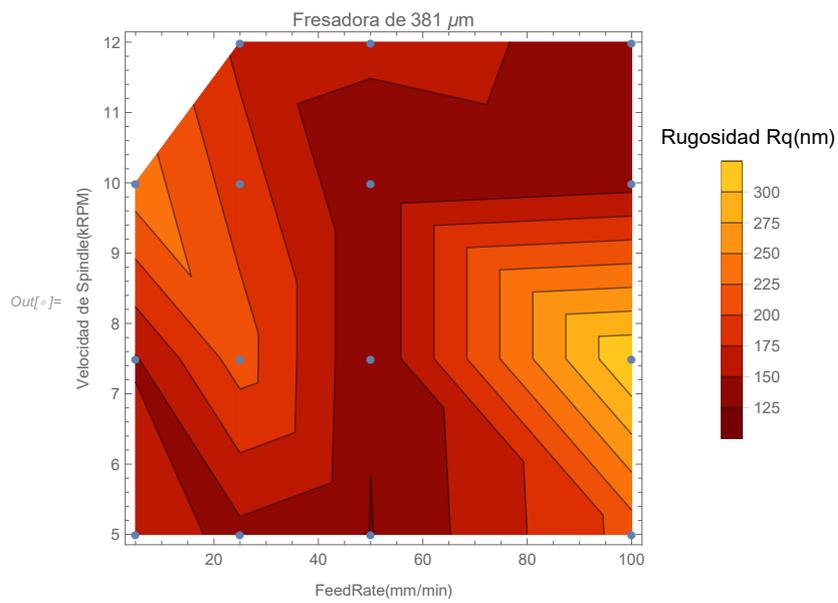


FIGURA 3.18: Rugosidad R_q con la fresadora de $381\mu\text{m}$

Fresadora 3,17mm :

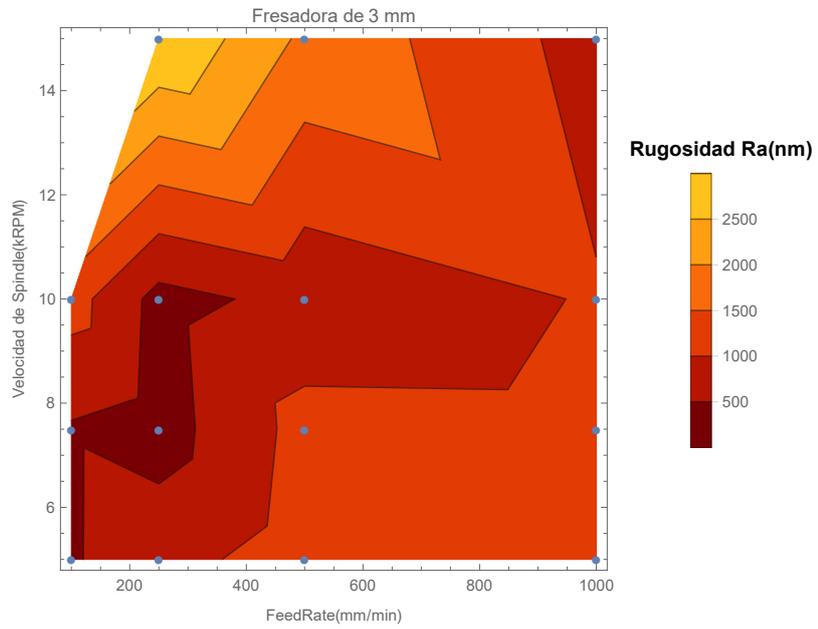


FIGURA 3.19: Rugosidad R_a con la fresadora de 3,17mm

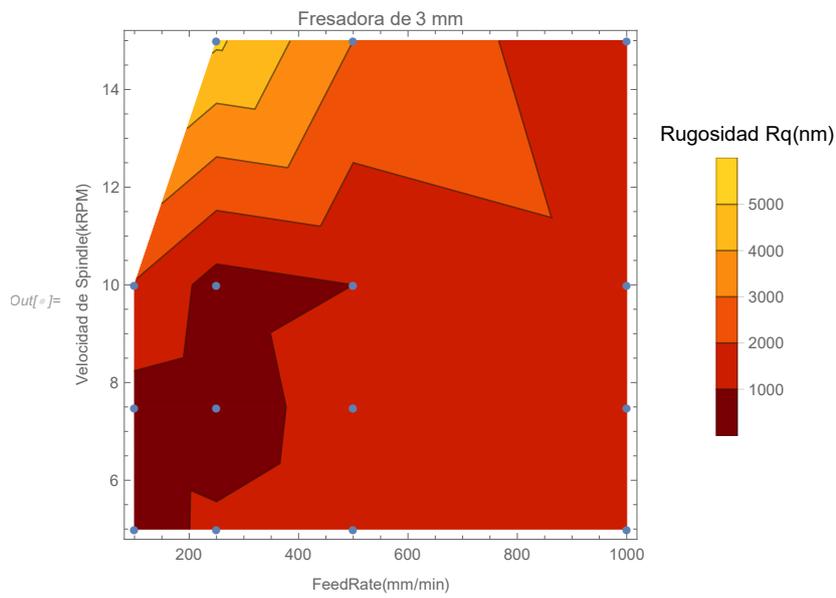


FIGURA 3.20: Rugosidad R_q con la fresadora de 3,17mm

3.2.1.4. Discusión

La información más importante que se obtiene de las gráficas de rugosidad son los parámetros óptimos para el maquinado de futuras piezas. Estos puntos, de rugosidad mínima, están indicados como el lugar en el que la coloración es más oscura. Entre las dos rugosidades Ra y Rq que se analizaron se elige tomar como referencia el valor Rq pues además de que es siempre más grande por la forma en que se calcula, el tomar en cuenta el valor al cuadrado del relieve amplifica los detalles finos del perfil. Para futuros experimentos los parámetros óptimos de corte y su rugosidad se presentan en la tabla 3.2:

TABLA 3.2: Parámetros óptimos de corte para minimizar la rugosidad en una rutina de maquinado.

Fresadora	FeedRate(mm/min)	Vel. Giro (kRPM)	Rugosidad Rq (nm)
3,17mm	500	10	< 1000
381 μ m	50	5	< 125
254 μ m	50	12	< 150
127 μ m	50	7.5	< 80

De esta tabla se destaca que el feed rate óptimo para las fresadoras micrométricas es distinto al empleado en procesos anteriores, cambiando de 25mm/s a 50mm/s para las fresadoras de 381 y 254 μ m, y de 5mm/s a 50mm/s en la de 127 μ m. Esto significa una reducción del tiempo de maquinado a la mitad y a una décima parte respectivamente. Cabe destacar que, según se observa en la tabla 3.2 el parámetro de corte que tiene un mayor efecto en la rugosidad del maquinado es el diámetro de la fresadora.

Los valores de rugosidad medidos muestran concordancia con los reportados por Guckenberger en 2015. En este experimento se exploró la zona del plano correspondiente a bajas velocidades de spindle y bajos feedrates, y se verificó según lo mostrado en su trabajo que la rugosidad obtenida es menor a 400 nm incluso cuando dicho grupo menciona que la caracterización de la rugosidad que se obtiene varía de máquina a máquina, debido a vibraciones y resonancias específicas de cada equipo. Al mismo tiempo, en concordancia con sus resultados, en este experimento se mostró que la rugosidad no es inversamente proporcional a la velocidad del Spindle (tradicionalmente se espera que la rugosidad disminuya al aumentar este parámetro). En este experimento la rugosidad no decrece monótonamente con el feedrate y tampoco mostró un patrón definido cómo se puede ver en las siguientes gráficas. Si bien con la broca de 254 μ m se verificó un aumento de la rugosidad con el feedrate y decremento con la vel. del spindle, esto cambia en la fresadora de 3.17mm y 127 μ m donde la rugosidad decrece conforme aumenta el feedrate.

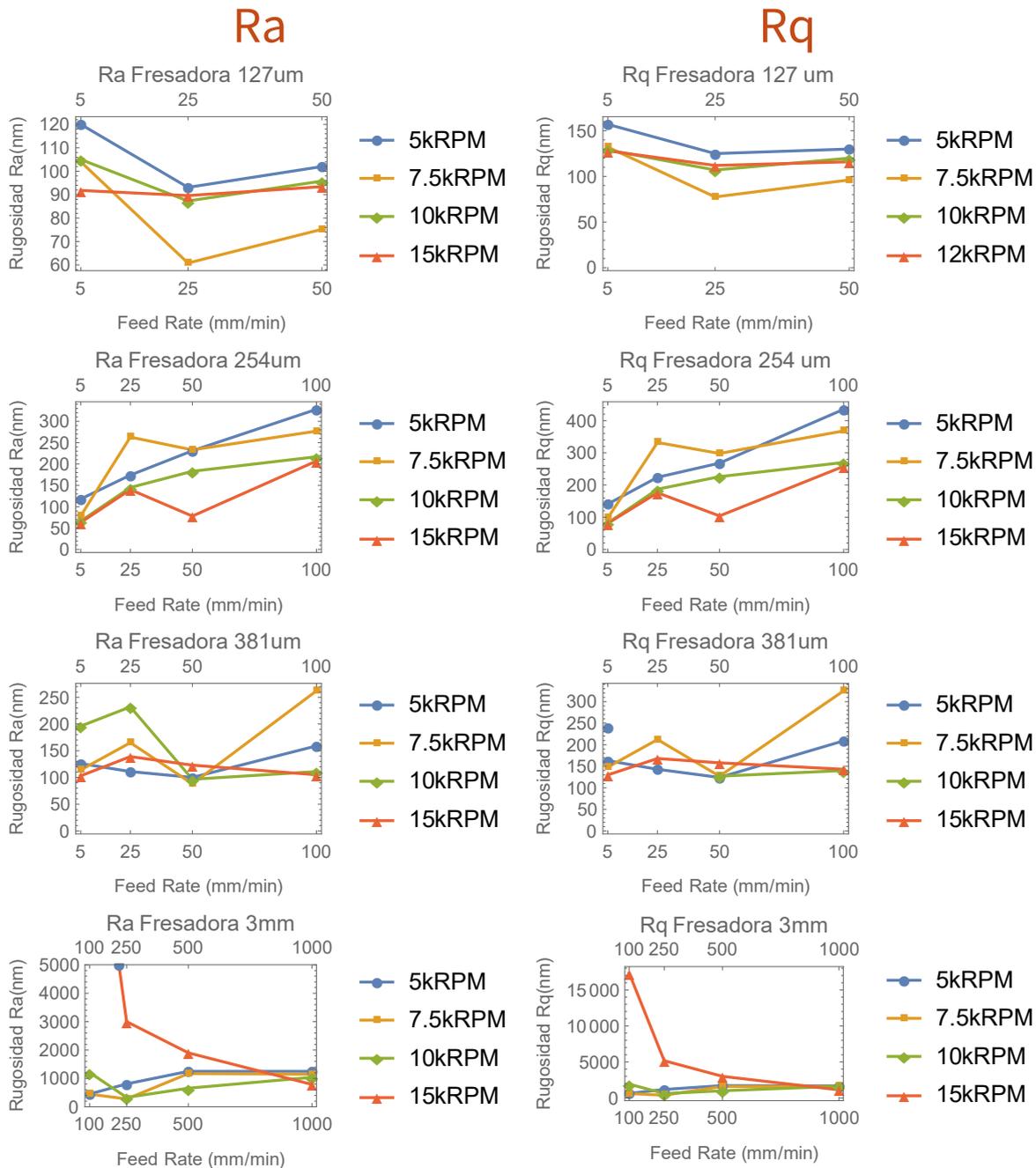


FIGURA 3.21: Rugosidad R_a y R_q Como función del feedrate.

A pesar de que no se tiene certeza de la razón del comportamiento observado en las gráficas anteriores, los valores de rugosidad encontrados en este experimento son consistentes, pues se observa que la rugosidad R_q sigue el mismo comportamiento que la rugosidad R_a .

Como conclusión de esta sección, se resalta que gracias a este experimento se encontraron los parámetros de corte que minimizan la rugosidad en las superficies maquinadas de PMMA, logrando con la fresadora más pequeña un valor tan bajo como 80 nm que se encuentra en el mismo orden de magnitud de los 40 nm que se alcanzan por fotolitografía de bajo costo en SU8 [42].

3.2.2. Caracterización de la resolución

La compañía *Minitech*, fabricante del equipo *MiniMill4* asegura en su hoja de especificaciones que su equipo tiene una resolución reproducible de hasta $5\mu m$. Para verificar esta afirmación o, en caso de demostrarse errónea, encontrar la real, se diseñó una pieza en Fusión 360 para probar la resolución del equipo. Para probar la resolución en el plano XY, la pieza de prueba consiste en una serie de pilares cuadrangulares cuyo ancho varía de $500\mu m$ a $100\mu m$ en pasos de $100\mu m$ y de $100\mu m$ a $10\mu m$ en pasos de $10\mu m$. Para evaluar la resolución en el eje Z del equipo, se maquinó dicho patrón de pilares variando su altura en los siguientes valores de $100\mu m$, a $10\mu m$, en pasos de $10\mu m$. La figura siguiente, muestra el modelo de la pieza maquinada.

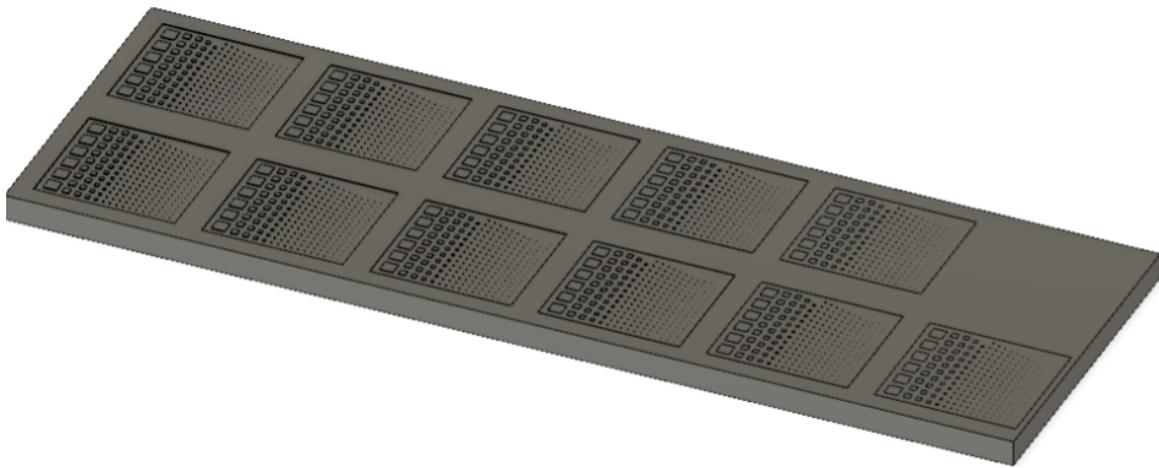
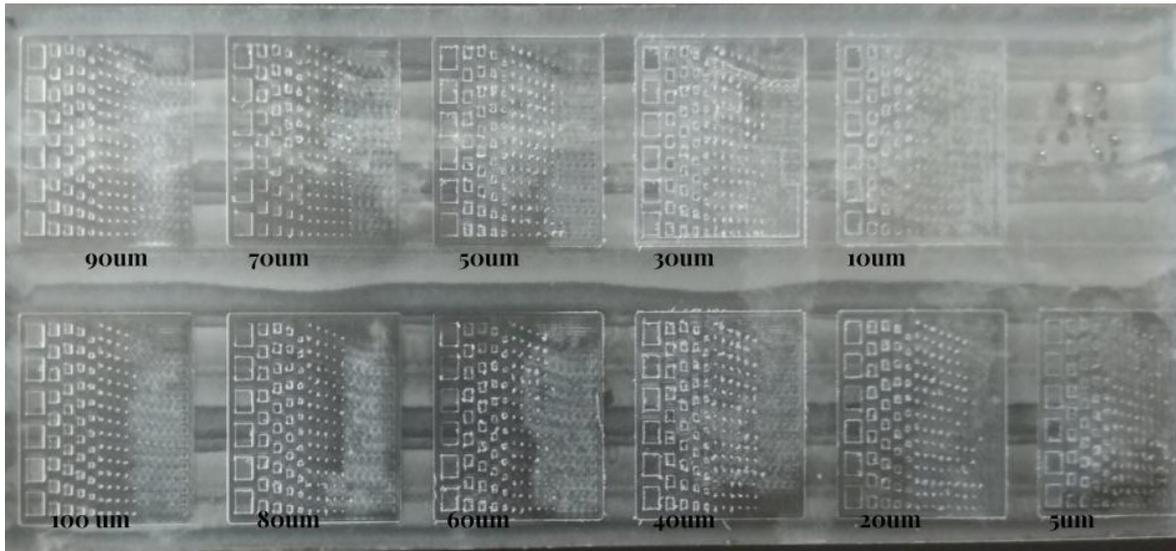


FIGURA 3.22: Modelo CAD para evaluar la resolución.

