



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA DE MATERIALES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**

**FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PLATAFORMA  
MICROFLUÍDICA CON MEMBRANA DEFORMABLE  
MICROESTRUCTURADA DE POLIDIMETILSILOXANO (PDMS)**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES**

**PRESENTA**

**FERNANDA LÓPEZ GARCÍA**

**Tutor Principal**

Dr. Mathieu Christian Anne Hautefeuille  
Facultad de Ciencias

**Comité tutor**

Dr. Francisco Manuel Sánchez Arévalo  
Instituto de investigaciones en Materiales

Dr. Víctor Manuel Velázquez Aguilar  
Facultad de Ciencias

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Julio 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.





*“She quietly expected great things to happen to her,  
and no doubt that’s one of the reasons why they did.”*  
— Zelda Fitzgerald



*A Gabriel, Susana y Gabby.*



# Agradecimientos

Agradezco antes que nada a mis papás por todo el apoyo en este camino, por estar a la distancia, por las palabras de aliento y por todo el amor. Los amo. A mi hermana por las pláticas profundas y las pláticas sin sentido mientras comíamos sushi, por las risas que nunca hicieron falta, los abrazos, por darme ánimos cuando sentía que no podía más. Gracias por enseñarme de paciencia y resiliencia. Gracias por cuidarme y consentirme mientras escribía la tesis. Te quiero millones. A Lupita por preocuparse por mi, por cuidarme y ser la mejor tía. A las roomies por las cenas, las pláticas y las risas infinitas de estos 3 años de miércoles de roomies.

Dolores Manrique por darme la oportunidad de trabajar contigo y enseñarme un montón de cosas nuevas, por las paciencia para explicarme, por las pláticas en el cuarto limpio, por los buenos ratos compartidos pero sobre todo por la hospitalidad desde el momento en que baje del avión. I want to say thank you to Kata and Kayum for adopting me while I was in Toulouse, my time there was amazing because of you, and of course because of Argos. Thank you for all the trips and adventures, for the concerts, the beers and the food we shared, I hope to see you soon. Livia, Ana, Douglas and Arushee thank you for sharing Toulouse with me.

A Mathieu, mi asesor, por creer en mi desde el día 1, por darme chance de ser parte del LaNSBioDyT. Por las oportunidades brindadas en estos 3 años, por el tiempo para escucharme, por la disposición para enseñar, escuchar nuevas ideas y aprender de sus alumnos. A los integrantes de mi comité asesor por las correcciones a este trabajo. Dra. María del Pilar Carreó, Dra. Margarita Rivera, Dra. Celia Sánchez y Dra. Yareli les agradezco por el tiempo dedicado a leer mi tesis, por sus comentarios para que estuviera lo mejor posible. No puedo estar más contenta de tener un jurado conformado por puras mujeres. A Daniela Margarito y Felix Cerón por la ayuda con los moldes para fabricar mis chips. A Yasab Ruiz por las pláticas sobre el proyecto, por los tips y el apoyo brindado durante el proyecto. A todos los chicos del LaNSBioDyT por los consejos, por dejarme pensar en voz alta mientras intentaba solucionar un problema. Por los buenos ratos y el tiempo compartido en el laboratorio, son un equipo increíble.

Agradezco por el apoyo económico brindado durante mis estudios de maestría al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al proyecto PAPIIT IT102017.



# Resumen

En este trabajo, se diseñaron dos dispositivos microfluídicos con membranas de PDMS microestructuradas con el objetivo de ejercer estímulos mecánicos sobre cultivos celulares. Mediante la réplica de las microestructuras de DVD se creó un patrón de líneas periódicas que permite la difracción de luz blanca. Es posible observar la difracción de la luz en la superficie de las membranas. Al someter las membranas de los chips a un cambio de presión utilizando una bomba microfluídica se observa un cambio en el tamaño y forma del patrón difracción.

Se probó un método de fabricación para cada diseño propuesto para estandarizar los procesos y encontrar resultados reproducibles de un chip a otro. El primer método consistió en fabricar la membrana y la base del chip en procesos paralelos, ensamblarlas y finalmente adherir el chip completo en un portaobjetos de vidrio. El segundo método se realizó utilizando un molde que permite la fabricación de la membrana directamente en el cuerpo del chip para luego adherir el chip en un portaobjetos de vidrio.

Al aumentar la presión dentro de la cavidad central del chip se observó que el área del patrón de difracción disminuyó, mientras que al disminuir la presión interna ocurre el efecto contrario en el área del patrón de difracción. Dicho cambio se midió usando una aproximación elíptica con ayuda del programa de análisis de imágenes ImageJ, cada valor de presión se relacionó con un valor del tamaño del patrón de difracción. El cambio en el radio de curvatura de la membrana también fue caracterizado, para esto se utilizaron las imágenes laterales de los chips obtenidas mientras la presión cambiaba dentro de la cavidad central. Se desarrolló un código en MatLab para medir el radio de curvatura utilizando tres puntos de referencia en las imágenes de las membranas, el código también es capaz de calcular la altura del menisco y el ángulo de contacto de cada imagen.

Con los datos obtenidos del análisis de imágenes se generaron gráficas para determinar el comportamiento de las membranas, buscando lograr una correlación entre los valores del radio de curvatura y el tamaño del patrón de difracción para cada valor de presión al que fueron sometidas las membranas. El comportamiento encontrado en los dos casos fue un declive exponencial.





# Summary

In this work, two microfluidic devices with microstructured PDMS membranes were designed to exert mechanical stimuli on cell cultures. A periodic pattern of lines was created by replicating the DVD microstructures, allowing to observe the diffraction of white light on the surface of the membranes. When applying a pressure change on the membranes, using a microfluidic pump, a change in the size and shape of the diffraction pattern is observed.

A manufacturing method was tested for each proposed design to standardize processes and find reproducible results from one chip to another. The first method was to manufacture the membrane and the base of the chip in parallel processes, assemble them and finally adhere the complete chip on a glass slide. The second method was done using a mould that allows the manufacture of the membrane directly on the body of the chip and then adhering the chip on a glass slide. By increasing the pressure inside the central cavity of the chip it was observed that the area of the diffraction pattern decreased, while by decreasing the internal pressure the opposite effect occurs in the area of the diffraction pattern. This change was measured using an elliptical approach with the help of the ImageJ image analysis program. The change in the radius of curvature of the membrane was characterized using the lateral images of the chips obtained as the pressure changed within the central cavity. A code was developed in MatLab to measure the radius of curvature using three reference points in the membrane images, the code is also capable of calculating the height of the meniscus and the contact angle in each image.

Using the data obtained from the image analysis, graphs were generated to determine the behavior of the membranes, seeking to achieve a correlation between the values of the radius of curvature and the size of the diffraction pattern for each pressure value to which the membranes were subjected. The behavior found in the two cases was an exponential decline.



# Índice general

Agradecimientos	VII
Resumen	IX
Summary	XI
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Plataformas microfluídicas . . . . .	1
1.1.1. Dispositivos lab-on-chip . . . . .	2
1.1.2. Dispositivos organ-on-chip . . . . .	3
1.1.3. Generación de estímulos mecánicos sobre cultivos celulares . . . . .	4
1.2. Fabricación de plataformas microfluídicas por litografía suave . . . . .	5
1.2.1. Método Molde-réplica . . . . .	6
1.2.2. Polidimetilsiloxano . . . . .	7
<b>2. Antecedentes</b>	<b>9</b>
2.1. Rejillas de difracción deformables . . . . .	10
2.1.1. Sensor de presión interna . . . . .	11
2.1.2. Monitoreo celular . . . . .	13
2.2. Justificación . . . . .	15
2.3. Objetivos . . . . .	16
2.3.1. Objetivo general . . . . .	16
2.3.2. Objetivos particulares . . . . .	16
<b>3. Fabricación de los dispositivos</b>	<b>17</b>
3.1. Proceso de fabricación por ensamblaje . . . . .	18
3.2. Proceso de fabricación en un paso. . . . .	22
<b>4. Caracterización de los dispositivos</b>	<b>27</b>
4.1. Construcción de la plataforma de trabajo . . . . .	27
4.2. Adquisición de imágenes . . . . .	29
4.2.1. Adquisición de imágenes superiores . . . . .	29
4.2.2. Adquisición de imágenes laterales . . . . .	31
4.3. Inflamamiento de membrana con cambios de presión interna . . . . .	32
4.4. Análisis de imágenes . . . . .	34