3.2.2.1. Resultados

La figura presenta la pieza maquinada descrita en la figura 3.22, los parámetros de corte fueron *Feedrate*: $25mm/min$ y *Sipndle*: $25kRPM$ con la fresadora de $381\mu m$. Para analizar las dimensiones maquinadas en XY y compararlas con la dimensión programada en el diseño, se empleó microscopía óptica y se tomaron fotografías de cada uno de los arreglos de pilares. Empleando el software *Imagen* y la relación previamente conocida para microscopio de *Tamaño de estructura /No. de Pixeles* se midieron las longitudes de las aristas de los pilares, tales valores se promediaron y su resultado se presenta en las gráficas 3.24 donde se compara dicho promedio con su valor esperado.



(a) Muestra maquinada

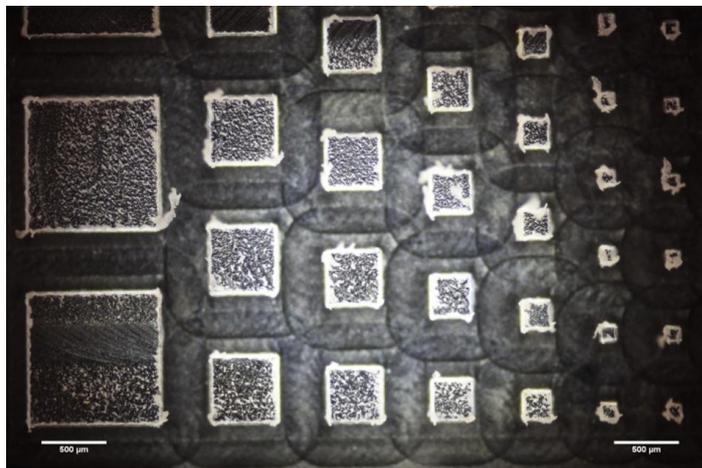
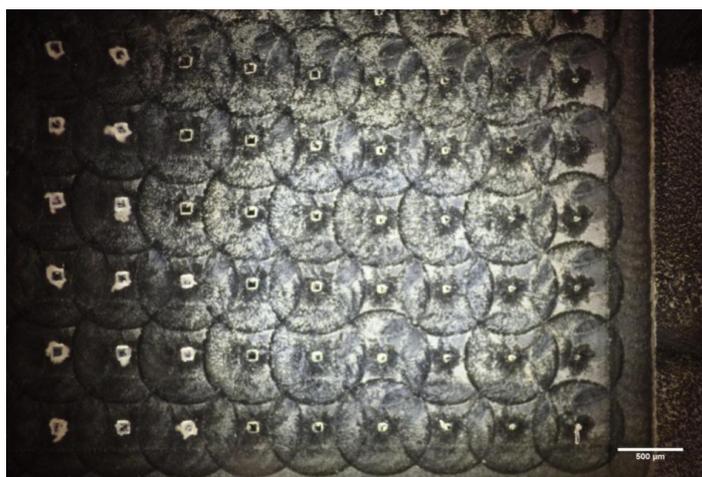
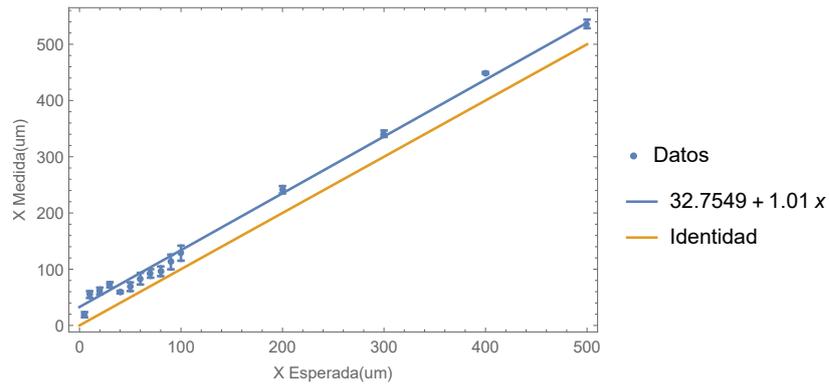
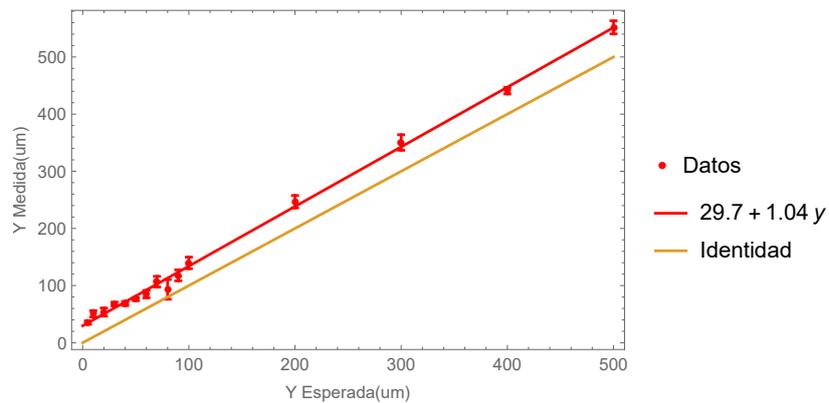
(b) Pilares de $1000\mu\text{m}$, $500\mu\text{m}$, $400\mu\text{m}$, $300\mu\text{m}$, $200\mu\text{m}$, $100\mu\text{m}$ y $90\mu\text{m}$ (c) Pilares de $90\mu\text{m}$, $80\mu\text{m}$, $70\mu\text{m}$, $60\mu\text{m}$, $50\mu\text{m}$, $40\mu\text{m}$ y $30\mu\text{m}$, $20\mu\text{m}$, $10\mu\text{m}$

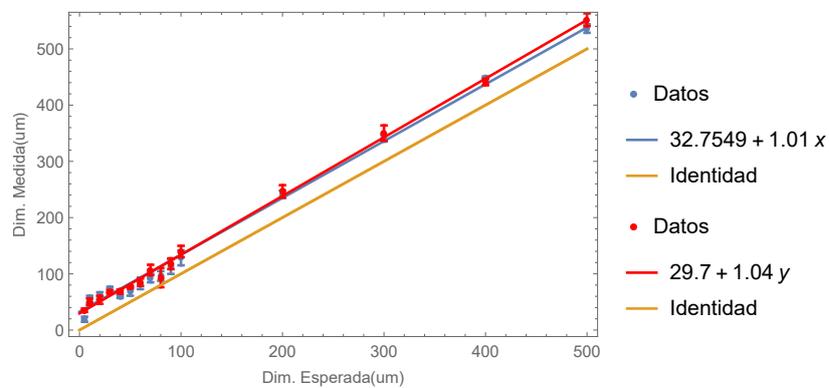
FIGURA 3.23: Pieza maquinada para evaluar la resolución.



(a) Dimensión medida en X de los pilares contra la esperada



(b) Dimensión medida en Y de los pilares contra la esperada



(c) Ajuste lineal de ambas series de datos comparado con la identidad

FIGURA 3.24: Pieza maquinada para evaluar la resolución.

La medición de la altura de los pilares se realizó empleando tomografía de coherencia óptica (Thorlabs Ganymede II). A cada una de las series de pilares se les tomó un perfil 2D y su altura se midió con el software nativo del equipo. En la figura 3.25 se presenta una muestra de los perfiles obtenidos y en la 3.26 la medición de las alturas de los pilares comparadas con su dimensión esperada.

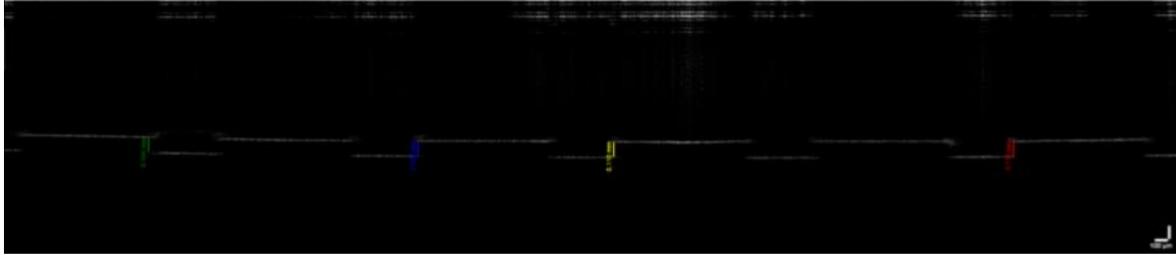


FIGURA 3.25: Perfil de altura de los pilares por OCT

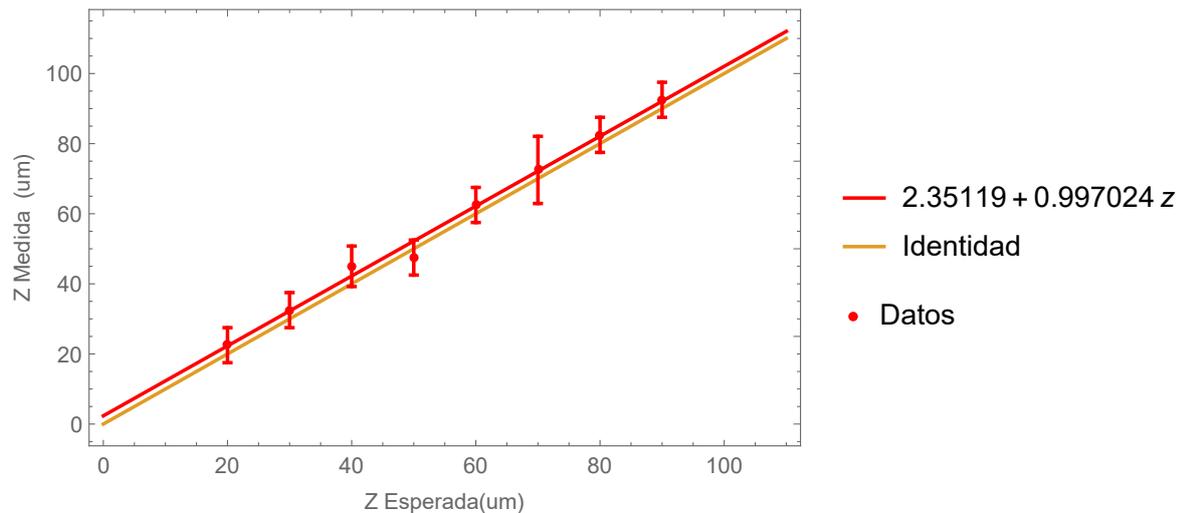


FIGURA 3.26: Medición de la altura de los pilares por OCT comparada con su altura esperada.

3.2.2.2. Discusión

La tabla 3.3 muestra los parámetros de los ajustes lineales realizados (*Mathematica 11*) a las series de datos mostrados en las gráficas 3.24 y 3.26.

TABLA 3.3: Parámetros de los ajustes lineales para cada eje.

Eje	m ($\mu m/\mu m$)	Δm ($\mu m/\mu m$)	b (μm)	Δb (μm)
$X(mx + b)$	1.01	0.01	33	6
$Y(my + b)$	1.04	0.01	29	3
$Z(mz + b)$	0.99	0.03	2.35	2.07

De este análisis destaca que el valor de b en los ajustes es distinto de cero. Esto significa que todas las estructuras que se realizan con el equipo tienen un error en sus dimensiones pues se obtienen $31 \pm 5\mu m$ más grandes de cómo se diseñan en el plano XY. Esto limita el tamaño mínimo de estructuras en positivo que se pueden producir, pues según las mediciones de las fotografías dicho tamaño es alrededor de $30\mu m$.

Aún cuando en el eje Z b es distinto de cero, su valor queda por debajo del tamaño de paso mínimo especificado por el fabricante y queda cubierto por el intervalo de incertidumbre Δb , esto significa que en este eje se logran las dimensiones que se programan en la etapa de CAD. La discrepancia entre el eje z y los dos anteriores puede deberse a la forma en que se sujeta el sustrato a la mesa de trabajo: si la cinta adhesiva que se emplea no es lo suficientemente fuerte como para resistir la fuerza que ejerce la fresadora sobre el PMMA, este

se desplazará siguiendo el movimiento de la fresadora, alterando así las dimensiones de las estructuras; este efecto es nulo en el eje Z pues aún cuando la fresadora presiona el PMMA, la normal de la mesa de trabajo mantiene la pieza en su lugar. Para descartar esta probable causa, futuros experimentos requerirán emplear otra clase de cinta doble cara o incluso otros métodos de sujeción.

La formación de rebabas (ver. figura 3.23) alrededor de las estructuras se debe a la estrategia (trayectoria) de corte empleada. Para cada uno de los pilares la fresadora entraba y salía del material, este movimiento es el responsable de la formación de bordes irregulares. Una mejor estrategia es perforar en el material y devastar las estructuras manteniendo la fresadora dentro del sustrato minimizando las retracciones.

Las mediciones deben tomarse con cautela pues las micrografías no permiten apreciar adecuadamente las estructuras más pequeñas y alrededor de todos los pilares se observa la presencia de rebabas que impiden observar los bordes reales de los pilares.

Un efecto similar ocurre al analizar los perfiles de altura obtenidos por OCT: la serie de puntos que corresponden a la línea base del sustrato y a la superficie del pilar presentan un ancho de alrededor de $15\mu\text{m}$ lo que dificulta encontrar con precisión las superficies y por tanto resta fiabilidad a las mediciones, aún cuando el ajuste lineal encontrado para este eje es más cercano a la identidad. En aras de resolver tal dificultad, se sugiere como trabajo futuro medir de nuevo las estructuras empleando perfilometría de contacto y descartar que tales discrepancias provengan del tamaño de la fresadora repitiendo el experimento para cada una de ellas. De verificarse que el tamaño real de las estructuras maquinadas presenta un corrimiento respecto a las diseñadas, bastará con reescalar los diseños para tomar en cuenta tal efecto de maquinado.

Una vez que se tiene un micro molde maquinado y caracterizado gracias a los resultados de la sección anteriores, el siguiente paso es replicarlo para obtener estructuras abiertas que después de pegarse a un sustrato conformarán los microcanales.

3.3. Litografía suave y chips microfluídicos de PDMS

En el capítulo 2 se presentó el PDMS como un polímero transparente y biocompatible ubicuo en microfluídica. La fabricación de chips microfluídicos en este material se realiza a través de litografía suave, proceso que se ilustra en la figura 3.27. De forma breve, la litografía suave es un proceso molde-réplica en la que se vierte una mezcla de PDMS y agente curante sobre un micro molde; al aplicar un tratamiento térmico (1 hora a 60°C), el agente curante entrecruza las cadenas de PDMS y lo solidifica conformando su estructura a la del micromolde. Por último, esta réplica de la estructura en PDMS *sólido* se desprende y queda lista para su uso posterior. Es un hecho bien reportado en la literatura que el protocolo de preparación de PMDS afecta drásticamente las propiedades de la réplica [43]. Para estandarizar la preparación de dicho material y obtener propiedades consistentes en cada chip fabricado se desarrolló, en colaboración con otros miembros del laboratorio, un protocolo estandarizado que se emplea de forma rutinaria para todo chip (Apéndice B).

Procedimiento de preparación de PDMS.

- Medir la cantidad requerida de PDMS.
- Añadir el agente curante en una proporción 10 a 1 en peso, es decir agregar el 10% de la masa de polímero en agente curante. 3. Mezclar durante 5 minutos con Dremel (taladro de mano) a 1500 rpm (la velocidad más baja). 4. Desgasificar en un desecador durante el tiempo necesario para extraer las burbujas de aire generadas durante el mezclado (aproximadamente 10 minutos).

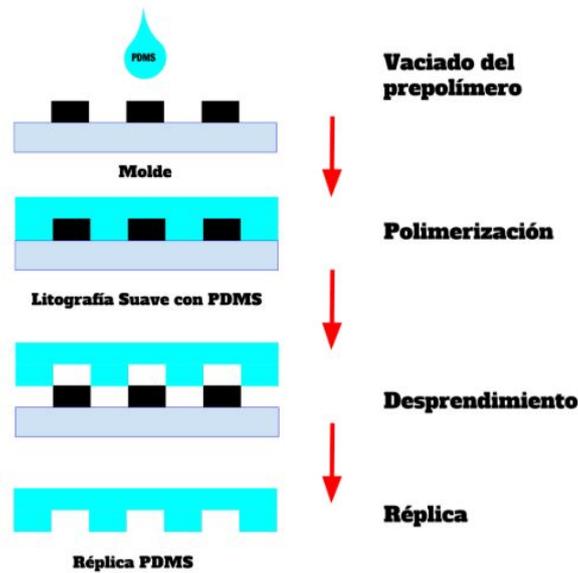


FIGURA 3.27: Litografía suave en PDMS[44].

Antes de pasar a la fabricación de chips de PDMS es necesario demostrar que es posible replicar estructuras maquinadas por CNC en PMMA. Para tal objetivo, a la estructura de pilares de la sección 3.2.2 correspondiente a una altura de $50\mu\text{m}$ y maquinada con la fresadora de $127\mu\text{m}$, se le realizó una réplica en PDMS empleando el procedimiento descrito en el apéndice B. Posteriormente dicha réplica se caracterizó por perfilometría física. La comparación entre el tamaño de los pilares en PMMA y su réplica en PDMS se muestran en la figura 3.28.

Después de haber logrado la fabricación de microestructuras en PMMA, haber entendido los parámetros que la afectan y demostrar su factibilidad como micromoldes para litografía suave, el último paso para lograr la fabricación de chips microfluídicos es el sellado de las estructuras producidas tanto en PMMA como en PDMS. En esta sección se presenta el estudio de este proceso.

Las publicaciones del grupo de Whitesides al principio de este siglo presentan, junto con la litografía suave, un protocolo basado en el uso de plasma de oxígeno para activar la superficie de PDMS y sellar los microcanales abiertos. Como se mencionó en el capítulo 3, el uso de una bobina Tesla de mano permite el mismo fenómeno. Tal protocolo, que se presenta a continuación, fue trabajo previo en el laboratorio[44]. La aportación de esta tesis, y objetivo en esta etapa, fue validar su compatibilidad con un tipo de moldes fabricados por fresado CNC.

Protocolo de sellado de chips de PDMS:

1. Replicar un micromolde con los microcanales en positivo.
2. Cubrir la parte superior de la réplica con cinta mágica.
3. Desprender el PDMS del micromolde (no retirar la cinta mágica).
4. Perforar los inlets en los canales usando un biopuncher de $500\mu\text{m}$ sobre el tapete de corte. Perforar siempre desde la cara con los microcanales.
5. Tomar con las pinzas un portaobjetos sobre el cual se pegará la réplica.
6. Colocar el portaobjetos y la réplica (con la cara de los canales hacia arriba) sobre una superficie de plástico limpia y al menos 10 cm alejada de cualquier objeto de metal.

7. Aplicar un tratamiento de plasma con la bobina Tesla a 1.5 cm de distancia durante 45 segundos.
8. Levantar el PDMS por la cinta mágica y colocar la superficie tratada (la cara con los microcanales) sobre el portaobjetos. En caso de encontrar burbujas, remover aplicando una ligera presión sobre ellas, llevándolas hacia los canales o hacia los bordes del chip. Sólo hay una oportunidad, una vez que se pega el PDMS al portaobjetos no desprender de nuevo.
9. Colocar el chip en la parrilla a 90c durante una hora para mejorar la fuerza de la adhesión.
10. Retirar el chip de la parrilla y dejar a temperatura ambiente durante dos horas.

3.3.0.1. Resultados

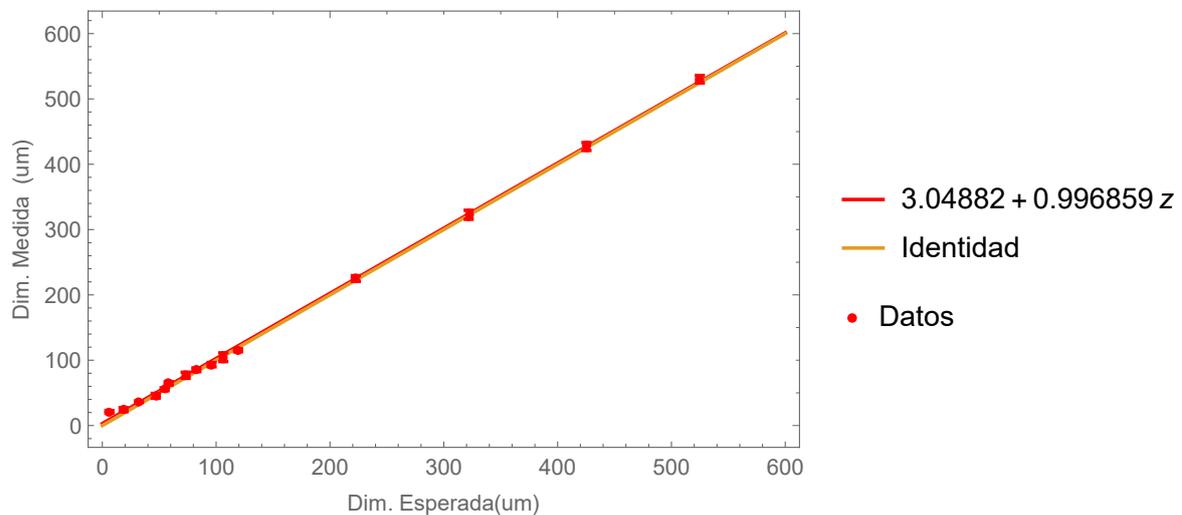


FIGURA 3.28: Dimensión medida en la réplica en PDMS contra la dimensión del micromolde.

En la figura 3.29 se presenta el molde maquinado para la verificación del protocolo de pegado de PDMS, su réplica y el resultado de sellarla sobre un portaobjetos de vidrio.

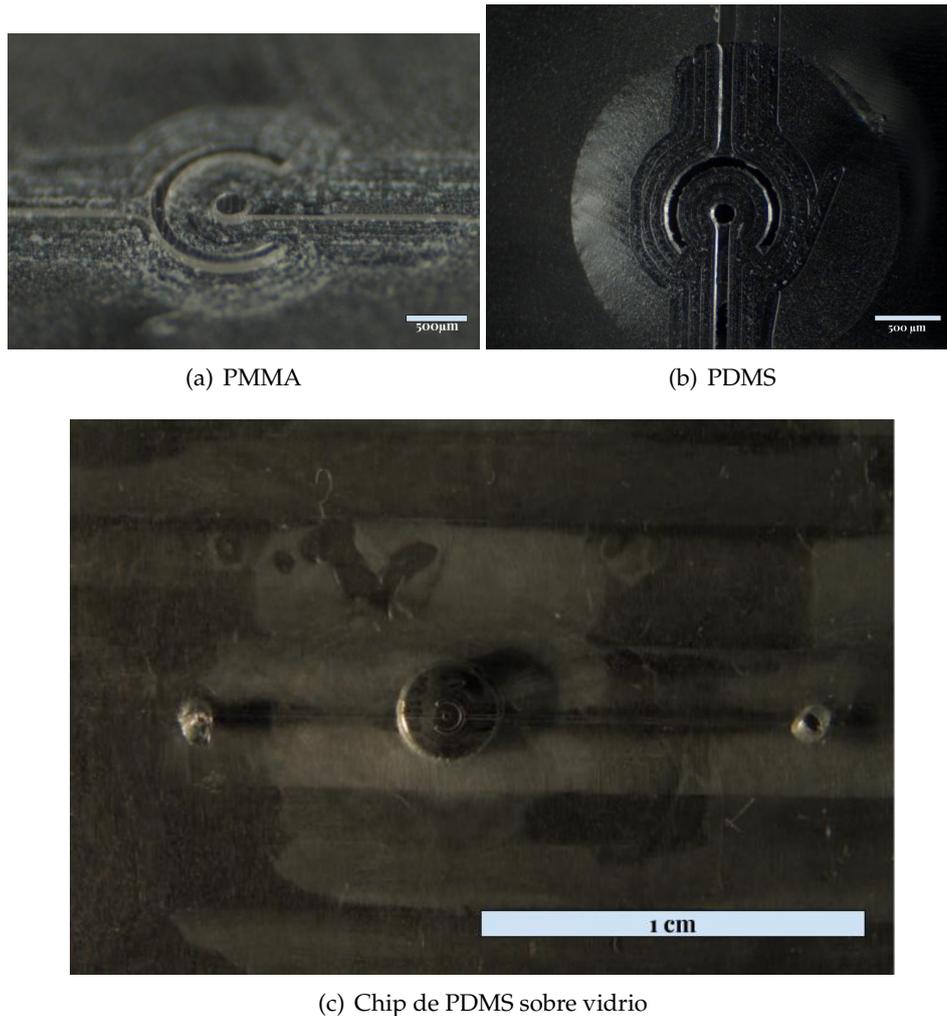


FIGURA 3.29: Molde en PMMA, su réplica en PDMS y chip sellado en vidrio.

Como se puede observar en la figura 3.29 el resultado de sellar una réplica de PDMS de un molde de PMMA maquinado por CNC no fue satisfactorio. En toda la superficie se observan áreas donde la adhesión del PDMS con el sustrato de vidrio es deficiente. Tal baja calidad de sellado es consecuencia de la rugosidad en el micromolde.

Una parte clave para el éxito del procedimiento anterior es el contacto entre las superficies a pegar. Debido a que el fresado CNC, a diferencia de las técnicas para las que tal procedimiento se encontraba probado, es un proceso en el que la rugosidad puede llegar a ser considerable (ver sección 3.2.1), el contacto entre la réplica de una superficie maquinada y el portaobjetos de vidrio no es óptimo, así, fue necesario adaptar tal procedimiento para esta nueva técnica.

En su trabajo de microfresado en plásticos para estudios de cultivo celular, Guckenberger et. al. [28] publicó un protocolo para pulir superficies de PS empleando un tratamiento de vapor de acetona a 40C durante 90s. Este mismo procedimiento se aplicó al molde de la figura 3.29 usando el arreglo de la figura 3.30. El efecto del tratamiento con vapor de solvente sobre el molde de PMMA se presenta en la figura 3.31. La réplica del molde pulido y la calidad de sello en vidrio que con él se alcanza se muestra en la figura 3.32.



FIGURA 3.30: Arreglo para aplicar un tratamiento con vapor de acetona a 40°C para pulir el PMMA (El PMMA puede sostenerse empleando un trozo de cinta doble cara o un par de imanes, uno sobre el PMMA y otro sobre la caja petri).

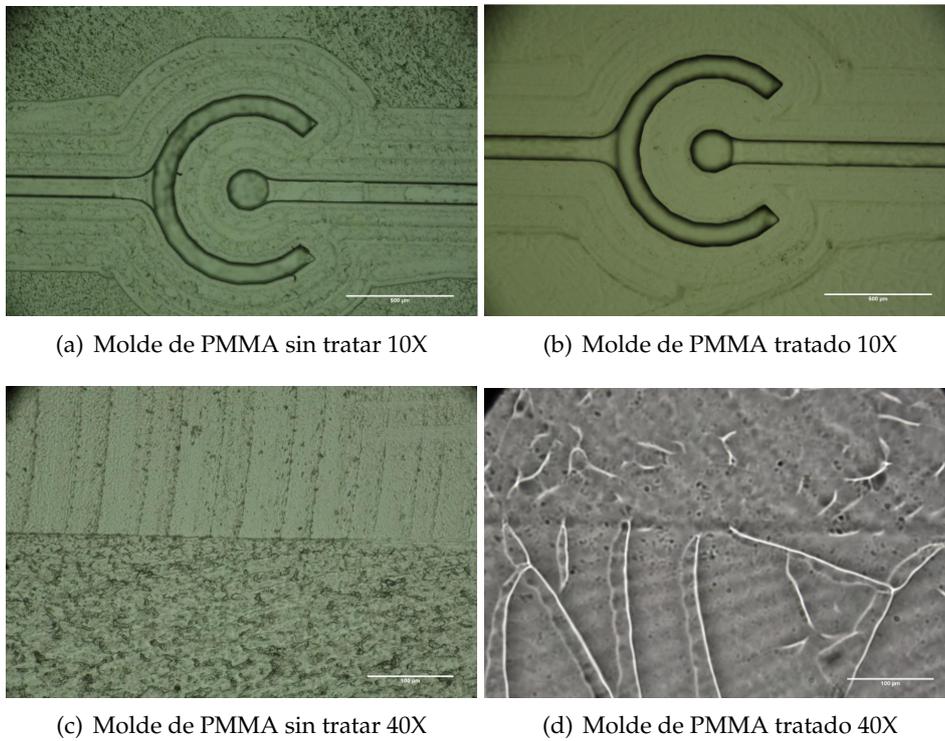


FIGURA 3.31: Efecto del vapor de acetona en PMMA.

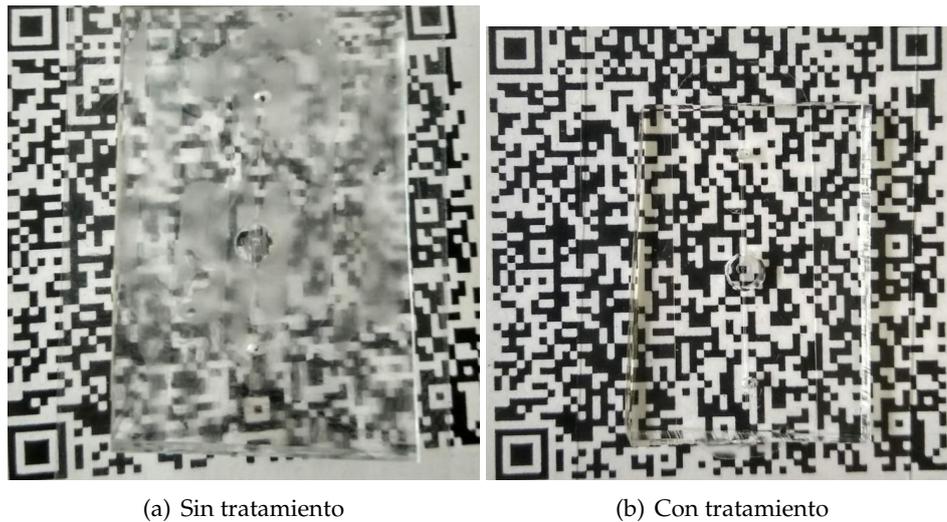


FIGURA 3.32: Comparación de la calidad de sellos que se obtiene gracias al tratamiento con vapor de acetona

3.3.0.2. Discusión

En la figura 3.29 se puede observar cómo la rugosidad del molde se replica en la membrana (que no se observa completamente transparente) y que esta es responsable de las zonas en las que no hay adhesión puesto que esa rugosidad impide un buen contacto entre las superficies. Dicho problema puede solucionarse aplicando presión en el dispositivo después de ser ensamblado pero con esto se corre el riesgo de que los canales se deformen y colapsen; así, la forma correcta de proceder es suavizar el molde previo al proceso de réplica. Esto puede hacerse, por una parte, modificando los parámetros de la rutina de corte (ver sección 3.2.1) o bien con un post procesamiento de la pieza en el que se aplica vapor de solvente para atacar (“pulir”) la superficie y mejorar su calidad. Ya que el sustrato es de acrílico, dicha calidad se puede apreciar con la transparencia de la superficie, la opacidad en el molde se debe al esparcimiento de la luz que el microrelieve produce, de tal suerte que una superficie suave (de rugosidad mínima) se aprecia transparente.