---

4.4.1. Análisis de imágenes superiores . . . . .	34
4.4.2. Análisis de imágenes laterales . . . . .	35
<b>5. Resultados y discusión</b>	<b>37</b>
5.1. Cambio en el patrón de difracción de luz blanca . . . . .	41
5.2. Cambio en radio de curvatura de las membranas . . . . .	43
5.3. Análisis de resultados . . . . .	45
<b>6. Conclusiones</b>	<b>49</b>
<b>7. Trabajo a Futuro</b>	<b>51</b>
7.1. Fabricación de chips con membrana de Colágena tipo I . . . . .	51
7.1.1. Colágena tipo I . . . . .	51
7.1.2. Primeras pruebas en chips con membranas de colágena I . . . . .	52
<b>A. Código para análisis de imágenes laterales</b>	<b>53</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>59</b>

# Índice de figuras

1.1.	Sistema de cromatografía de gases en una oblea de silicio de 2 pulgadas fabricada en 1979. . . . .	1
1.2.	Ejemplo de una plataforma Lab-on-chip . . . . .	3
1.3.	Ejemplos de dispositivos organ-on-chip . . . . .	4
1.4.	Ejemplos de estímulos mecánicos que se pueden integrar en plataformas organ-on-chip. . . . .	5
1.5.	Esquema de fabricación por método molde-réplica. . . . .	6
1.6.	Estructura química del polidimetilsiloxano . . . . .	7
1.7.	Válvula de Quake . . . . .	8
2.1.	Funcionamiento de una rejilla de difracción por reflexión. . . . .	9
2.2.	Diseño del dispositivo de prueba . . . . .	11
2.3.	Análisis de elemento finito . . . . .	12
2.4.	Intensidades relativas . . . . .	13
2.5.	Proceso de fabricación de sustratos de PDMS para cultivo celular. . . . .	13
2.6.	Imágenes tomadas en SEM de réplicas de CD en PDMS . . . . .	14
2.7.	Monitoreo del latido de cardiomiocitos en tiempo real. . . . .	15
3.1.	Diseño de molde propuesto para la fabricación de chips microfluídicos. . . . .	17
3.2.	Fabricación de chip microfluídico por proceso de ensamblaje. . . . .	18
3.3.	Chip microfluídico fabricado por ensamblaje . . . . .	22
3.4.	Fabricación de chips microfluídicos en un paso . . . . .	23
3.5.	Chip microfluídico fabricado en un paso . . . . .	25
4.1.	Arreglo experimental para caracterización . . . . .	28
4.2.	Programas de control para caracterización . . . . .	28
4.3.	Diagrama de funcionamiento de chips microfluídicos con membrana inflable. . . . .	29
4.4.	Interfaz gráfica del software Pixelink . . . . .	30
4.5.	Ejemplo de imágenes superiores obtenidas utilizando el microscopio estereoscópico . . . . .	30
4.6.	Interfaz gráfica del software DinoCapture . . . . .	31
4.7.	Ejemplo de imágenes laterales obtenidas utilizando el microscopio USB. . . . .	32
4.8.	Interfaz gráfica del software MAESFLO y panel de edición del código SciTE . . . . .	32
4.9.	Proceso de análisis de imágenes superiores utilizando ImageJ . . . . .	35

4.10. Consideraciones geométricas sobre la membrana para calcular su radio de curvatura y altura(h) del casquete que se forma. . . . .	36
5.1. Gráficas obtenidas del análisis de imágenes superiores del primer set de pruebas	38
5.2. Gráficas obtenidas del análisis de las imágenes laterales del primer set de pruebas . . . . .	39
5.3. Comparación en el cambio del tamaño del spot de difracción en una membrana con fugas y en una membrana sin fugas . . . . .	40
5.4. Comparación del radio de curvatura de una membrana con fugas y una membrana sin fugas . . . . .	41
5.5. Gráficas obtenidas del análisis de imágenes superiores para pruebas de 10 ciclos en 1 chip . . . . .	42
5.6. Gráficas obtenidas del análisis de imágenes superiores para 1 ciclo en 5 chips distintos. . . . .	43
5.7. Gráficas obtenidas del análisis de imágenes laterales para pruebas de 10 ciclos en 1 chip . . . . .	44
5.8. Gráficas obtenidas del análisis de imágenes laterales para 1 ciclo en 5 chips distintos. . . . .	45
5.9. Gráficas de correlación del eje mayor del spot de difracción con el radio de curvatura para 10 ciclos en 1 chip. . . . .	47
5.10. Gráficas de correlación del eje mayor del spot de difracción con el radio de curvatura para 1 ciclo en 5 chips diferentes. . . . .	48
7.1. Estructuración de una fibra de colágena. . . . .	52
7.2. Chip microfluídico con membrana de colágena tipo I . . . . .	52
A.1. Ventana para elegir 3 puntos de la circunferencia de membrana para calcular el radio de curvatura . . . . .	54

# Índice de tablas

1.1. Potenciales aplicaciones de dispositivos microfluídicos. . . . .	2
4.1. Primer set de pruebas con presión positiva . . . . .	33





# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Plataformas microfluídicas

La microfluídica es el área de la mecánica de fluidos encargada de manipular y controlar pequeños volúmenes de fluidos (de  $10^{-9}$  a  $10^{-18}$  litros) en canales que van de los  $10\ \mu\text{m}$  a los  $100\ \mu\text{m}$  en sus dimensiones transversales [1]. Los orígenes de la microfluídica se remontan al crecimiento de la microelectrónica. La insistencia de integrar la mayor cantidad de componentes electrónicos discretos en un cristal de silicio llevó a los investigadores a generar procesos para la miniaturización de dichos componentes. En 1964, Jack Kilby (Texas Instruments) patentó el proceso de fotolitografía que permitió la creación de los primeros circuitos integrados en silicio, además de abrir la puerta a la generación de microcanales y otras estructuras en superficies como el silicio y el vidrio [2, 3].

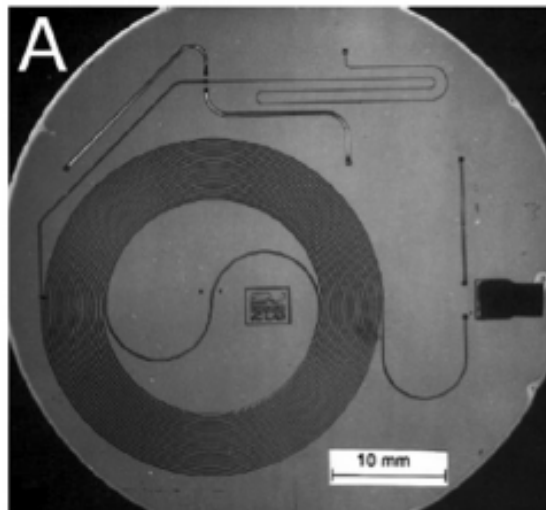


Figura 1.1: Sistema de cromatografía de gases en una oblea de silicio de 2 pulgadas fabricada en 1979 [2].

A finales del siglo XX, los primeros dispositivos microfluídicos comerciales hicieron su aparición: las cabezas de inyección de tinta para impresoras. Mientras que los primeros usos de la microfluídica en la investigación derivaron en el desarrollo y uso de sistema de micro-análisis: cromatografía de gases (figura 1.1), cromatografía líquida de alta presión y electroforesis capilar[1].

Entre las ventajas que presentan las plataformas microfluídicas se encuentran su alta sensibilidad, bajos costos de fabricación y uso, tiempos cortos de prueba y menos uso de espacio en los laboratorios [4]. Debido a la capacidad de implementar diferentes componentes, los nuevos procesos de fabricación que permiten el prototipado rápido y el uso de materiales flexibles, como los polímeros, las aplicaciones de las plataformas microfluídicas se han expandido a diferentes áreas de la ciencia y la tecnología (tabla 1.1). En este trabajo haremos énfasis en las aplicaciones dirigidas a los sistemas biomiméticos: Dispositivos Lab-on-chip y Organ-on-chip.

Tabla 1.1: Potenciales aplicaciones de dispositivos microfluídicos [5].

Área	Aplicación
<b>Sistemas analíticos miniaturizados</b>	
Genómica y proteómica	Secuenciación rápida y de alta densidad, secuenciación de ADN, análisis combinatorio, ensayos de expresión génica, integración de fluidica en arreglos de ADN
Sistemas de defensa en guerras químicas o biológicas	Detección e identificación temprana de patógenos y toxinas, diagnóstico a tiempo
Análisis clínicos	Análisis rápido de sangre y fluidos corporales, dispositivos <i>point of care</i> basados en ensayos inmunológicos o enzimáticos, conteo de células, detección electroquímica
Pruebas ambientales	Análisis <i>in situ</i> de contaminación ambiental
Proyección de alto rendimiento	Química combinatoria y pruebas de fármacos, ensayos toxicológicos.
<b>Dispositivos biomédicos</b>	
Dispositivos implantables	Dispositivos para entrega de fármacos <i>in vivo</i> , monitoreo de enfermedades y síntomas en tiempo real
<b>Herramientas para química y bioquímica</b>	
Síntesis orgánica a baja escala	Química combinatoria
Preparación de muestras	Purificación de muestras biológicas
Amplificación de ácidos nucleicos y secuencias	PCR, RT-PCR
<b>Sistemas para investigación básica</b>	
Sistemas para el estudio del flujo de fluidos	Estudio de flujos electroosmótico y flujo laminar en canales pequeños, estudios de difusión
Estudios de reacciones químicas	Enzima-sustrato
Sistemas biomiméticos	Desarrollo de máquinas que imitan funciones biológicas
Sistemas para estudiar pequeñas cantidades de muestras	Detección de moléculas

### 1.1.1. Dispositivos lab-on-chip

Los dispositivos o plataformas lab-on-chip buscan integrar las funciones de varios instrumentos de laboratorio en un área de algunos centímetros cuadrados (figura 1.2). Entre sus componentes se encuentran las válvulas, bombas, reactores, columnas cromatográficas y sensores. Dichos componentes permiten realizar una serie de procedimientos como el fácil manejo de fluidos, mezclado, filtrado, análisis, detección y separación de diferentes reactivos en un sólo espacio [6, 7].

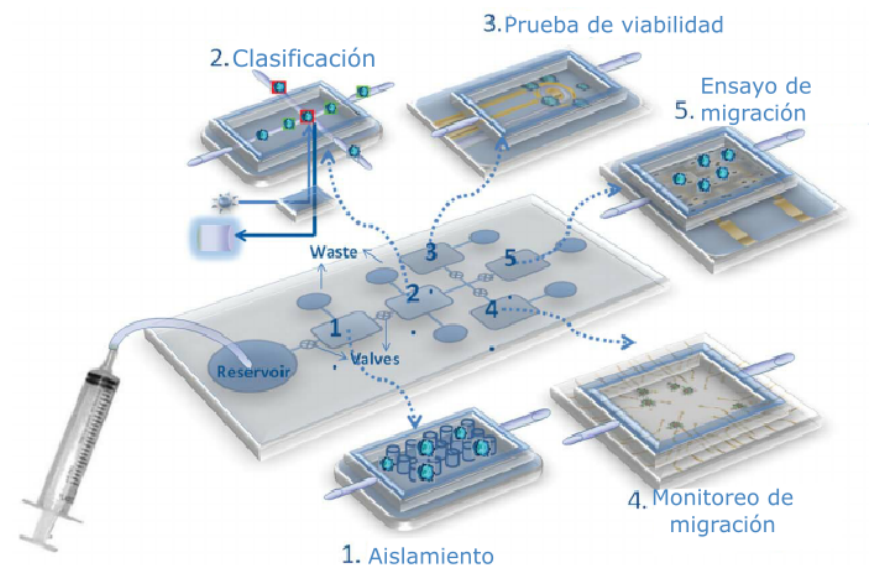


Figura 1.2: Ejemplo de una plataforma modular lab-on-chip para investigación en células madre[8].

Los dispositivos lab-on-chip generalmente son plataformas microfluídicas que presentan entre sus componentes sistemas microelectrónicos. Y sus aplicaciones van desde sistemas point-of-care hasta sensores y análisis de partículas dispersas en el ambiente[9]. Entre algunas de las ventajas de este tipo de dispositivos se encuentran la capacidad de realizar procedimientos en cascada o de forma paralela, la baja contaminación que sufren los reactivos y muestras, la alta resolución en las mediciones, la facilidad para manejarse y por último su posibilidad de fabricación en masa [10].

### 1.1.2. Dispositivos organ-on-chip

Las plataformas o dispositivos orga-on-chip(OOC) están definidas como plataformas microfluídicas con un uso específico, que tienen subestructuras vivas de órganos en un ambiente controlado, que agrupa uno o más aspectos de la dinámica, funcionalidad y respuesta (pato) fisiológica de órganos *in vivo* además de la capacidad de monitoreo en tiempo real [11]. El objetivo final de las plataformas OOC es generar microambientes capaces de imitar ciertas condiciones o estructuras de tejidos u órganos recreando tres aspectos clave de la fisiología humana: a) interfaces vasculares o epiteliales multicelulares, b) la organización dentro de los tejidos de células parénquimas y c) la interacción sistémica entre múltiples órganos [12].

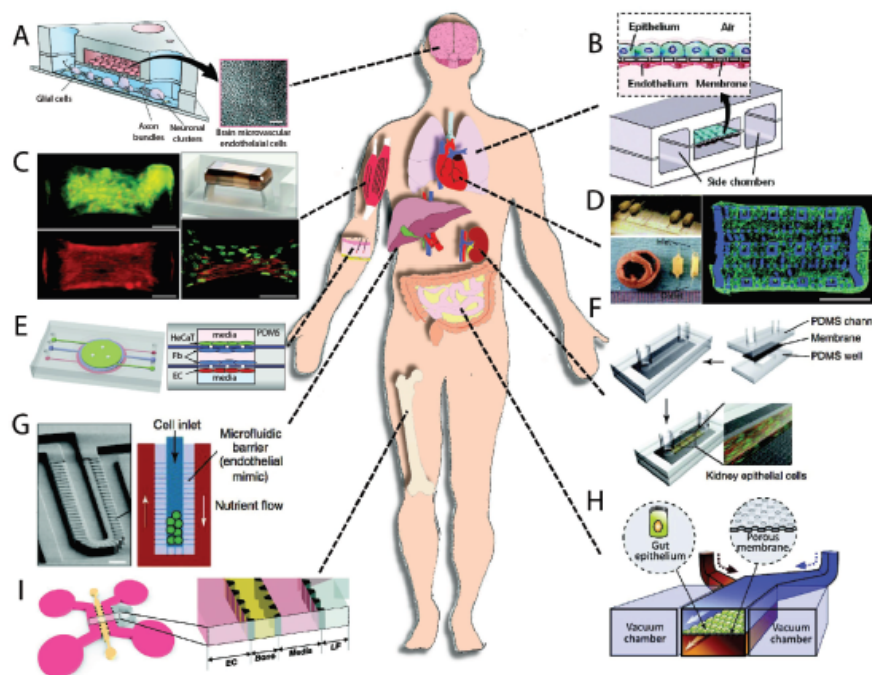


Figura 1.3: Ejemplos de dispositivos organ-on-chip [13].

Uniendo la ciencia de materiales, tecnologías de microfabricación y biología celular se ha logrado tener plataformas que presentan varias ventajas frente a cultivos celulares en plataformas convencionales de mayor tamaño. Algunas de estas ventajas son la flexibilidad de los diseños de las plataformas, flexibilidad y control experimental, la pequeña cantidad de células a utilizar, la posibilidad de usar células aisladas, automatización, acoplamiento entre diferentes sistemas, la posibilidad de hacer cultivos celulares por perfusión y co-cultivos controlados, por último el consumo reducido de reactivos[14].