Según algunos autores, la principal limitante del micro fresado CNC en aplicaciones microfluídicas es la alta rugosidad que se obtiene con el proceso. Esta dificultad se verificó en este trabajo: en el molde maquinado, se aprecia cómo la rugosidad es responsable de la baja calidad en la superficie del molde, la réplica, y el chip. No obstante, como lo demuestra la figura 3.32, el post tratamiento con acetona permite salvar tales dificultades

En la figura 3.31 se muestra el cambio en la rugosidad de la superficie maquinada después del tratamiento con vapor de acetona. Dicho cambio en la rugosidad es tal que una muestra opaca se vuelve transparente (ver fig. 3.32). Este fenómeno ocurre gracias a que la acetona disuelve la superficie del PMMA devolviendo movilidad a sus cadenas moleculares, lo que permite su reacomodo a una superficie de menor área. Llama de inmediato la atención la formación de grietas en la superficie después de la exposición a la acetona (fig. 3.31), este fenómeno se ha observado en distintos trabajos y se discute en la sección de chips de PMMA. Ya que no se tiene una cuantificación de la rugosidad antes y después del tratamiento de acetona, la caracterización cuidadosa de este fenómeno se deja como trabajo a futuro en el que se deberá, además, estudiar si el tratamiento con acetona afecta las dimensiones de los microcanales.

Según lo expuesto arriba, a manera de conclusión de esta sección, se resalta que gracias al control de la rugosidad en una rutina de maquinado, ya sea procurando el uso de los

parámetros óptimos de corte (*feedrate* y *vel. giro*) o a través de un tratamiento con vapor de acetona, es posible la producción de chips de PDMS por microfresado CNC.

3.4. Chips microfluídicos de PMMA

La necesidad de producción escalable de chips microfluídicos ha obligado a explorar técnicas de fabricación y materiales distintos a la litografía suave y el PDMS. En particular, los termoplásticos son sustratos sumamente atractivos por su bajo costo y naturaleza desechable. Uno de los plásticos más prometedores por su transparencia óptica al visible y al UVA y resistencia a solventes, ácidos y bases es el PMMA. A pesar de que la estructuración de este material se tiene bien estudiada y entendida (sec. 3.2.2), el sellado de estos sustratos estructurados para producir canales microfluídicos está aún en desarrollo. De esta forma, la estandarización y optimización del pegado de dos sustratos representa una etapa fundamental para la producción escalable de chips microfluídicos desechables, de fácil fabricación y bajo costo.

El método más simple para pegar dos sustratos de PMMA es el uso de un adhesivo líquido (epóxicos, acrílicos, etc.). A pesar de que se ha discutido numerosas veces, en la literatura[34] hay pocos ejemplos donde se haya usado exitosamente. Este bajo índice de éxito se debe a que no se ha encontrado una técnica o un adhesivo que asegure que al ponerlo entre las dos superficies a pegar, éste no llene los microcanales y termine por obstruirlos y dejarlos inservibles.

Un método amplia y exitosamente reportado es el del pegado asistido por solventes. En éste método, un reactivo disuelve las superficies a pegar y al ponerlas en contacto, la capa *derretida* actúa como adhesivo uniendo los sustratos una vez que el solvente se evapora. La mayor desventaja de estos métodos es que al disolverse la superficie del sustrato, las estructuras maquinadas en él pueden deformarse o colapsar por lo que se recomienda tener el mejor control posible en la *dosis de solvente* que se aplica a la superficie así como de su tiempo de exposición.

En aras de encontrar un protocolo óptimo para la adhesión de dos superficies de PMMA se probaron los dos métodos de pegado descritos a continuación.

Método 1, tratamiento por vapor de cloroformo : Este método se basa en la publicación del 2010 Ogilvie et al. [45] y es sumamente atractivo para los propósitos de éste experimento pues además de servir para pegar dos sustratos de PMMA, produce superficies de calidad óptica en microcanales maquinados por micro fresado CNC al reducir la rugosidad de 200 nm a 15 nm. El protocolo a seguir se enlista a continuación y se esquematiza en la figura 3.33.

1. Se construye un ambiente de vapor de cloroformo a 25°C utilizando dos cajas petri, una de 25 cm de diámetro y otra de 10, sobre una parrilla eléctrica a 25°C. En la primer caja se vierte agua como reservorio térmico para mantener la temperatura constante a 25°C; en ella se coloca la segunda caja (10 cm) en la cual se vierte el cloroformo. La segunda caja se cierra con las placas de PMMA dentro exponiendo las caras de los sustratos a pegar al líquido dejando una separación de 1 cm entre el cloroformo y el PMMA. La exposición al vapor de cloroformo dura 5 minutos.
2. Se retiran los sustratos de PMMA de la campana de vapor de cloroformo y se pegan las cara que fueron expuestas.
3. Se presiona la unión a mano durante 1 minuto.
4. Se aplica presión al ensamble con una prensa de tornillo entre dos placas de metal y se mete al horno a 60°C durante 30 minutos.

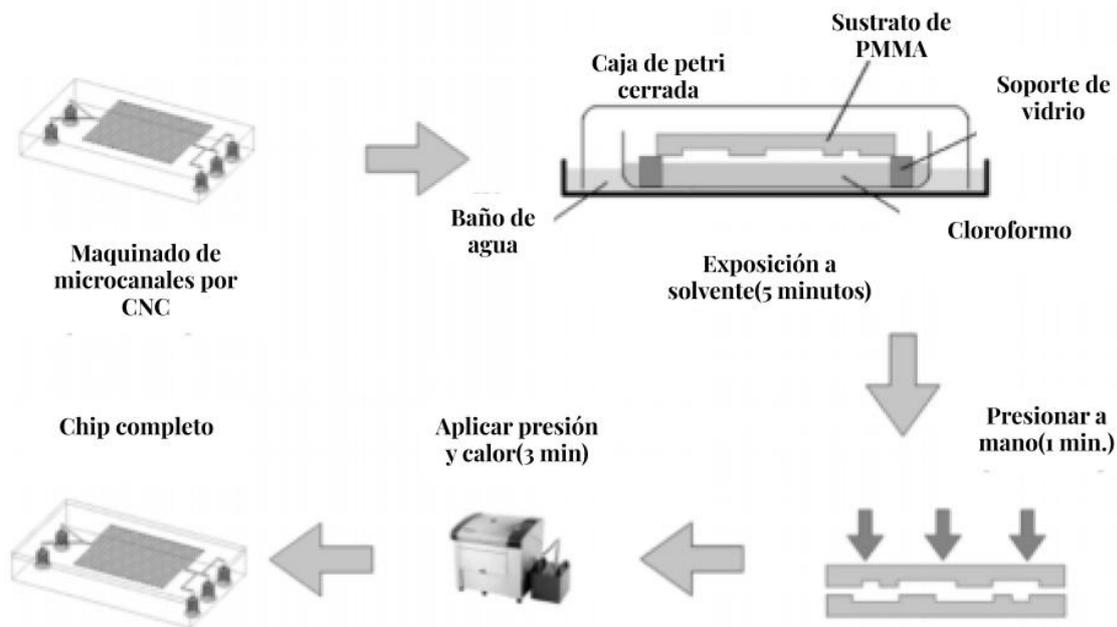


FIGURA 3.33: Esquema del método 1.

Método 2, tratamiento con cloroformo aplicado por un sello de PDMS: Este procedimiento se basa en la publicación de 2012 de Malaquin et. al. [46] El atractivo de este protocolo consiste en el uso de un cojín de PDMS saturado por inmersión en cloroformo. La placa de PMMA se pone después en contacto con el cojín. Cuando el sustrato de PMMA se encuentra en contacto con el PDMS, el cloroformo se difunde hacia el PMMA a través de la red polimérica de PDMS. Esta forma de abordar el problema provee de un mejor control de la exposición al solvente respecto a otros métodos en los que el sustrato está completamente inmerso en el vapor o en el líquido. La naturaleza elástica del PDMS asegura un contacto uniforme y por tanto un tratamiento homogéneo de la superficie; mientras la cara estructurada del PMMA es atacada por el solvente, la parte interna de los microcanales permanece íntegra por lo que se reduce el problema de la deformación causada por la presión sobre los canales 3.34. El protocolo adaptado es el siguiente:

1. Preparar el cojín de PDMS según el procedimiento oficial del laboratorio (Apéndice B).
2. Sumergir el PDMS en cloroformo durante 1hr.
3. Sacar del cloroformo y secar con aire comprimido.
4. Colocar las placas de PMMA sobre el PDMS durante 4 min(fig. 3.34).
5. Remover y pegar las caras tratadas.
6. Aplicar presión y colocar 10 minutos en el horno a 80°C.
7. Sacar y dejar enfriar a T ambiente .

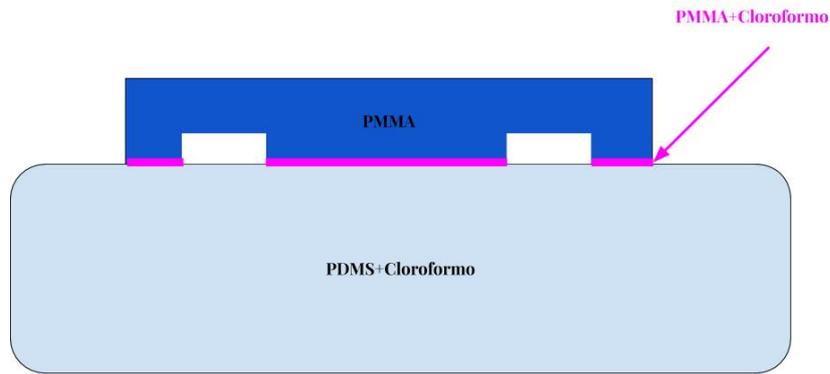


FIGURA 3.34: Esquema del método 2.

Una parte que se cuida mucho en estos experimento es la limpieza de los sustratos a pegar, para esto, se siguió el siguiente proceso reportado en la referencia número [45]:

1. Lavar los sustratos con detergente para material de laboratorio.
2. Enjuagar con agua desionizada.
3. Sonicar durante 3 minutos en agua desionizada.
4. Enjuagar con IPA.
5. Enjuagar con agua desionizada.
6. Secar con aire comprimido.

En los dos métodos indirectos la presión sobre los sustratos se ejerce utilizando una prensa de tornillo y dos placas de metal, dicho arreglo se muestra en la figura 3.35



FIGURA 3.35: Prensa de tornillo para aplicar presión.

3.4.0.1. Resultados

En la imagen 3.36 se presenta la calidad típica que se obtiene de pegado entre dos placas de PMMA sin maquinar con los métodos 1 y 2. Como se puede apreciar, ninguno de los dos resultados es adecuado pues presentan zonas de adhesión deficiente en toda el área. Para mejorar la adhesión de ambas placas, se decidió descartar el uso de una prensa de tornillo y emplear una prensa neumática caliente (Dapbress Dp80), gracias a este cambio aplicando una presión de 4Bar se logró una adhesión homogénea.

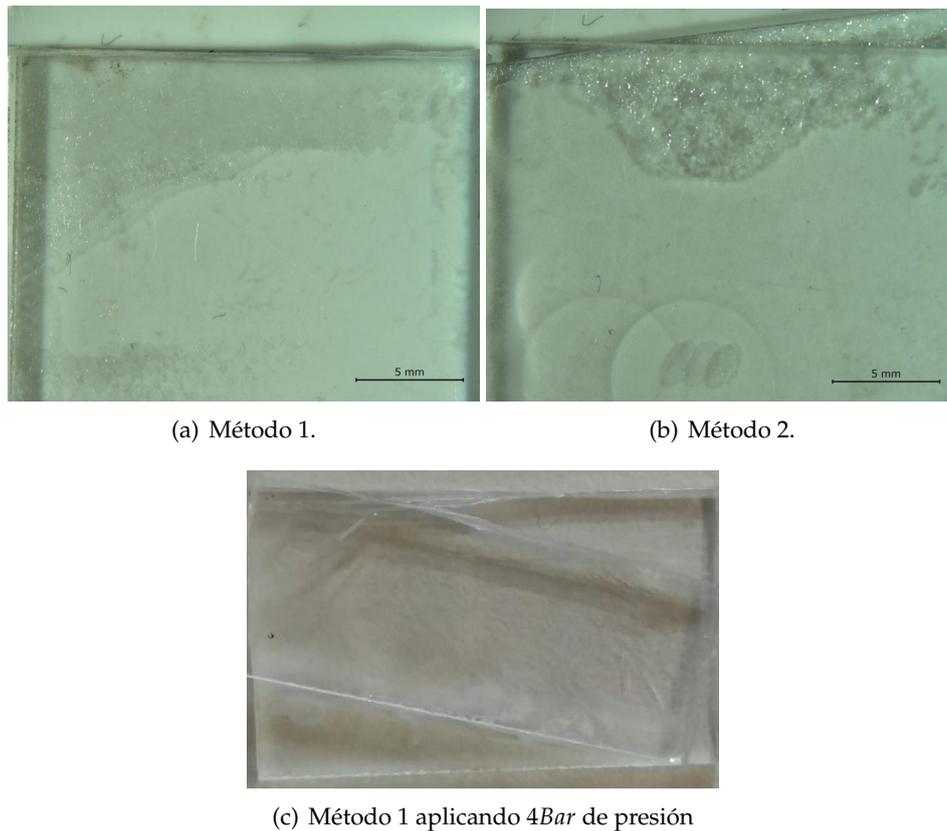


FIGURA 3.36: Calidad de adhesión lograda empleando cloroformo.

Una vez logrado el resultado de la figura 3.36 C, se intentó probar el método 1 con la prensa neumática para el sellado de canales microfluídicos. Este resultado se presenta en la figura 3.37, sin embargo se encontró un efecto inesperado: la presencia de grietas en la superficie interior del chip. Revisando la literatura se encontró que dicho efecto se observa cada vez que un solvente ataca un plástico, así, para evitar la presencia de grietas se decidió emplear un solvente menos agresivo que cloroformo para sellar microcanales.

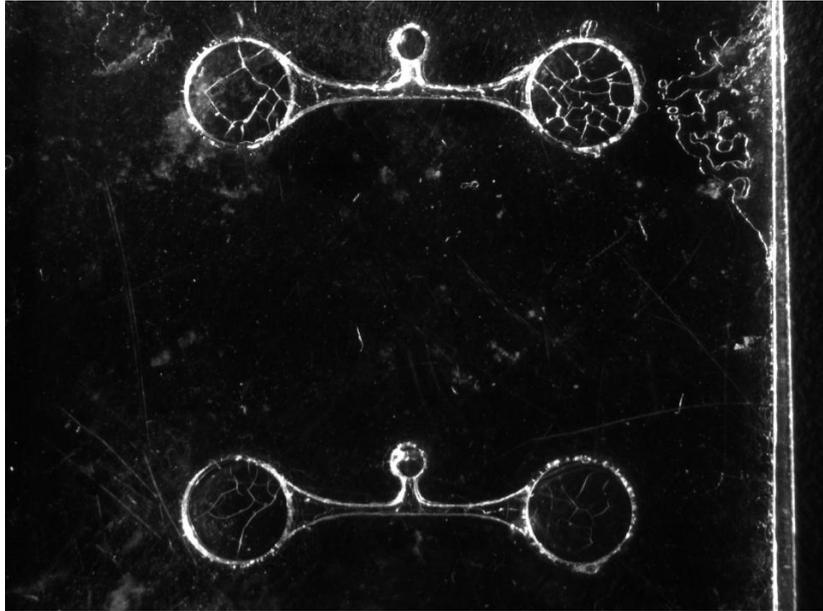


FIGURA 3.37: Chip en PMMA fabricado con el método 1 usando una prensa neumática.