Aunado a las ventajas mencionadas anteriormente una de las ventajas más importantes de los dispositivos organ-on-chip es la posibilidad de incorporar estímulos mecánicos sobre los cultivos celulares que son fisiológicamente relevantes como esfuerzos cortantes debidos al flujo de líquidos, tensiones cíclicas y compresiones mecánicas, entre otros[15]. La importancia de esto radica en que los esfuerzos mecánicos alteran las propiedades funcionales y estructurales de las células a niveles moleculares y genéticos. Las respuestas celulares a esfuerzos mecánicos involucran una interacción entre elementos estructurales y segundos mensajeros bioquímicos[16].

### 1.1.3. Generación de estímulos mecánicos sobre cultivos celulares

En los sistemas *in vivo* las células se encuentran expuestas a diferentes estímulos mecánicos como el latido del corazón, los movimientos peristálticos de los intestinos, la expansión y compresión en los pulmones, los flujos en el sistema vascular, la compresión de los huesos, entre otros. Dichos esfuerzos mecánicos tienen un papel importante en la proliferación, mi-

gración, fenotipo y diferenciación de las células.

En sistemas de cultivo tradicionales es difícil imitar los estímulos mecánicos a los que las células se encuentran expuestas en sistemas vivos debido a la complejidad presente en crear y monitorear sistemas dinámicos e ignorar la influencia de los estímulos mecánicos sobre las células puede derivar en resultados poco concluyentes o engañosos [17]. Sin embargo, los sistemas organ-on-chip logran generar diferentes estímulos mecánicos sobre los cultivos celulares; en general, los tipos de estímulos se dividen en (figura 1.4): esfuerzos cortantes, compresión y compresión/ extensión [18].

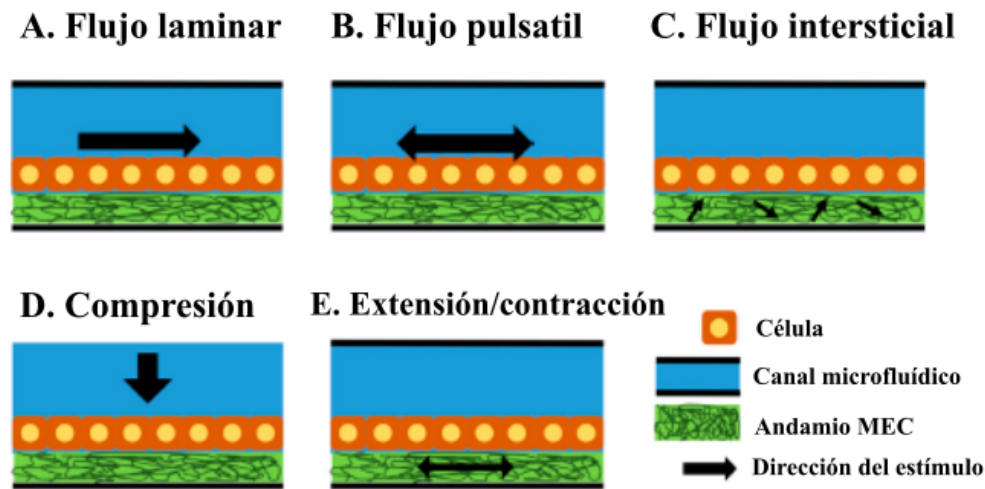


Figura 1.4: Ejemplos de estímulos mecánicos que se pueden integrar en plataformas organ-on-chip: flujos A) laminares y B) pulsátiles en los canales microfluídicos, C) flujos intersticiales en la matriz extracelular y D) compresión, E) extensión y contracción del sustrato [19].

## 1.2. Fabricación de plataformas microfluídicas por litografía suave

La litografía suave es un conjunto de métodos de fabricación que permite la creación de plataformas microfluídicas con características específicas; generalmente se utilizan materiales elastoméricos como el polidimetilsiloxano[20]. Las técnicas de litografía suave son de bajo costo, son sencillas de realizar, se pueden usar para fabricar sustratos planos o con curvaturas y no necesitan controles rigurosos del ambiente en el que son utilizadas[21]. El principio básico de la litografía suave es la réplica de un sello o molde microestructurado que tiene el diseño inverso a la estructura final deseada[22].

Entre las técnicas de fabricación por litografía suave se encuentran las siguientes [23]:

- Molde-réplica
- Impresión por microcontacto

- Moldeo por microtransferencia
- Micromoldeo en capilares
- Micromoldeo asistido por solventes

En este proyecto se utilizó el método molde-replica para la fabricación de los chips microfluídicos, es por esto que es el único método que se explicará a detalle.

### 1.2.1. Método Molde-réplica

El método molde-réplica es la técnica más sencilla para generar microestructuras y consiste en recrear las estructuras que se encuentran en molde maestro, que generalmente es un material acrílico como polimetilmetacrilato (PMMA). En concreto este método consiste en el vaciado de un material elastomérico en el molde maestro. Debido a que estos materiales antes de ser polimerizados se encuentran en forma líquida pueden llegar a llenar todos los espacios del molde. Una vez que el material se vació en el molde se polimeriza con ayuda de un aumento de temperatura y finalmente es posible retirarlo del molde maestro gracias a su flexibilidad.

En la figura 1.5 se presenta un esquema simplificado del proceso de fabricación por el método molde-réplica. Es importante notar que las estructuras que se encuentran en el molde maestro serán replicadas de manera inversa en el polímero utilizado, es decir, si en el molde maestro se encuentran postes en el resultado final serán pozos, en caso de que en el molde maestro haya un pozo en la réplica será un poste.

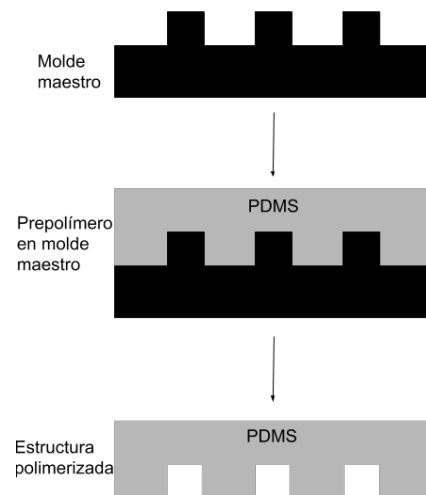


Figura 1.5: Esquema de fabricación por el método molde-réplica. Imagen adaptada de [24].

### 1.2.2. Polidimetilsiloxano

El polidimetilsiloxano (PDMS) es un polímero orgánico perteneciente al grupo de las siliconas. Su estructura básica está formada por cadenas de oxígeno, carbono, hidrógeno y silicio (figura 1.6). Las propiedades elastoméricas del material en bulto se encuentran ligadas al peso molecular que está definido por la cantidad de veces que el monómero ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}$ ) se repite [25].

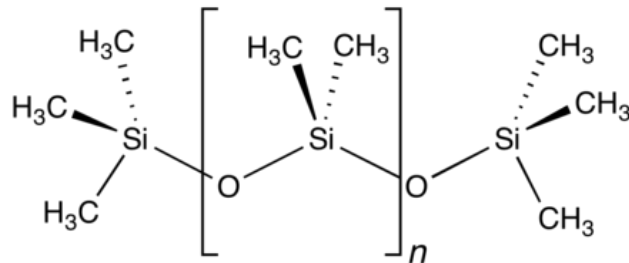


Figura 1.6: Estructura química del polidimetilsiloxano. Imagen obtenida de [26].

Entre sus propiedades se encuentra la estabilidad térmica, ser químicamente inerte, permeabilidad a diferentes gases, transparencia, biocompatibilidad y no toxicidad, además de su facilidad para manipularse y moldearse [27]. Debido a estas características es ampliamente usado en el área de las ciencias biomédicas.

El PDMS es un buen material para la fabricación de plataformas microfluídicas para usar con muestras biológicas por diferentes razones. Como la facilidad para reproducir microestructuras con una alta fidelidad, es ópticamente transparente, las temperaturas de polimerización son bajas (de  $25^\circ$  a  $150^\circ$  [28]), es posible realizar cultivos celulares, su superficie puede ser modificada químicamente, entre otras ventajas [5].