Un protocolo de pegado de PMMA con etanol, un solvente menos agresivo, es el publicado por Liga et. al. en 2016 [47]. En dicho trabajo, para atacar las superficies a pegar se aplican $80\mu L$ de etanol puro en medio de los sustratos a los que se les aplica $1,57MPa$ de presión a $70C$ durante 2 min. Usando los microcanales de la figura 3.37 y este protocolo se encontró que, en efecto, el etanol es un solvente capaz de pegar dos placas de PMMA al aplicar presión y temperatura. No obstante, el sellado de ambas placas fue de muy baja calidad pues la mayor parte del área no está adherida (fig. 3.38). Una revisión mas profunda de la literatura[35, 48] mostró que $80\mu L$ de etanol es un volumen muy bajo para sellar por completo un chip de $25mm \times 75mm$, por lo que se aumentó el volumen a $300\mu L$ [48] esto mejoró la calidad del sellado logrando pegar casi toda el área a excepción del centro (fig. 3.39). Ya que esta zona se repetía siempre entre distintos chips, se examinó cuidadosamente la prensa y se notó que la superficie en ella no era homogénea y que la presión no se distribuía por igual sobre toda el área, para solucionar tal problema se añadió una placa de unicell al arreglo como se muestra en la figura 3.40 .

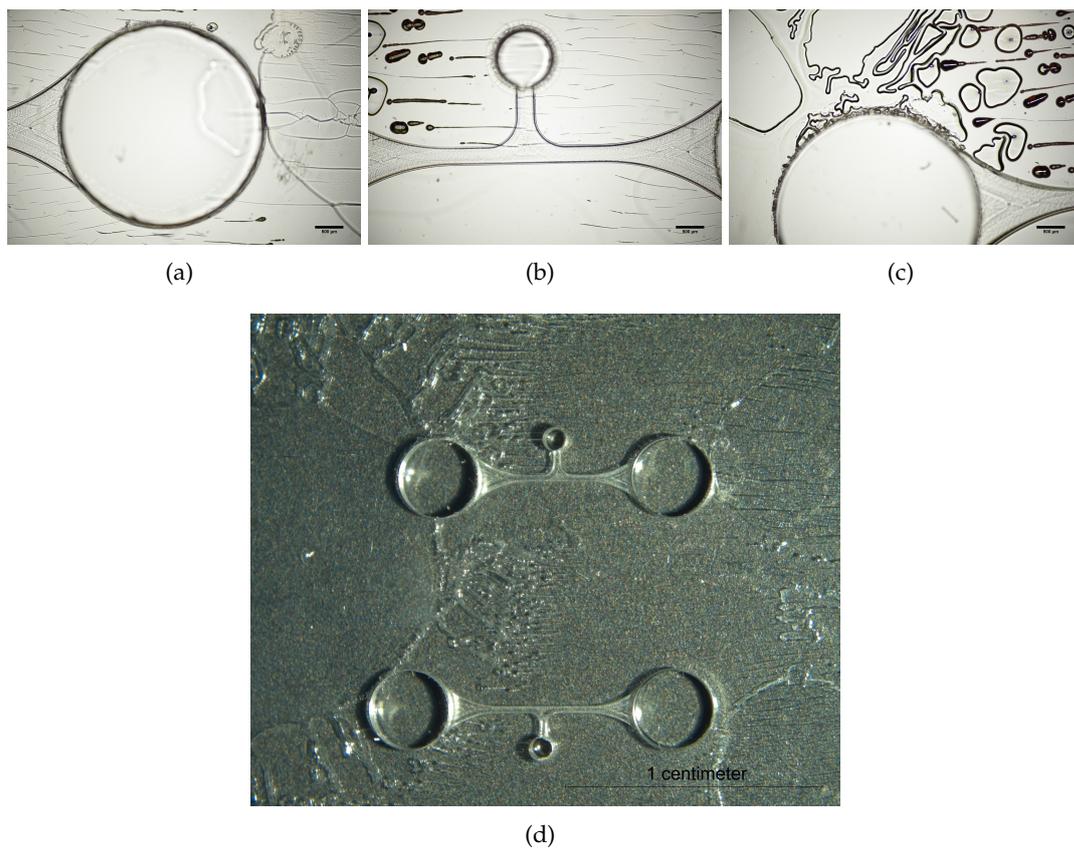


FIGURA 3.38: V:80 μ L etanol 100%, P: 4bar, T: 70C t: 2min

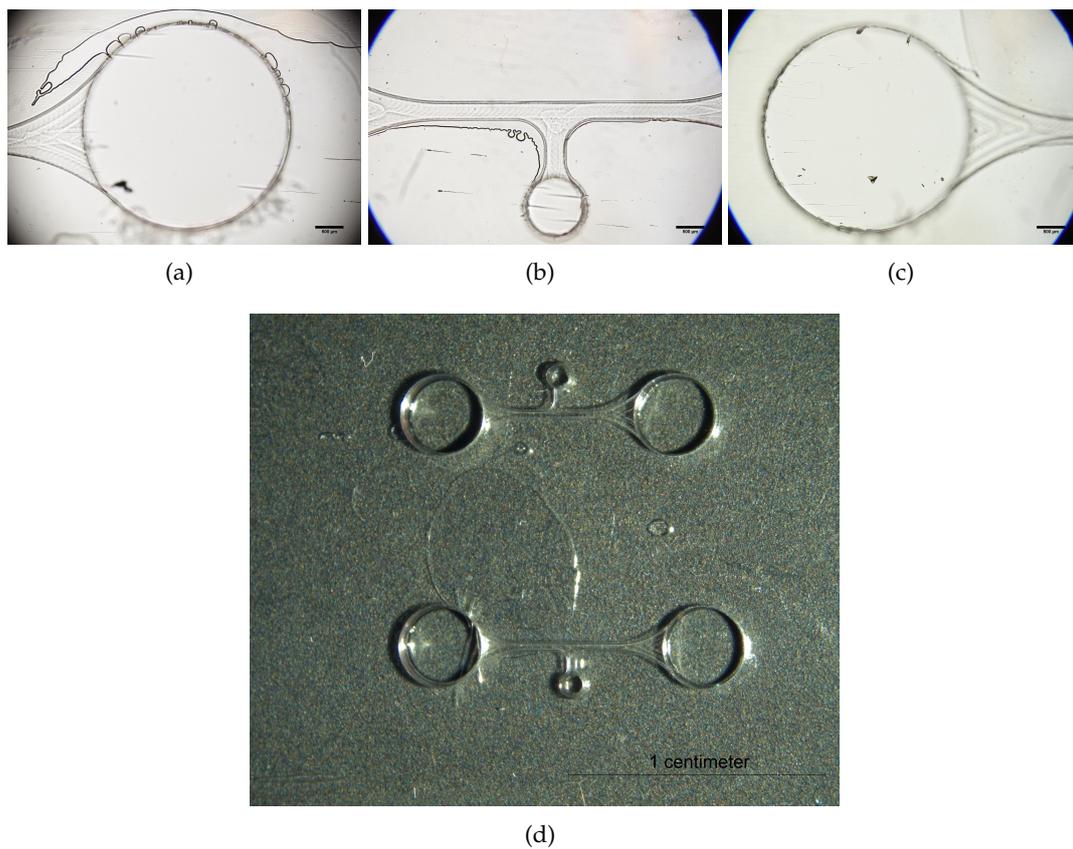
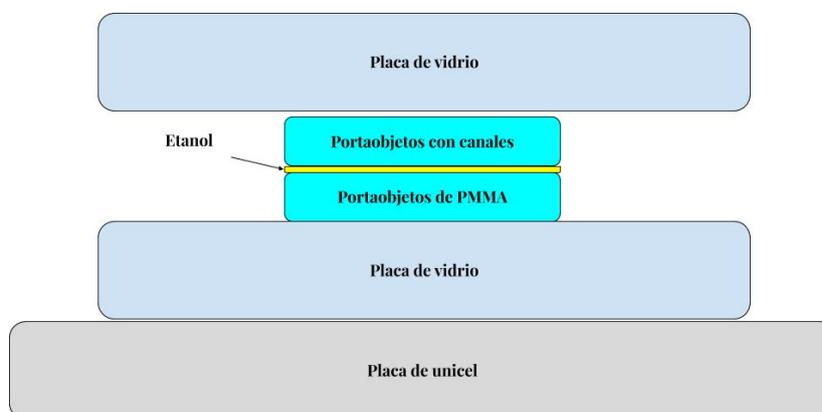
FIGURA 3.39: V:300 μ L etanol 100%, P: 4bar, T: 70C t: 2min

FIGURA 3.40: Arreglo para homogeneizar la presión usando una placa de unicel.

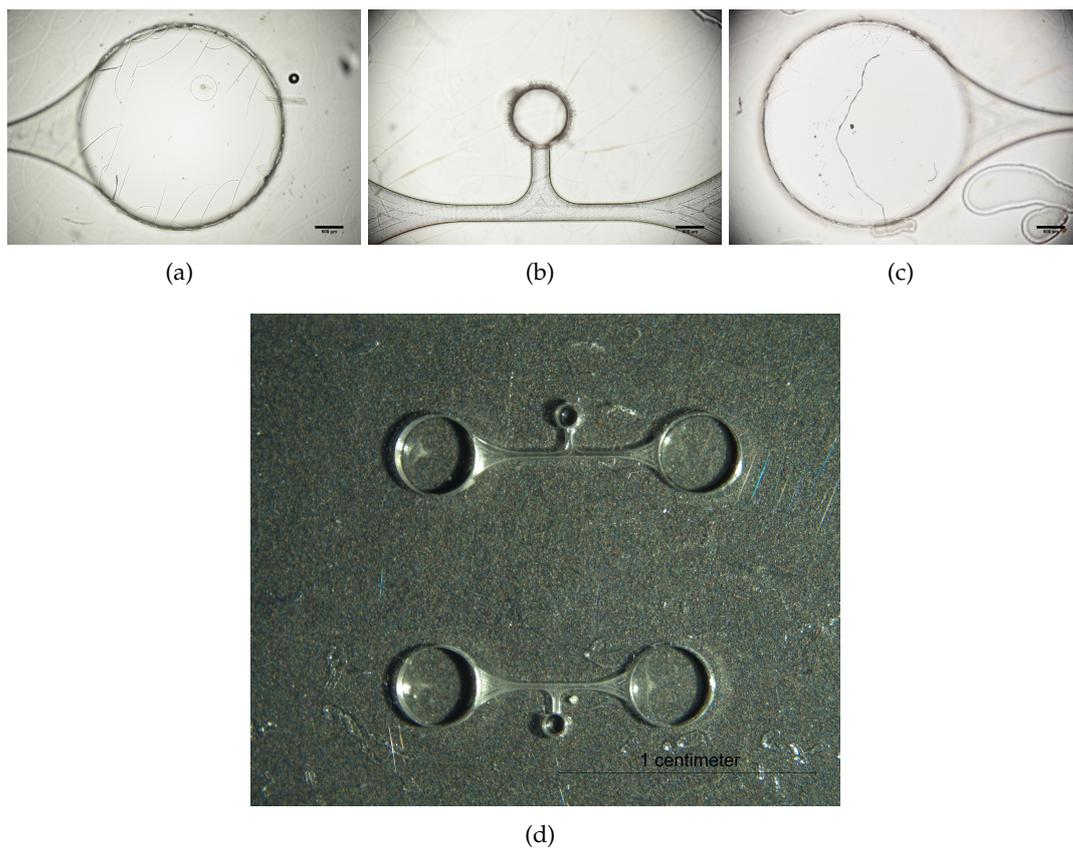


FIGURA 3.41: V:300 μ L etanol 100%, P: 4bar, T: 70C t: 2min y bloque de unicell.

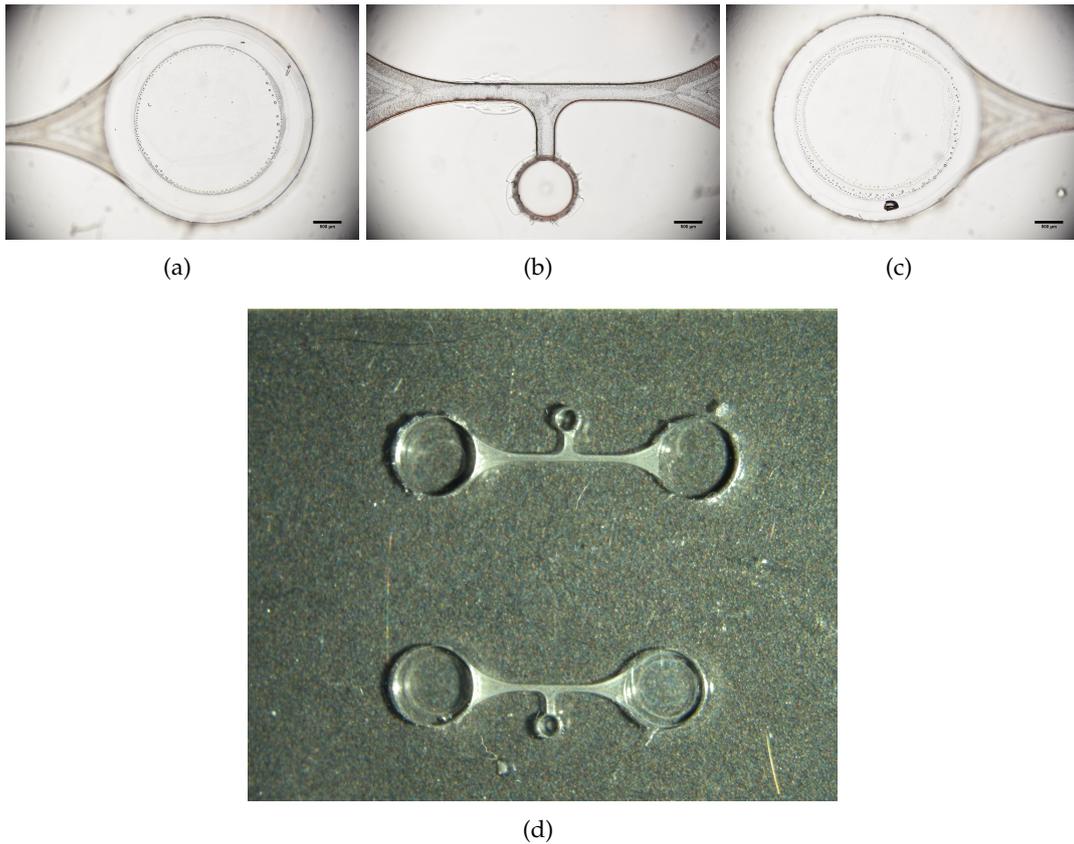


FIGURA 3.42: V:300 μ L etanol 100 %, P: 4bar, T: 70C t: 2min, un bloque de unicel y nuevo lote de PMMA

Con el arreglo de la figura 3.40 se logró eliminar el área no unida del centro de los chip 3.41. Una vez logrado un sello homogéneo en toda la superficie del portaobjetos, se procedió a solucionar el problema del agrietamiento del material. Después de notar que tal fenómeno ocurría sin importar las condiciones de presión, temperatura o solvente se decidió cambiar de Lote de PMMA y con esto se logró eliminar este problema (figura 3.42). El progreso de este experimento así como los ajustes en el protocolo que lo hicieron posible se resumen en la figura 3.43

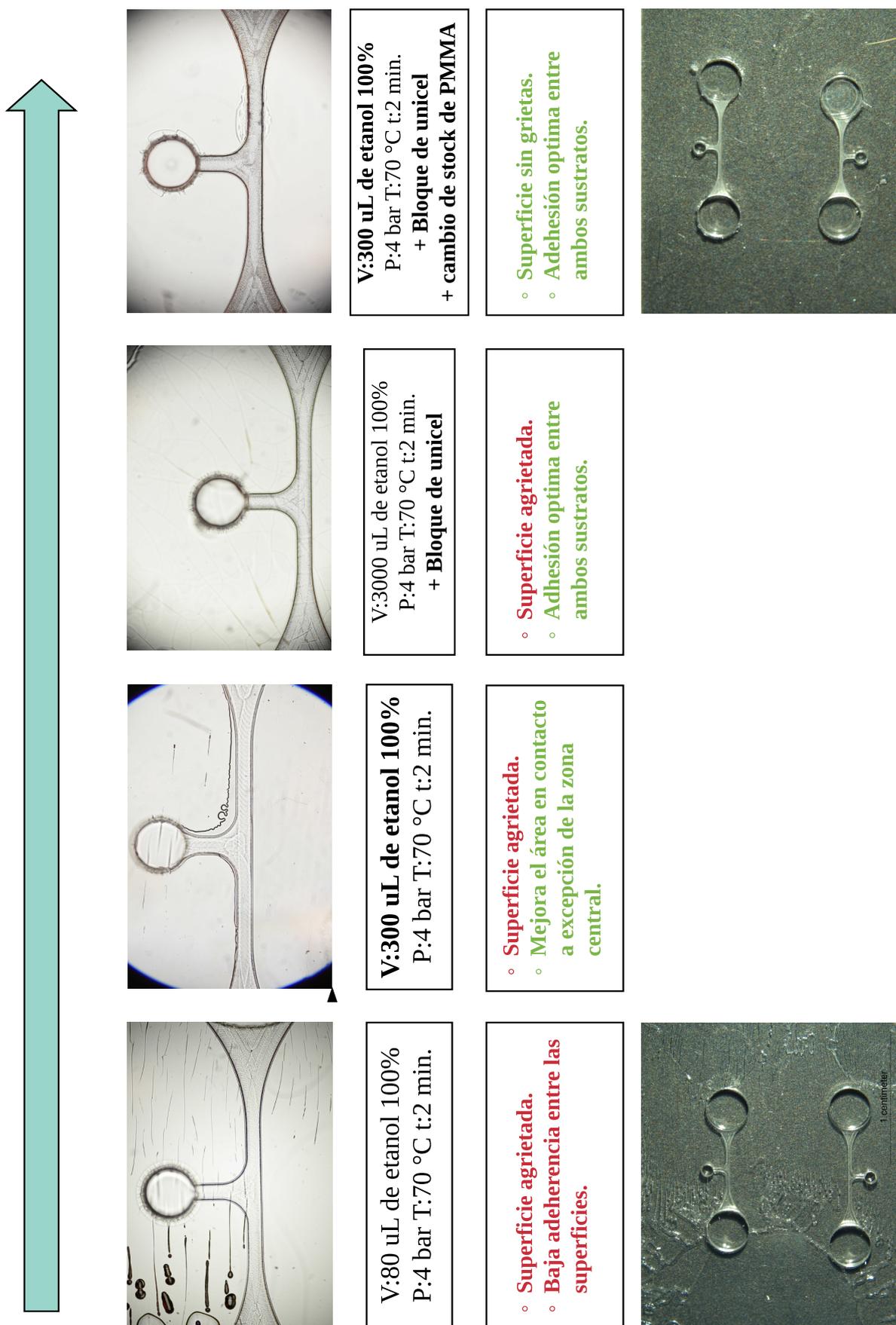


FIGURA 3.43: Ajustes al protocolo de pegado y sus resultados.