Una de las ventajas que presenta el PDMS para la fabricación de plataformas microfluídicas, además de las mencionadas anteriormente, es que puede adherirse de forma irreversible a otros materiales o a él mismo a través de tratamientos de plasma en las superficies que se quieren unir [2]. Debido a su naturaleza elastomérica y su capacidad de deformarse de manera cíclica se desarrollaron los primeros dispositivos con membranas deformables: válvulas de Quake (figura 1.7). Estas plataformas tienen una serie de microcanales sobrepuestos de manera perpendicular y los microcanales se encuentran separados por una membrana de PDMS. Al cambiar la presión en uno de los microcanales la membrana que se encuentra entre ellos dos se deformará obstruyendo o permitiendo el paso de un fluido en el microcanal opuesto [2].



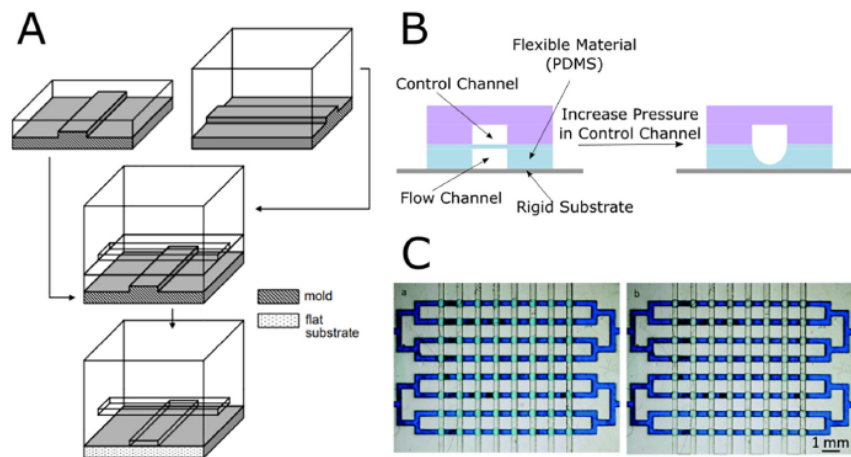


Figura 1.7: Válvula de Quake; A) Proceso de fabricación, B) funcionamiento de la plataforma y C) plataforma con un arreglo de válvulas de Quake[2].

# Capítulo 2

## Antecedentes

Las rejillas de difracción son elementos ópticos con un patrón periódico de rendijas o surcos que dividen un haz de luz en un número limitado de direcciones llamadas órdenes de difracción. La dirección de la luz difractada depende de diferentes variables como la distancia entre surcos o rendijas, el ángulo de incidencia de la luz y su longitud de onda (figura 2.1). En el caso de una luz policromática (como la luz blanca) cada longitud de onda por la que encuentra formado tendrá una dirección de difracción diferente, por lo que será posible observar cada componente del haz de luz. Este comportamiento es resultado de la interferencia constructiva después de interactuar con los surcos y con ella misma y se encuentra descrita por la ecuación 2.1 [29].

$$m\lambda = d \sin \theta; \quad m = 0, \pm 1, \pm 2, \pm 3... \quad (2.1)$$

donde  $m$  es el orden de difracción de la luz difractada,  $\lambda$  es la longitud de onda,  $d$  la separación entre los surcos o rendijas y por último  $\theta$  es el ángulo de difracción.

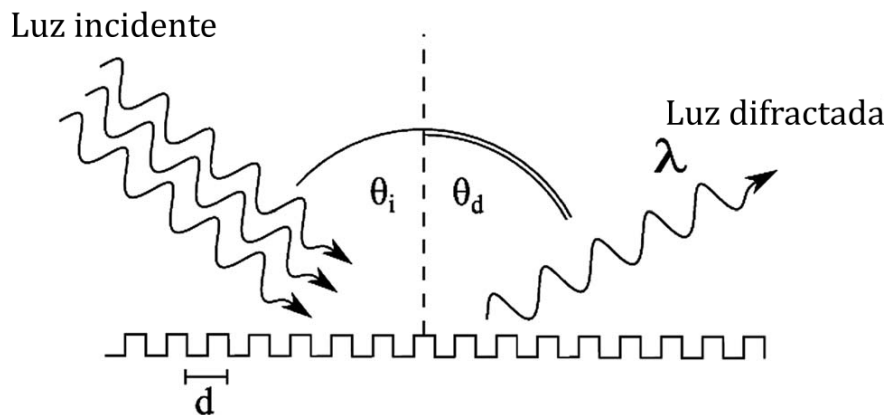


Figura 2.1: Difracción de luz policromática para ser separada en las longitudes de onda que la componen en una rejilla de difracción por reflexión [30].

En los últimos años los procesos de fabricación de rejillas de difracción se han diversificado teniendo en cuenta los tiempos y costos de fabricación, las limitaciones de escala y área

de trabajo y por último las características específicas de las rejillas de difracción para sus diferentes aplicaciones. Teniendo en cuenta el proceso de fabricación las rejillas se pueden clasificar en rejillas grabadas, rejillas holográficas o rejillas litográficas [31]. Entre los procesos de fabricación de rejillas se encuentran [32]:

- **Grabado mecánico:** Como su nombre lo indica se hace un grabado mecánico usando una punta de diamante sobre una superficie, generalmente metálica.
- **Grabado holográfico:** Para este proceso se utiliza un patrón de interferencia generado en la intersección de dos haces de luz coherente que se proyecta sobre una resina fotosensible. Por último se protegen las estructuras colocándolas entre dos sustratos de vidrio.
- **Litografía por haz de electrones (EBL):** Para la fabricación por este método un sustrato cubierto por una capa de cromo y una capa de material fotosensible que es expuesto a un haz de electrones para generar un patrón. Se somete el material a un proceso para eliminar el material que no fue expuesto al haz, el material restante funciona como una máscara al exponer el cromo a un proceso de grabado iónico reactivo. Por último se retira la capa de material fotosensible y se utiliza la capa de cromo como máscara al someter el sustrato a un proceso de grabado profundo.
- **Litografía por inmersión en solventes (SIIL):** Este proceso consiste en la inmersión de un sustrato polimérico en solventes comunes para generar una capa delegada en la interfase entre el polímero y el solvente. El grosor de la capa suave puede ser regulada de acuerdo al tiempo de inmersión del sustrato. Al retirar el sustrato del solvente la capa suave puede ser moldeada usando sellos de Silicio o PDMS.
- **Réplica-molde:** En este proceso se utiliza una rejilla de difracción maestra que servirá para generar varias réplicas. Se cubre el molde maestro con una capa reflectora y por último se vacía una resina que es adherida a un sustrato que permite separar la resina del molde.

El espaciamiento entre los surcos, la cantidad de surcos por milímetro en las rejillas de difracción y el índice de difracción suelen ser parámetros fijos como consecuencia del uso de materiales rígidos como el silicio, vidrio y diferentes metales. Existen trabajos que han explorado la posibilidad de utilizar materiales poliméricos (como el PDMS) para la fabricación de rejillas de difracción deformables o flexibles.

## 2.1. Rejillas de difracción deformables

Las rejillas de difracción deformables o flexibles son estructuras ópticas responsivas, es decir, responden a diferentes estímulos externos. Este tipo de rejillas de difracción son capaces de sensar perturbaciones mecánicas como deformaciones, oscilaciones y vibraciones [32].

En los trabajos donde se explora la fabricación de rejillas de difracción deformables se han inclinado por el uso del método réplica-molde utilizando materiales poliméricos como

se explicó en el capítulo anterior. Entre algunos de los ejemplos de aplicaciones para rejillas de difracción deformables se encuentran: el monitoreo del latido de cardiomiocitos [30], el monitoreo de presiones locales en dispositivos microfluídicos [33, 34], monitoreo de cambios de temperatura[35], modulación del índice de refracción [36], biosensores [37], entre otros ejemplos.

En este trabajo nos enfocaremos en el dispositivo dirigido al sensado de presiones internas en un sistema microfluídico y al dispositivo que se dirige al monitoreo celular de una manera no invasiva.