3.4.0.2. Discusión.

Cuando la superficie del polímero es solvatada, las cadenas que lo componen pueden moverse libremente y se pueden difundir en la interfaz de los materiales en contacto; cuando el solvente se evapora, las cadenas regresan a su estado de movilidad original pero el entrecruzamiento es tal que las superficies forman parte de un mismo material[34]. El papel de la presión en este fenómeno es asegurar el contacto entre las superficies para lograr tal difusión de las cadenas moleculares y lograr una buena unión. Esto puede llevar a pensar que incrementar la presión tanto como sea posible asegura el éxito del proceso. Sin embargo, al hacer esto se corre el peligro de deformar los microcanales o colapsarlos. Así, la relación entre cantidad de solvente aplicada y presión es un parámetro crítico en el proceso en el que debe de tenerse especial cuidado. Más aún, según lo hallado por la figura 3.39, además de controlar la presión que se ejerce, se debe de asegurar la distribución homogénea de la fuerza sobre el material, esto se logró al introducir la placa de unicell en el arreglo, que al ser deformable se comprime primero en las zonas de mayor presión, homogeneizando así los esfuerzos sobre el material.

Un reactivo químico actúa como solvente de otro cuando sus moléculas no exhiben una tendencia a mantenerse separadas las unas de las otras, es decir, cuando la fuerza de atracción entre moléculas similares es menor que entre moléculas distintas. Esta atracción entre moléculas del mismo tipo se puede entender como una energía de cohesión propia del material. Si dos materiales presentan energías de cohesión similar, sus moléculas pueden disolverse una en la otra. A su vez, la energía de cohesión de un material se puede evaluar a través del coeficiente δ de Hildebrand definido como la raíz cuadrada de la densidad de energía cohesiva en un sistema de moléculas, por tanto, un material será un buen solvente de otro si sus coeficientes δ son iguales.

A diferencia del cloroformo el etanol no ataca al PMMA a temperatura ambiente, pero sí a 70° C. Este comportamiento puede entenderse a la luz del coeficiente de Hildebrand cuyo valor para el PMMA a temperatura ambiente es $20,18MPa^{1/2}$. Mientras a 25 ° C para el etanol $\delta = 26,5MPa^{1/2}$ para el cloroformo $\delta = 18,6$ [49]. Según el párrafo anterior, el cloroformo es un mejor solvente para el PMMA pues sus coeficientes δ son más similares. Cuando la temperatura aumenta, el parámetro de Hildebrand de un polímero permanece estable, sin embargo, en líquidos presenta un comportamiento decreciente[50], en particular, para el etanol δ disminuye a un valor aproximado de $\delta = 20,1MPa^{1/2}$ por lo que se vuelve un solvente ideal para el acrílico. Hay que destacar que esta temperatura está por debajo de la temperatura de transición vítrea T_g y por tanto se evita la deformación térmica de los microcanales. Este método, que controla la solubilidad del polímero con la temperatura del solvente, permite alcanzar un mejor control en el grado de ataque que sufre la superficie por lo que el etanol resulta un mejor solvente que el cloroformo para el pegado de PMMA.

La formación de grietas es un fenómeno que se observó tanto al usar etanol, acetona y cloroformo para atacar el acrílico. Al adsorber la superficie de PMMA el solvente, se crea un gradiente de concentración (en zonas más cercanas a la superficie se adsorbe más solvente y viceversa) que hincha el material e induce estrés local de compresión en él. Una vez que el solvente comienza a evaporarse, el estrés en la superficie es ahora de tensión. Ya que la evaporación es mayor en la superficie que en el bulto, la tensión es mayor en esta zona; cuando esta tensión supera un cierto valor crítico, la superficie se rompe y se genera una grieta. El cloroformo y la acetona, al tener parámetros de Hildebrand más cercanos al del PMMA se difunden mejor en su superficie, creando más *swelling* y mas tensión, por lo que producen grietas más fácilmente que el etanol. No obstante, se encontró que el etanol fracturaba o no el PMMA según el lote que se escogiera, tal diferencia de comportamiento se sospecha tiene origen en el método de fabricación de ambos lotes: por casting y por extrusión [45, 45]. En el primer método una mezcla de metil metacrilado y agentes entrecruzante se vierte en un

molde hasta que la mezcla solidifica, en el segundo, se emplean pellets fundidos a los que se les aplica presión a través de una abertura, este proceso de extrusión, junto con la contracción térmica del material, crean un pre estrés de tensión en la superficie que facilita la fractura del material.

3.5. The big picture: Dispositivo Point-of-Care para detección dual de glucosa insulina

A lo largo de este capítulo se ha mostrado el desarrollo de un protocolo para la fabricación de dispositivos microfluídicos por fresado CNC. Este protocolo es parte de un objetivo más grande, en el que se persigue el impacto social a través de la tecnología Lab-on-Chip y Point-of-Care. A continuación se presentan los resultados preliminares de uno de los dispositivos microfluídicos desarrollados gracias a este trabajo y a la colaboración con distintos miembros del laboratorio.

3.5.1. Contexto

La diabetes mellitus es una epidemia que actualmente padecen 422 millones de personas alrededor del mundo. Tan sólo en México, la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), responsable del 90 % de todos los casos de diabetes, prevalence en 20.1 millones de habitantes (15,8 %) siendo ésta la principal causa de ceguera, enfermedad renal, amputación de miembros e infarto al miocardio. Clínicamente la diabetes mellitus tipo 2 se reconoce como un estado constante de niveles anormales de la cantidad de glucosa en la sangre y por tanto, surge la necesidad imperativa de monitorear ésta molécula en un individuo. No obstante, lograr los niveles apropiados de monitoreo de glucosa en sangre en la población mexicana ha sido una meta sumamente difícil de alcanzar; este hecho se demuestra en que esta enfermedad es la principal causa de muerte entre las mujeres de y la segunda entre los hombres.

Ya que la DMT2 representa un estado metabólico alterado, definirla o delimitarla resulta sumamente complicado. La hiperglucemia en ayuno delimita un estado relativamente tardío en el proceso de la enfermedad y de forma temprana, la homeostasis de la glucosa y el metabolismo energético puede presentar alteraciones fácilmente detectables, específicamente, en la DMT2 se produce una deficiencia relativa de insulina, hormona clave en la homeostasis de la glucosa.

La secreción de la insulina está acoplada a los niveles de glucosa a través de una relación dosis-respuesta que mantiene la concentración de glucosa dentro de un rango de alrededor de 4.5M, la regulación de la glucosa por la insulina se lleva a cabo principalmente impidiendo la liberación de glucosa por el hígado y promoviendo la captura de ella por el músculo y tejido adiposo. Un organismo que falla en éstos mecanismos a pesar de presentar la concentración típica de insulina se dice que ha desarrollado resistencia a la insulina, defecto común del síndrome metabólico en el que se encuentra agrupado la DMT2. Un organismo que presenta resistencia a la insulina muestra un periodo de glucemia normal en el que el páncreas compensa la resistencia mediante la hipersecreción de insulina, después de esto, el páncreas fracasa en secretar suficiente insulina y se desarrolla la diabetes.

Por lo anterior, es de importancia fundamental contar con una herramienta para cuantificar en una población la sensibilidad a la insulina. Contar con los datos de la dinámica de esta hormona permitirá investigar de manera adecuada la epidemiología y mecanismos fisiopatológicos, el beneficio de intervenciones terapéuticas y el curso clínico de los pacientes con resistencia a la insulina. La forma más directa de evaluar la sensibilidad a la insulina en la medición dual (en paralelo) de los niveles sanguíneos de glucosa e insulina.

A la fecha, no existen plataformas de medición dual glucosa-insulina miniaturizadas y de bajo costo que permitan realizar un diagnóstico preciso, ni monitoreo en tiempo real de manera generalizada, como es requerido por el sector médico, tanto en México como en el resto del mundo. Actualmente, la manera generalizada en la que se monitorea la diabetes consiste en la medición del nivel de glucosa sanguínea, este estudio es necesario pero no suficiente para revelar el estado de salud del paciente sobre todo en la etapa temprana del padecimiento. Medir simultáneamente la glucosa y la insulina es un requisito crítico para describir la condición de un paciente y más aún, para analizar el impacto inmediato o a largo plazo de los tratamientos, dieta, ejercicio y cualquier intervención que se aplique en el paciente.

En este contexto, el objetivo de este proyecto es el desarrollo de un biosensor tipo PoC que permita medir simultáneamente los niveles de glucosa e insulina de una persona en una muestra de saliva de manera fácil, rápida, barata y confiable.

En las secciones siguientes, se describe el desarrollo de un dispositivo microfluídico LoC que integra una prueba ELISA de competencia con la ayuda de micropartículas magnéticas funcionalizadas con insulina para la medición de la misma y un proceso de cronopotenciometría con el que se mide la concentración de glucosa en sangre. Además del cartucho microfluídico, nuestra propuesta cuenta con un lector miniatura, portable y de bajo costo que permite realizar la lectura de insulina y glucosa en cualquier sitio y con habilidades técnicas mínimas.

3.5.2. **Chip microfluídico y reacciones de detección**

La detección dual en una sola muestra de sangre de los niveles de glucosa e insulina en el sensor desarrollado aquí se lleva a cabo gracias a dos etapas, una electroquímica y una óptica, que consisten en dos tipos de reacciones diferentes.

En el caso de la primer reacción, se mide una corriente eléctrica aprovechando la producción de cargas, producto de la oxidación de la glucosa. En esta etapa el número de cargas producidas es directamente proporcional al número de moléculas de glucosa presentes y por tanto al medir éstas cargas como una corriente eléctrica es posible determinar la cantidad de glucosa en la muestra.

La etapa óptica corresponde a la medición de insulina. Esta rutina de detección está basada en un ensayo ELISA de competencia en la que se aprovecha el enlace específico de dos moléculas (insulina y anti-insulina) para producir una señal luminosa (fluorescencia) de la que es posible inferir la concentración de insulina en la muestra de sangre, el proceso completo se describe a continuación:

En primer lugar, una gota de sangre con los niveles que se desean medir se deja reaccionar con una solución de antiinsulina, estas dos moléculas producen una unión específica (sólo se enlazan entre ellas) que deja libre una cantidad determinada de anticuerpos. Entre más insulina haya en la muestra menos anticuerpos quedarán libres y viceversa. Ya que el número inicial de anticuerpos es conocido, la cantidad de éstas moléculas que quedaron libres es un indicador directo de cuánta insulina había en la muestra. El conteo de los anticuerpos que quedaron libres se realiza gracias a que éstos emiten luz verde al ser iluminados con luz azul, ésta luz verde es medida con un fotodetector y su intensidad es proporcional al número de anticuerpos que no se hayan adherido. Para eliminar la contribución a la intensidad de luz verde de los anticuerpos que se unen a la insulina en la primera etapa, los anticuerpos restantes son capturados por micropartículas magnéticas a las que se les ha pegado insulina. Utilizando una imán, estas partículas magnéticas son llevadas a dónde se encuentran los anticuerpos, estos se capturan y por último se llevan a una zona limpia donde se mide la señal luminosa que producen, de ésta forma, la intensidad de luz verde que es producida por las partículas magnéticas que tienen anticuerpos adheridos es indicador de

la cantidad de anticuerpos que quedan libres en la primera reacción y por tanto es indicador de la cantidad de insulina en la muestra de sangre(ver figura 3.45).

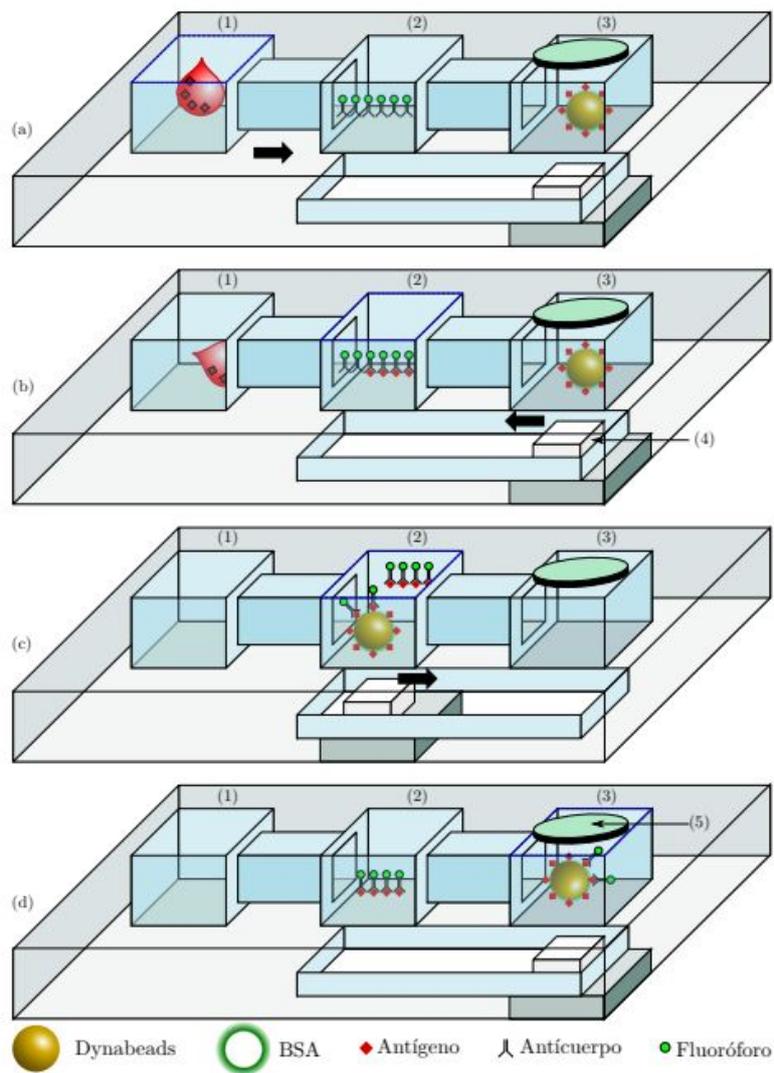


FIGURA 3.44: Esquema de detección de insulina[51]

La parte central de este sensor consiste en un chip microfluídico que integra en un solo dispositivo y a partir de una sola muestra las dos reacciones anteriores. La fotografía de la figura 3.45 muestra el chip desarrollado y la zonas que lo componen.