### 2.1.1. Sensor de presión interna

Hosokawa, K., Hanada, K., & Maeda, R.(2001) crearon una plataforma microfluídica con una rejilla de difracción deformable integrada en la búsqueda de sensar la presión interna del sistema teniendo un impacto mínimo sobre el resto de los competentes. En la figura 2.2 se presenta un esquema del diseño de la plataforma microfluídica a caracterizar. Cuenta con un microcanal conitnuo de  $200\mu\text{m}$  de largo por  $20\mu\text{m}$  de alto, dos puertos de entrada y una rejilla de difracción de  $2*2\text{ mm}$ , con surcos de  $2\mu\text{m}$  de alto por  $5\mu\text{m}$  de largo con una separación (d) entre ellos de  $5\mu\text{m}$  conectada al microcanal.

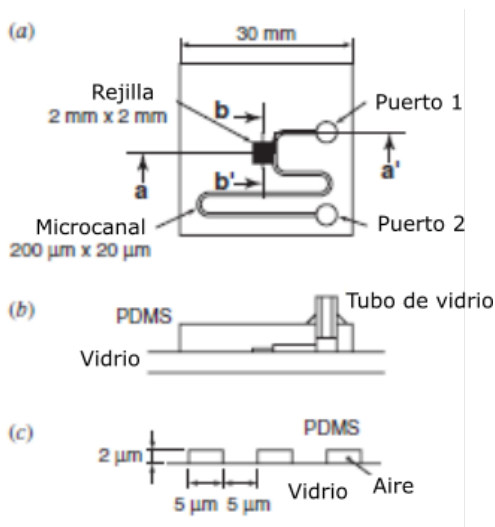


Figura 2.2: Diseño del dispositivo de prueba. a) Vista superior del dispositivo, b)vista lateral y c) acercamiento a la rejilla de difracción[34].

Esta plataforma fue fabricada en PDMS utilizando el método replica-molde y se unió de manera irreversible a una placa de vidrio al exponer ambas superficies a un plasma de oxígeno. En la figura 2.3 se presenta el análisis de elemento finito (FEM, por sus siglas en inglés) para conocer el desplazamiento de los surcos al ser sometidos a un rango de presiones que van desde los  $-100\text{ kPa}$  a los  $100\text{ kPa}$ . Como se puede observar hay un comportamiento lineal en el desplazamiento en  $y$  de los surcos. Esto indica que al haber un cambio en el desplazamiento en el surco la luz incidente debería cambiar el camino óptico que sigue.

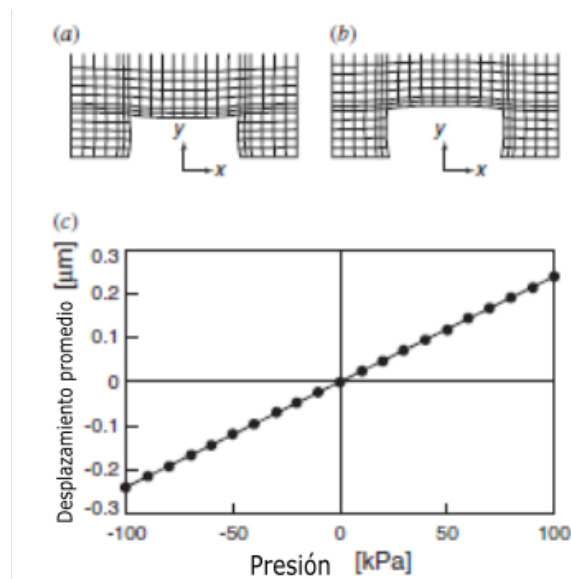


Figura 2.3: Análisis de elemento finito para un surco de PDMS de  $2 \times 5 \mu\text{m}$  a) presiones negativas y b) presiones positivas, c) desplazamiento promedio en el eje  $y$  de los surcos vs presión aplicada[34].

Para conocer si el dispositivo podría funcionar como un sensor de presiones y corroborar que el camino óptico de la luz cambia con el desplazamiento de los surcos se conectaron bombas de presión en ambos puertos para generar presiones positivas. Para el caso de las presiones negativas los puertos fueron conectados a bombas de vacío. Se obtuvieron imágenes de la rejilla de difracción en la cual se hizo incidir un haz de luz con longitud de onda de 635 nm. Se graficó la intensidad relativa de la luz del orden 0 y el primer orden de difracción en función de los valores de presión. En la figura 2.4a) se presentan los valores experimentales obtenidos y los valores calculados para cada orden de difracción, podemos ver que los valores experimentales siguen el mismo comportamiento que los valores calculados, los autores comentan que las diferencias se pueden deber a imperfecciones en el proceso de fabricación o a la aproximación rectangular que se hizo sobre el desplazamiento de los surcos al ser sometidos a diferentes presiones.

Para conocer el cambio cromático producido por la deformación en la rejilla se tomaron imágenes en video cuando la rejilla fue iluminada con una fuente de luz blanca. Se separaron los canales rojo, verde y azul de las imágenes y se calculó la intensidad relativa de cada imagen en cada valor de presión. En la figura 2.4b) se presentan los resultados obtenidos de esta prueba, podemos ver que los cambios más grandes se ven en los canales azul y rojo, mientras que el canal verde se mantiene dentro de los mismos valores en todas las presiones. Las líneas de error en esta gráfica representan la desviación estándar de los valores de intensidad de cada píxel en la imagen.

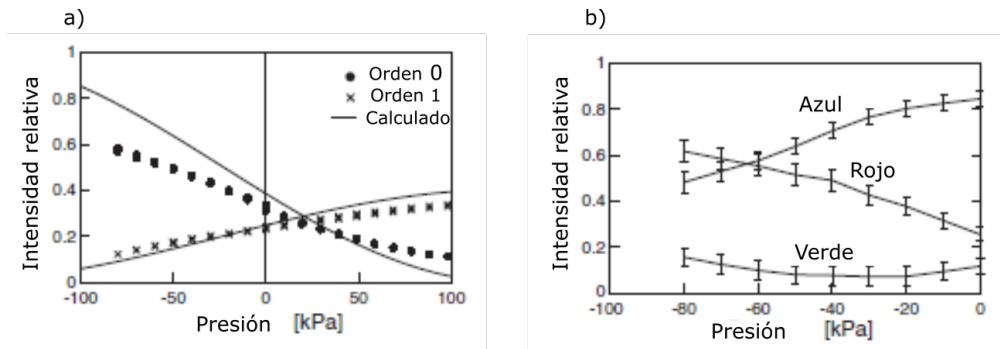


Figura 2.4: a) Intensidades relativas del orden 0 y el orden 1 vs presión. b) Cambio cromático en la intensidad relativa al aplicar cambios de presión negativa[34].

Al ver este trabajo sabemos que es posible tener un sensor óptico de presiones internas en un dispositivo microfluídico. La rejilla de difracción deformable responderá a cambios de presión positivos y negativos. Es posible tener una cuantificación del cambio de la intensidad en luz monocromática y en luz policromática. Al realizar una adhesión irreversible entre el PDMS y el vidrio se evitan fugas dentro de la plataforma.

### 2.1.2. Monitoreo celular

Gibbons, A., et al. (2017) propusieron el uso de una réplica de un disco compacto (CD) en PDMS para monitorear el ritmo del latido de un cultivo celular de cardiomiocitos. Para la fabricación de las rejillas de difracción se llevo a cabo mediante el proceso réplica-molde. En la figura 2.5 se presenta un resumen visual del proceso de fabricación, se removió la etiqueta del CD y se recortó el CD para tener un molde maestro, se colocó sobre PDMS sin polimerizar y se llevó al horno a 75°C por 24 horas. Se fabricaron muestras con 6 diferentes proporciones de base y agente curante. En el último recuadro se puede observar la réplica del CD en PDMS y un poco de la difracción de luz blanca en su superficie.

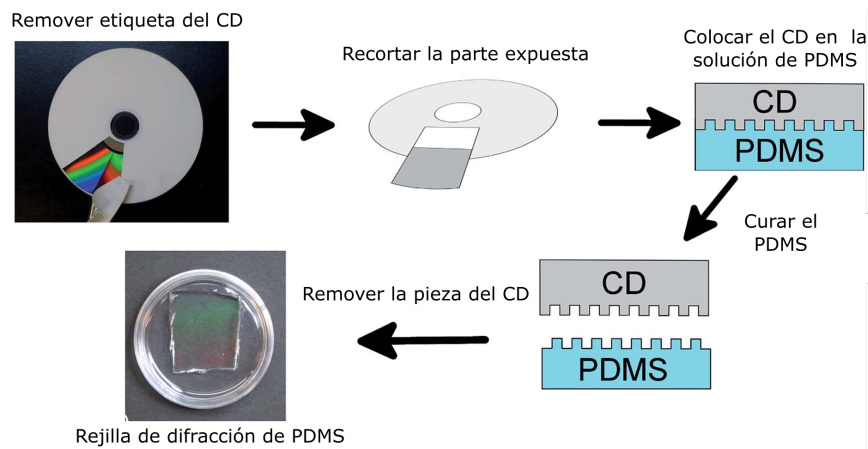


Figura 2.5: Proceso de fabricación de sustratos de PDMS microestructurado para cultivo de cardiomiocitos[30].

Para corroborar que se había logrado la réplica de los surcos en el CD se obtuvieron imágenes del perfil de los sustratos de diferentes proporciones en AFM y se obtuvieron imágenes en SEM. En la figura 2.6a) y c) se observan las imágenes de SEM para una réplica en PDMS con proporción 10:1 de base:agente curante y 35:1 de base:agente curante, en la figura 2.6b) y d) se presenta el CD que se utilizó como molde. Podemos ver que la estructura presentada en el PDMS 10:1 es más cercana a la estructura original y que, la estructura en el sustrato 35:1 la estructura se replicó pero es posible ver algunas imperfecciones en los surcos. La diferencia en las proporciones de base y agente curante hace que el PDMS tenga una rigidez diferente y por lo tanto su capacidad para replicar estructuras también es diferente. En este trabajo los autores decidieron usar un sustrato suave (proporción 40:1 base:agente curante) para realizar el cultivo celular y realizar las pruebas con luz.

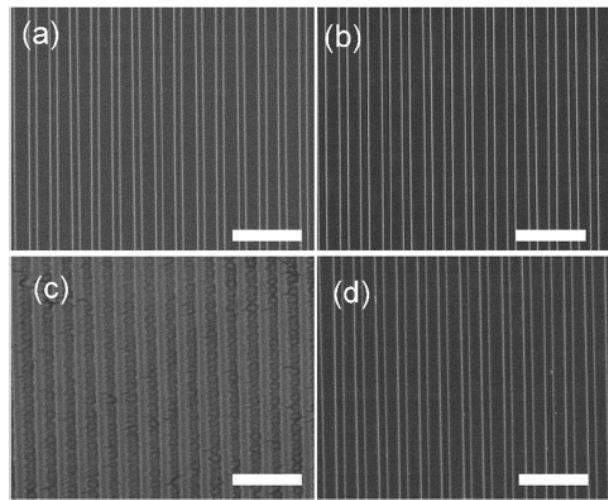


Figura 2.6: Imagen tomada en SEM de a) réplica de surcos de un CD en PDMS en una proporción 10:1 de agente:base curante, b) surcos del CD utilizado para generar los surcos en PDMS 10:1, c) réplica de surcos de CD en PDMS con una proporción 35:1 de agente:base curante y d) surcos del CD utilizado como molde. La barra de escala en todas las imágenes es de  $5\mu\text{m}$  [30].

En la figura 2.7a) se presenta un diagrama del movimiento que se espera observar de los cardiomiocitos sobre el sustrato de PDMS microestructurado. Para lograr observar el latido de los cardiomiocitos se sembraron sobre PDMS 40:1 y se colocó una fuente de luz blanca. Los cardiomiocitos se observaron en un microscopio estereoscópico y se grabó su evolución, se observaron en tres condiciones diferentes: sin agregar epinefrina, los primeros 15 segundos después de agregar epinefrina y 35 segundos después de la adición de epinefrina. En la figura 2.7c) se presentan el cambio en la intensidad relativa de la luz en el tiempo. Para obtener los valores de intensidad de las imágenes de los videos obtenidos se extrajeron los frames de cada video y utilizando el programa image J se hizo un promedio de la intensidad promedio de los pixeles ( $L$ ) en los canales azul, rojo y verde utilizando la ecuación:

$$L = \frac{\sum_{\text{pixeles}}(r + g + b)}{3N}$$

donde  $r, g$  y  $b$  son valores de intensidad de cada pixel en cada canal respectivo, para la suma es consideranda en todos los pixeles relevantes de la imagen ( $N$ ).

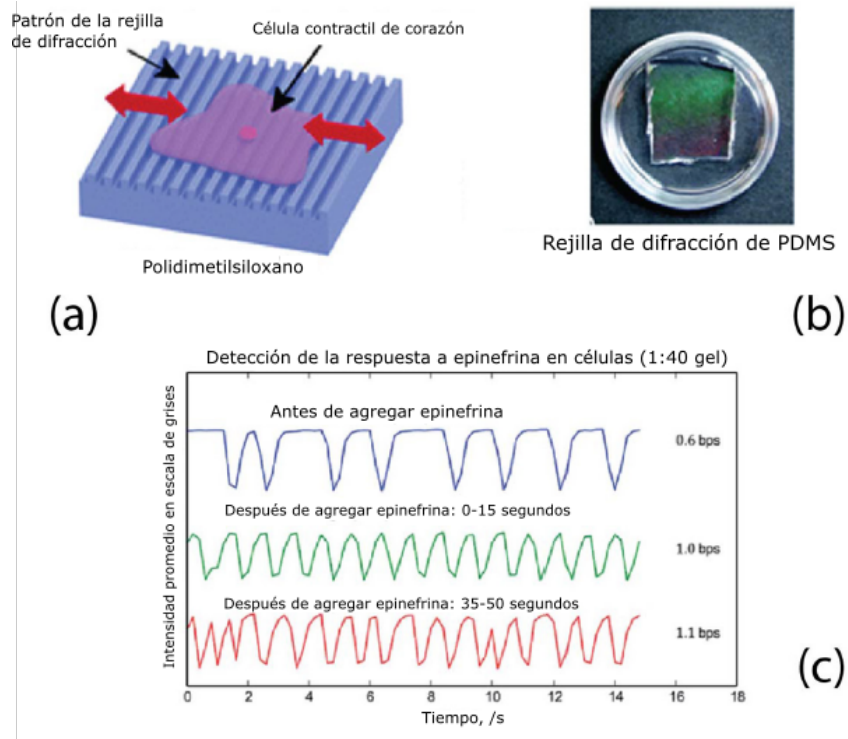


Figura 2.7: a)Presentación esquemática de una rejilla de difracción de PDMS cubierta con cardiomiocitos, b)imagen de la rejilla de difracción de PDMS donde se alcanza a observar la difracción de luz blanca en su superficie y c) latido de cardiomiocitos antes(en azul) y después (en verde y rojo) de agregar epinefrina [32].

Este trabajo se enfoca en cambiar el patrón de difracción localmente en un sustrato de PDMS para observar cambios pequeños en el movimiento de las células. Estos cambios se logran cuantificar al observar el cambio en la intensidad de la difracción de luz blanca que se hace incidir en una superficie de PDMS microestructurada con la ayuda de un CD.

## 2.2. Justificación

En el Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia (LaNS-BioDyT) se desarrollan diferentes proyectos referentes al estudio de los efectos de plataformas de cultivo con rangos de rigidez sobre diferentes líneas celulares. Como se explicó anteriormente los estímulos mecánicos sobre las células tienen un fuerte impacto en diferentes procesos celulares. Aunque se han desarrollado plataformas de cultivo con gradientes de rigidez en el mismo sustrato no había sido posible tener un control directo sobre el cambio de rigidez del sustrato o la forma del mismo.



En este trabajo se propone la fabricación de una plataforma microfluídica que permite la modulación del radio de curvatura de una membrana de polidimetiloxano (PDMS) por cambios de presión interna, además de su caracterización de forma indirecta usando los cambios del patrón de difracción en la superficie de la membrana al ser deformada. El dispositivo microfluídico debe tener un espacio específico para al cultivo celular, ya sea internamente o superficialmente. En caso de que el cultivo celular sea haga dentro del dispositivo es necesario tener una forma de realizar el recambio de medio de cultivo para que las células se encuentren en las condiciones adecuadas. El dispositivo debe ser manipulable y tener medidas que se adapten a los sistemas ópticos de medición con los que se cuenta en el LaNSBioDyT.