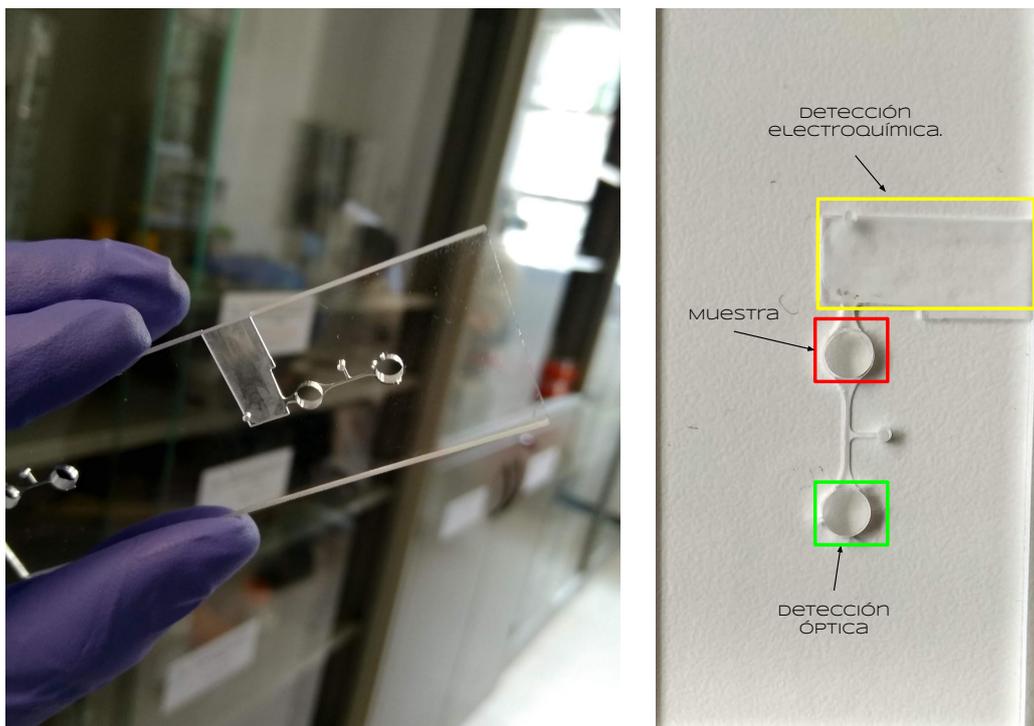


FIGURA 3.45: Chip de detección dual.

El chip microfluídico desarrollado consiste en tres pozos conectados entre sí por microcanales. Cada uno de los pozos es una zona funcional del chip, depósito de la muestra, detección electroquímica y detección óptica.

Por su bajo costo, facilidad de manufactura y escalabilidad este chip se fabrica en acrílico (PMMA); para fines de prototipado rápido este chip se fabrica por micro maquinado CNC según se detalló en las secciones anteriores.

3.5.3. Preparación del chip

El proceso de lectura comienza preparando el chip para la detección. En este proceso, primero, se deposita en el pozo de detección 10 μ L de micropartículas magnéticas (Dynabeads™ M-450 Tosylactivated) a las que se les ha unido insulina.

La zona de detección electroquímica está diseñada para recibir electrodos insertables que son los que capturan las cargas producto de la reacción. Este chip es compatible con electrodos de fabricación propia y electrodos comerciales en caso de que se requiera 3.46. Mientras que los electrodos comerciales representan una solución inmediata y disponible de manera masiva para el público, los electrodos de fabricación propia representan una solución flexible en la que es posible integrar distintos diseños, paralelizar mediciones o utilizar distintos materiales que reduzcan costos o permitan otras técnicas de medición. Una versión siguiente de nuestro chip microfluídico tendrá incluidos los microelectrodos fabricados por nosotros y evitará este paso de preparación.

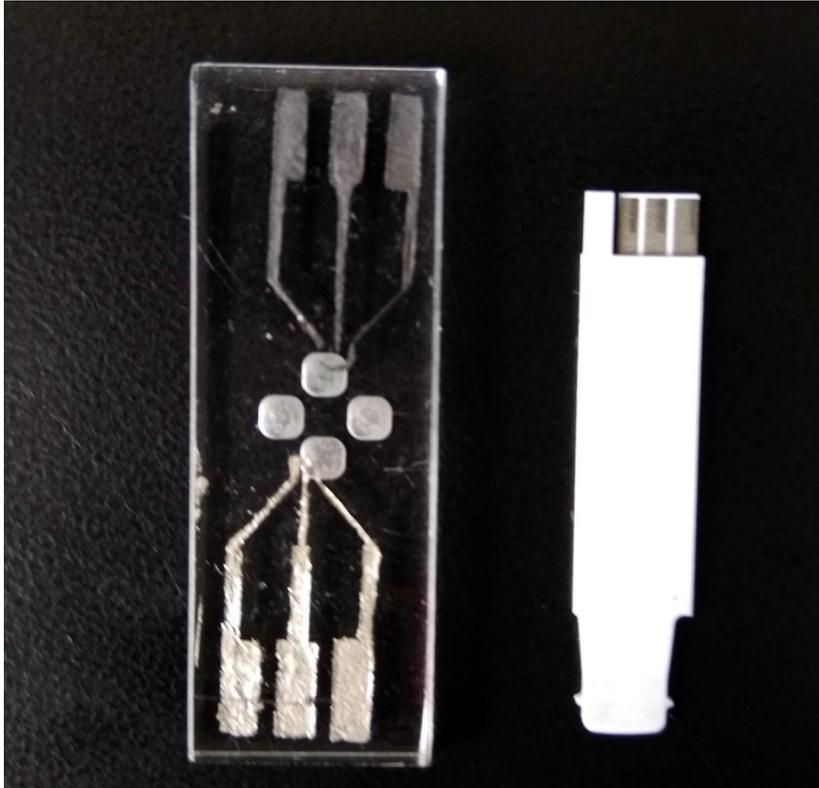


FIGURA 3.46: Electrodo de fabricación propia(izquierda) electrodo comercial(derecha).

La preparación del chip para la detección de glucosa consiste en únicamente colocar el chip en la plataforma A de nuestro dispositivo, insertar un electrodo en el chip y conectarlo a el circuito de medición que se ha desarrollado para calcular el nivel de glucosa a partir de la señal temporal de corriente obtenida, exactamente análogo a un glucómetro comercial.

El último paso para preparar la lectura de detección en chip consiste en preparar la muestra de sangre, en este paso se toman 9uL de una muestra a analizar y se agrega 1uL de anticuerpo antiinsulina, esta solución se deja incubar por aparte durante 2 horas y finalmente esta preparación se deposita en el pozo de muestra.

3.5.4. Detección electroquímica

La detección dual de glucosa e insulina comienza en el momento en el que se coloca la muestra en el chip, en este punto el líquido depositado fluye por capilaridad hacia la zona de electrodos¹⁰ donde se produce la oxidación de la glucosa, las cargas libres que se producen en esta reacción se leen en los electrodos como una corriente que obedece a una dinámica temporal como la que se muestra en la figura 3.47.

¹⁰Todos los electrodos empleados son sensibilizados con la enzima glucosa oxidasa.

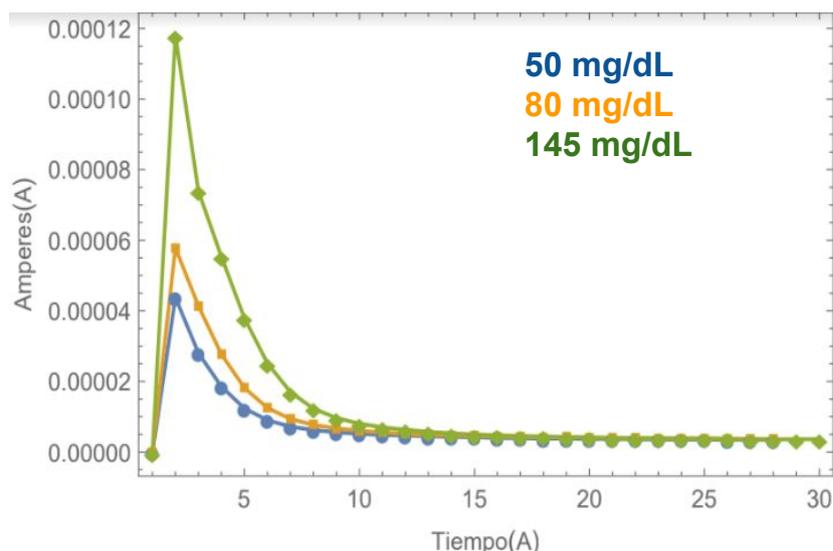
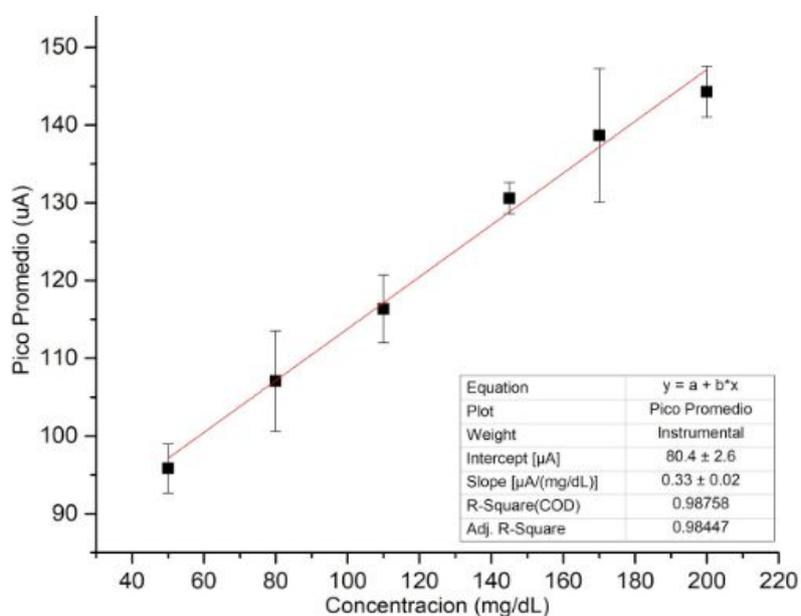


FIGURA 3.47: Corriente eléctrica en los electrodos de medición como función del tiempo[52]

Una mayor cantidad de glucosa produce más cargas libres y por tanto una corriente más alta, de verde se aparecía como una muestra con glucosa a una concentración de 145 mg/dL produce un pico de alrededor de 120 μA mientras que una concentración de 50mg/dL produce un pico de 40 μA . El intervalo que se abarca de los 50mg/dL a 145mg/dL corresponde con los niveles típicos de glucosa que presenta la población sana y con diabetes. El resultado de caracterizar el área bajo la curva como función de la concentración de insulina se muestra en la gráfica 3.49 y la ecuación que la describe es la forma en la que nuestro sensor traduce la corriente que mide en un valor de glucosa.



Ecuación de la recta resultante:

$$I_p [\mu\text{A}] = 0.33 C[\text{mg}/\text{dL}] + 80.4$$

FIGURA 3.48: Corriente eléctrica en los electrodos de medición como función del tiempo[52]

3.5.5. Detección de fluorescencia

Después de que se obtiene la lectura de glucosa el siguiente paso es obtener la medición de la insulina. En éste punto debe de recordarse que el pozo de la muestra se encuentra lleno y que en él se encuentran los anticuerpos libres que no son capturados por la glucosa en la muestra. Según se discutió arriba, éstos anticuerpos se llevan a la zona de detección capturándolos con micropartículas magnéticas que son movidas por un imán en la parte inferior del chip.

En el momento en que las beads se encuentran en la zona de medición, el último paso es la medición de la intensidad de fluorescencia. La lectura de la cantidad de anticuerpos sobrantes de la reacción se realiza excitando las moléculas con un LED azul de 1W y midiendo su emisión con un fotodiodo SensL MicroFM-SMTPA-30050. Adicionalmente se emplean dos filtros ópticos que seleccionan la longitud de onda emisión del LED para coincidir con el máximo de absorción del fluoróforo Alexa 488 que es el responsable de la fluorescencia de los anticuerpos. El filtro verde se coloca entre el fotodetector y la muestra y elimina la señal en él, que no se deba a la emisión de los anticuerpos.

Para validar de nuestro chip microfluídico, es necesario demostrar que es posible medir concentración a partir de la detección de una baja intensidad de fluorescencia. Ya que el realizar estas pruebas con anticuerpos representaría un costo muy elevado, ésta validación se realizó con una molécula de propiedades de fluorescencia similares a las de Alexa 488, fluoresceína.

Empleando esta molécula, hemos demostrado que podemos distinguir con nuestro chip, distintas concentraciones de moléculas fluorescentes y más aún, éstas concentraciones se encuentran en el orden de los micro y nanomoles que producen una señal en el fotodetector en el mismo intervalo en el que se espera estará la corriente producida por los anticuerpos.

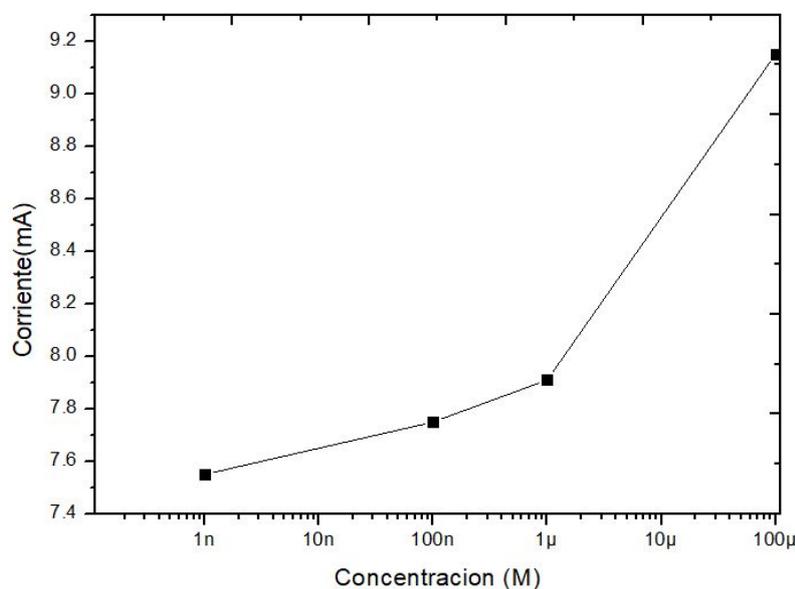


FIGURA 3.49: Curva de corriente en el fotodetector en función de la concentración de fluoresceína.

Obtener la gráfica anterior utilizando dynabeads funcionalizadas es el paso que hace falta para completar la medición dual de glucosa e insulina en nuestro biosensor. Actualmente los esfuerzos de nuestro grupo se concentran en éste objetivo.

Capítulo 4

Conclusiones y perspectivas

La microfluídica tiene el potencial de cambiar la forma en la que se estudia la biología moderna [5]. Este cambio de paradigma requiere de, primero, un compromiso tanto de las instituciones para adoptar esta nueva tecnología, como de la academia para ofrecer soluciones a problemas concretos y que puedan transferirse directamente, a la industria privada y, como fin último, al sector que lo necesita.

La microfluídica tiene el potencial de cambiar la forma en la que se estudia la biología moderna [5]. Este cambio de paradigma requiere de un compromiso tanto de las instituciones para adoptar esta nueva tecnología, como de la academia para ofrecer soluciones a problemas concretos que sean transferibles al sector que lo necesita a través de la industria privada.

Para que tal transferencia de tecnología sea posible, es necesario asegurar que es factible la producción masiva (>5000 piezas/mes) de chips microfluídicos. El trabajo desarrollado en esta tesis tiene como fin último dicho objetivo, y muestra cómo el microfresado CNC es una alternativa a los métodos de fabricación tradicionales para acceder a la microfluídica desde una aproximación no convencional en la que no se requiere de un cuarto limpio ni de fotolitografía en obleas de silicio.

Según lo mostrado en el capítulo 3, el microfresado CNC es una herramienta versátil que permite la fabricación de micro estructuras de hasta $30\mu\text{m}$ que pueden ser transferidas a PDMS por litografía suave o empleadas directamente para fabricar chips microfluídicos. Gracias a este trabajo de tesis, el laboratorio $\mu\text{ntec-LaNSBioDyT}$ es ahora capaz de producir dispositivos microfluídicos bajo demanda no sólo para sus integrantes si no para la comunidad que requiera de este servicio. La figura 4.1 muestra dos ejemplos de (uno en PMMA y uno en PDMS) de los chips que se pueden ahora producir rutinariamente, estos diseños sencillos pueden fabricarse desde cero en alrededor de 10 minutos para el PMMA y 90 para el PDMS. A partir de este flujo de trabajo, se estima que una persona podría fabricar 32 chips de PMMA por día e incluso igualar esta cifra en PDMS si se emplean varios micromoldes en paralelo.

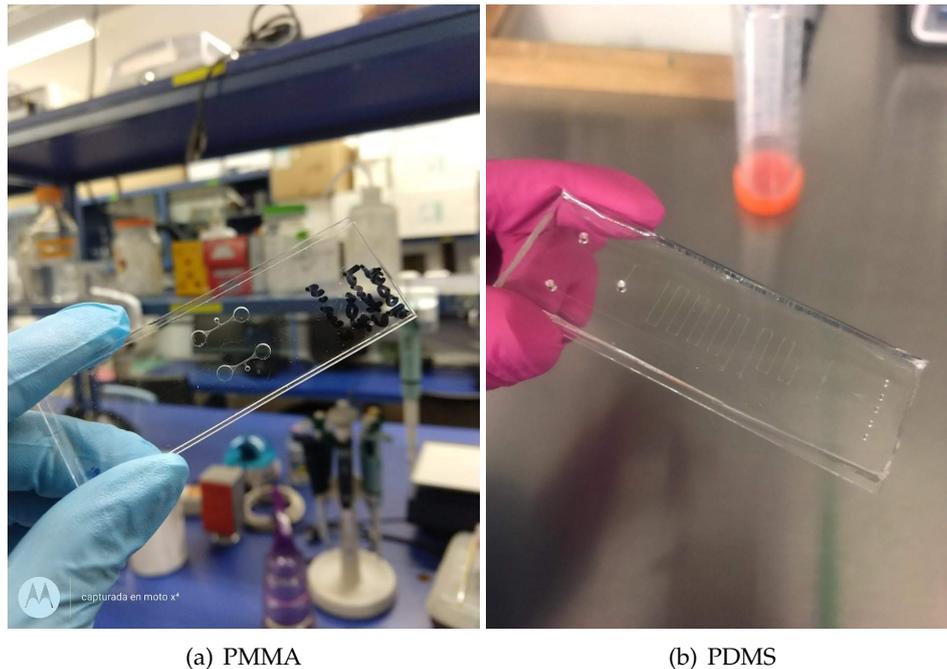


FIGURA 4.1: Chips microfluídicos fabricado gracias a este trabajo de tesis.

De los resultados expuestos en el capítulo 3 se concluye:

- Se demostró que el fresado CNC de alta resolución es una técnica que permite la fabricación de microestructuras en PMMA.
- Es posible controlar la rugosidad de una superficie según sus parámetros de corte en un rango que va de los 5000nm a los 80nm.
- La litografía suave es un proceso compatible con estructuras en PMMA fabricadas por fresado CNC.
- Un tratamiento por vapor de acetona sobre los micromoldes de PMMA disminuye la rugosidad y mejor el sellado de los chips que a partir de ella se obtiene.
- El fresado CNC es una técnica que permite la fabricación de chips microfluídicos en PMMA y en PDMS

Un aspecto en el que destaca la técnica estudiada en este trabajo es el tiempo de fabricación: para diseños sencillos, como los de las secciones 3.4 y 3.3, el tiempo de espera entre un diseño y un chip, puede ser en PMMA tan bajo como 10 minutos o 90 en PMDS mejorando así el récord de un día reportado por Whitesides en 1998. [23]

Para mejorar el precio final de cada chip y lograr la producción masiva, resta como trabajo a futuro desarrollar un protocolo para transferir a PMMA un circuito microfluídico por *termoformado* (*hot embossing*) empleando un molde maquinado por CNC en latón. Para que esta producción masiva sea exitosa, este proceso deberá disminuir el tiempo de fabricación a menos de 2 min. por chip [29].

Apéndice A

Apéndice A: Procedimiento de operación del equipo de fresado CNC MiniMill4



LaNSBioDyT

**LABORATORIO NACIONAL
DE SOLUCIONES BIOMIMÉTICAS PARA DIAGNÓSTICO Y TERAPIA**

PROCEDIMIENTO PARA OPERACIÓN DEL EQUIPO CNC MINIMILL4

LANSBIO-PROC-19-02



ELABORÓ: FRANCISCO PÁEZ LÁRIOS
EXPERTO EN USO DE EQUIPO



APROBÓ: FÉLIX CERÓN VERA
USUARIO DE EQUIPO



APROBÓ: MATHIEU HAUTEFEUILLE
RESPONSABLE TÉCNICO

FECHA DE EMISIÓN: 28 DE ENERO DE 2019

Apéndice B

Apéndice B: Procedimiento de elaboración de PDMS.

LaNSBioDyT

**LABORATORIO NACIONAL
DE SOLUCIONES BIOMIMÉTICAS PARA DIAGNÓSTICO Y TERAPIA**

PROCEDIMIENTO PARA ELABORACIÓN DE PDMS(184 Y 527)

LANSBIO-PROC-10-01



ELABORÓ: FRANCISCO PÁEZ LARIOS
ELABORÓ: LUCIA CABRIALES TORRIJOS
USUARIOS EXPERTOS



APROBÓ: MATHIEU HAUTEFEUILLE
RESPONSABLE TÉCNICO

FECHA DE EMISIÓN: 5 DE MARZO DE 2018

Bibliografía

- [1] Organización mundial de la salud. *Más sano, más justo, más seguro: La travesía de la salud mundial 2007-2017*. 2017.
- [2] Rocío Muñoz-Ledo. *25 por ciento de hogares en México no tienen acceso a agua potable: CNDH - Aristegui Noticias*. <https://aristeguinoticias.com/2203/mexico/25-por-ciento-de-hogares-en-mexico-no-tienen-acceso-a-agua-potable-cndh/>. (Accessed on 10/11/2018).
- [3] Paul Yager y col. «Microfluidic diagnostic technologies for global public health». En: *Nature* 442.7101 (2006), pág. 412.
- [4] George M Whitesides. «The origins and the future of microfluidics». En: *Nature* 442.7101 (2006), pág. 368.
- [5] David J. Beebe, Glennys A. Mensing y Glenn M. Walker. «Physics and Applications of Microfluidics in Biology». En: *Annual Review of Biomedical Engineering* 4.1 (2002), págs. 261-286. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.4.112601.125916.
- [6] Alexis F Sauer-Budge y col. «Low cost and manufacturable complete microTAS for detecting bacteria». En: *Lab on a Chip* 9.19 (2009), págs. 2803-2810.
- [7] Clement Kleinstreuer. *Microfluidics and nanofluidics: theory and selected applications*. John Wiley & Sons, 2013.
- [8] Dongqing Li. *Encyclopedia of microfluidics and nanofluidics*. Springer Science & Business Media, 2008.
- [9] Daan Brinks y col. «Ultrafast dynamics of single molecules». En: *Chemical Society Reviews* 43.8 (2014), págs. 2476-2491.
- [10] Zhichao Ma y col. «Fluorescence activated cell sorting via a focused traveling surface acoustic beam». En: *Lab on a Chip* 17.18 (2017), págs. 3176-3185.
- [11] Patrick Tabeling. *Introduction to microfluidics*. Oxford University Press on Demand, 2005.
- [12] J McGrath, M Jimenez y Helen Bridle. «Deterministic lateral displacement for particle separation: a review». En: *Lab on a Chip* 14.21 (2014), págs. 4139-4158.
- [13] Yao Zhou y col. «Generation of complex concentration profiles by partial diffusive mixing in multi-stream laminar flow». En: *Lab on a Chip* 9.10 (2009), págs. 1439-1448.
- [14] Hamed Amini, Wonhee Lee y Dino Di Carlo. «Inertial microfluidic physics». En: *Lab on a Chip* 14.15 (2014), págs. 2739-2761.
- [15] Erwin Berthier y col. «Managing evaporation for more robust microscale assays Part 2. Characterization of convection and diffusion for cell biology». En: *Lab on a Chip* 8.6 (2008), págs. 860-864.
- [16] Aaron M Streets y Yanyi Huang. «Chip in a lab: Microfluidics for next generation life science research». En: *Biomicrofluidics* 7.1 (2013), pág. 011302.
- [17] Luc Gervais, Nico De Rooij y Emmanuel Delamarche. «Microfluidic chips for point-of-care immunodiagnostics». En: *Advanced materials* 23.24 (2011), H151-H176.

- [18] Mazher Iqbal Mohammed, Steven Haswell y Ian Gibson. «Lab-on-a-chip or Chip-in-a-lab: Challenges of Commercialization Lost in Translation». En: *Procedia Technology* 20 (2015), págs. 54-59.
- [19] Lisa R Volpatti y Ali K Yetisen. «Commercialization of microfluidic devices». En: *Trends in biotechnology* 32.7 (2014), págs. 347-350.
- [20] Stephen C Terry, John H Jerman y James B Angell. «A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer». En: *IEEE transactions on electron devices* 26.12 (1979), págs. 1880-1886.
- [21] WD Volkmuth y RH Austin. «DNA electrophoresis in microlithographic arrays». En: *Nature* 358.6387 (1992), pág. 600.
- [22] Yuji Murakami y col. «Integration of enzyme-immobilized column with electrochemical flow cell using micromachining techniques for a glucose detection system». En: *Analytical Chemistry* 65.20 (1993), págs. 2731-2735.
- [23] David C Duffy y col. «Rapid prototyping of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane)». En: *Analytical chemistry* 70.23 (1998), págs. 4974-4984.
- [24] David I Walsh III y col. «Enabling microfluidics: from clean rooms to makerspaces». En: *Trends in biotechnology* 35.5 (2017), págs. 383-392.
- [25] Vittorio Saggiomo y Aldrik H Velders. «Simple 3D printed scaffold-removal method for the fabrication of intricate microfluidic devices». En: *Advanced Science* 2.9 (2015), pág. 1500125.
- [26] Anthony Grimes y col. «Shrinky-Dink microfluidics: rapid generation of deep and rounded patterns». En: *Lab on a Chip* 8.1 (2008), págs. 170-172.
- [27] Suk-Heung Song y col. «A rapid and simple fabrication method for 3-dimensional circular microfluidic channel using metal wire removal process». En: *Microfluidics and Nanofluidics* 9.2-3 (2010), págs. 533-540.
- [28] David J Guckenberger y col. «Micromilling: a method for ultra-rapid prototyping of plastic microfluidic devices». En: *Lab on a Chip* 15.11 (2015), págs. 2364-2378.
- [29] Chia-Wen Tsao. «Polymer microfluidics: Simple, low-cost fabrication process bridging academic lab research to commercialized production». En: *Micromachines* 7.12 (2016), pág. 225.
- [30] Dongeun Huh y col. «Microfabrication of human organs-on-chips». En: *Nature protocols* 8.11 (2013), pág. 2135.
- [31] Holger Becker y Laurie E Locascio. «Polymer microfluidic devices». En: *Talanta* 56.2 (2002), págs. 267-287.
- [32] A Mathur y col. «Characterisation of PMMA microfluidic channels and devices fabricated by hot embossing and sealed by direct bonding». En: *Current Applied Physics* 9.6 (2009), págs. 1199-1202.
- [33] SR Mahmoodi y col. «Gas-assisted thermal bonding of thermoplastics for the fabrication of microfluidic devices». En: *Microsystem Technologies* (), págs. 1-10.
- [34] Chia-Wen Tsao y Don L DeVoe. «Bonding of thermoplastic polymer microfluidics». En: *Microfluidics and nanofluidics* 6.1 (2009), págs. 1-16.
- [35] Arshya Bamshad, Alireza Nikfarjam y Hossein Khaleghi. «A new simple and fast thermally-solvent assisted method to bond PMMA-PMMA in micro-fluidics devices». En: *Journal of Micromechanics and Microengineering* 26.6 (2016), pág. 065017.

- [36] ISO 4288:1996 - Geometrical Product Specifications (GPS) – Surface texture: Profile method – Rules and procedures for the assessment of surface texture. <https://www.iso.org/standard/2096.html>. (Accessed on 04/19/2019).
- [37] MITUTOYO. QUICK GUIDE TO SURFACE ROUGHNESS MEASUREMENT. https://www.mitutoyo.com/wp-content/uploads/2012/11/1984_Surf_Roughness_PG.pdf. (Accessed on 04/19/2019).
- [38] MITUTOYO. Quick Guide to Precision Measuring Instruments. https://www.mitutoyo.co.jp/eng/products/menu/QuickGuide_Surftest.pdf. (Accessed on 04/19/2019).
- [39] ISO 16610-21:2011 - Geometrical product specifications (GPS) – Filtration – Part 21: Linear profile filters: Gaussian filters. <https://www.iso.org/standard/50176.html>. (Accessed on 04/19/2019).
- [40] DigitalSurf. Filtration Techniques - Surface Metrology Guide - Digital Surf. <https://guide.digitalsurf.com/en/guide-filtration-techniques.html#iso16610>. (Accessed on 04/19/2019).
- [41] ES Gadelmawla y col. «Roughness parameters». En: *Journal of materials processing Technology* 123.1 (2002), págs. 133-145.
- [42] A Ayoib y col. «Soft lithography of microfluidics channels using su-8 mould on glass substrate for low cost fabrication». En: *2016 IEEE EMBS Conference on Biomedical Engineering and Sciences (IECBES)*. IEEE. 2016, págs. 226-229.
- [43] Rian Seghir y Steve Arscott. «Extended PDMS stiffness range for flexible systems». En: *Sensors and Actuators A: Physical* 230 (2015), págs. 33-39.
- [44] Edgar Adan Jiménez Díaz. *Desarrollo de plataforma con microflujo para cultivo celular*. Universidad Nacional Autónoma de México, 2016.
- [45] IRG Ogilvie y col. «Reduction of surface roughness for optical quality microfluidic devices in PMMA and COC». En: *Journal of Micromechanics and Microengineering* 20.6 (2010), pág. 065016.
- [46] Sandrine Miserere y col. «Fabrication of thermoplastics chips through lamination based techniques». En: *Lab on a Chip* 12.10 (2012), págs. 1849-1856.
- [47] Antonio Liga, Jonathan AS Morton y Maïwenn Kersaudy-Kerhoas. «Safe and cost-effective rapid-prototyping of multilayer PMMA microfluidic devices». En: *Microfluidics and Nanofluidics* 20.12 (2016), pág. 164.
- [48] Alwin MD Wan, Thomas A Moore y Edmond WK Young. «Solvent bonding for fabrication of PMMA and COP microfluidic devices». En: *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 119 (2017), e55175.
- [49] Allan FM Barton. *CRC handbook of solubility parameters and other cohesion parameters*. Routledge, 2017.
- [50] SH Ng y col. «Thermally activated solvent bonding of polymers». En: *Microsystem Technologies* 14.6 (2008), págs. 753-759.
- [51] Jehú López Aparicio. *DISEÑO, DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE UN BIOSENSOR DE GLUCOSA MINIATURIZADO E INTEGRACIÓN EN UNA PLATAFORMA DE MEDICIÓN DUAL PARA LA DIABETES MELLITUS TIPO II*. Universidad Nacional Autónoma de México, 2018.
- [52] CINDY VIRIDIANA PETO GUTIÉRREZ. *DESARROLLO DE UN BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO MINIATURIZADO*. Universidad Nacional Autónoma de México, 2019.