## 2.3. Objetivos

### 2.3.1. Objetivo general

Fabricar y caracterizar un dispositivo microfluídico con una membrana microestructurada que se deforma al ser sometida a diferentes presiones internas.

### 2.3.2. Objetivos particulares

- Fabricar membranas con una microestructura periódica capaces de difractar luz blanca en su superficie.
- Incorporar las membranas a un chip microfluídico que permita la variación de presión en su interior para generar una deformación en la membrana.
- Caracterizar los cambios en en el patrón de difracción de luz blanca al propiciar una deflexión de la membrana.
- Correlacionar el cambio en el patrón de difracción de luz blanca con el cambio en el radio de curvatura de las membranas.

# Capítulo 3

## Fabricación de los dispositivos

Para la fabricación del dispositivo microfluídico se probaron dos procesos basados en la técnica *molde-réplica* de la litografía suave, explicado anteriormente. En este capítulo se detallan ambos procesos y las diferencias principales entre los dos procesos.

El diseño del molde para la fabricación del dispositivo microfluídico usado en este trabajo surge de la investigación de Yasab Ruiz Hernández para su tesis de maestría para la fabricación de un chip microfluídico con una membrana de hidrogel [38]. Se generó un diseño en un software de dibujo computarizado para su posterior fabricación por control numérico computarizado (CNC). En la figura 3.1 se presenta el CAD del diseño del molde en PMMA.

El diseño consta de dos microcanales con dos postes en la parte externa y un poste central. Los microcanales miden  $300\ \mu\text{m}$  de ancho por  $300\ \mu\text{m}$  de alto, el poste central tiene una altura de 4 mm y un diámetro de 12 mm y la base del chip mide 37 mm de largo por 21 de ancho por 4 mm de altura. Es importante recalcar que las zonas que en el molde aparecen en sobrerrelieve quedarán como huecos en el dispositivo final, es decir, los postes quedarán como pozos y los microcanales tendrán un espacio para los fluidos.

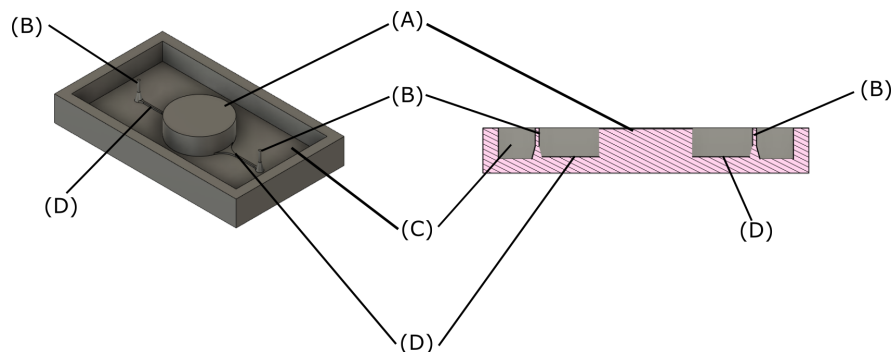


Figura 3.1: CAD del diseño para molde en PMMA de chip microfluídico. Del lado izquierdo se presenta una imagen a 45 grados del molde y del lado derecho se presenta un corte lateral del mismo. Las zonas en rosa representan las partes sólidas del molde y las zonas grises representan las zonas huecas del molde. (A) poste para cavidad central(4mm\*12mm), (B) postes para entradas y salidas del chip, (C) base del chip(21\*37mm), (D) microcanales( $300*300\ \mu\text{m}$ ).

Para la fabricación de estos dispositivos se sugirió hacer una microestructura periódica en la superficie de las membranas que funcione como una rejilla de difracción, esto más adelante permitirá la caracterización del dispositivo. El diseño propuesto permite generar un cambio de presión dentro de la plataforma, estos cambios de presión generaran una deformación en una membrana de PDMS que se verá traducida en una aumento en su radio de curvatura, además al estirarse, habrá un cambio en la distancia entre los surcos generados de la réplica de la estructura de un DVD que finalmente se verán como cambios en el patrón de difracción de luz blanca.

### 3.1. Proceso de fabricación por ensamblaje

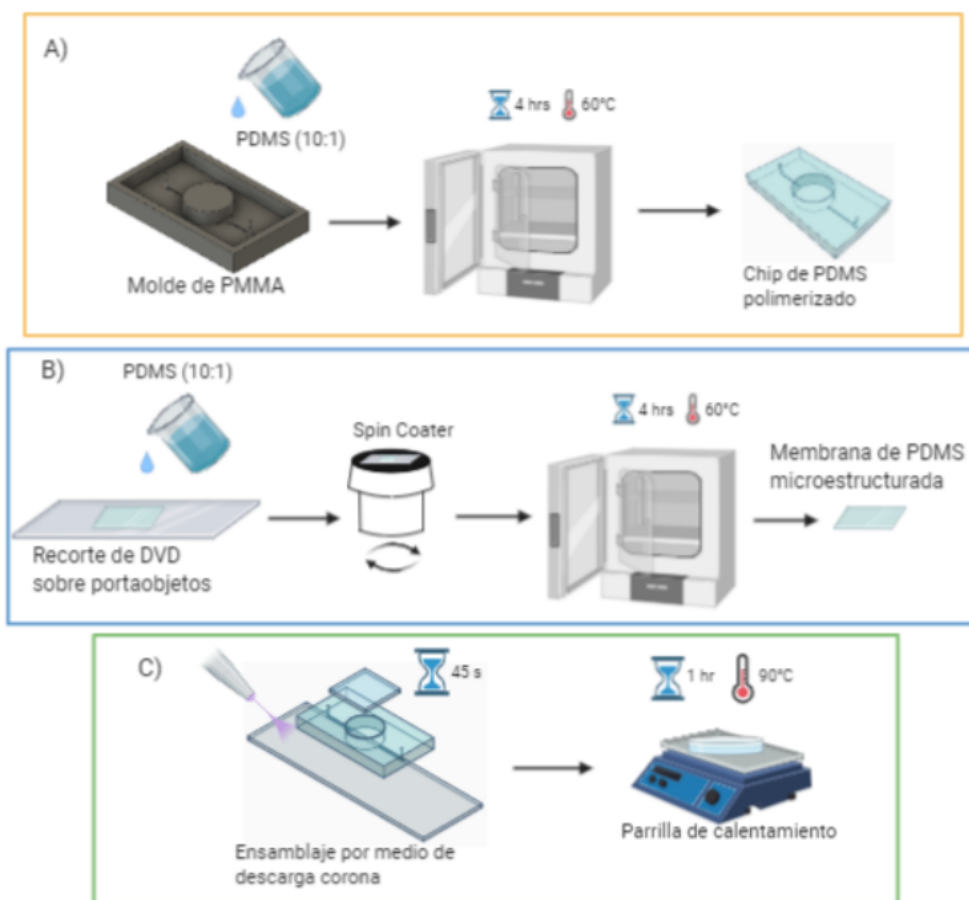


Figura 3.2: Fabricación de chip microfluídico con membrana microestructurada. Se presenta A) el proceso de fabricación de la base del chip microfluídico, B) el proceso de fabricación de la membrana de PDMS microestructurada y C) el proceso de ensamblaje por descarga corona de la base, la membrana y su unión a un portaobjetos de vidrio.

Este proceso consiste en la fabricación de la base del chip y la membrana microestructurada en procesos independientes, después de la polimerización de ambas partes se procede a ensamblarlas utilizando un tratamiento superficial de plasma (descarga corona) y montarse sobre un portaobjetos de vidrio para tener como resultado final un chip microfluídico funcional. Este proceso de fabricación fue probado en el LaNSBioDyT teniendo un proceso de optimización y se ha establecido como un proceso estándar para la fabricación de plataformas microfluídicas con membranas deformables de otros materiales. En la figura 3.2 se presenta un resumen gráfico del proceso de fabricación de los chips microfluídicos por ensamblaje que se explica de manera detallada a continuación.<sup>1</sup>

#### ■ Materiales y equipo:

- |   |                             |
|---|-----------------------------|
| a) 3.3 g de PDMS (10:1 base:agente curante) | g) Alcohol isopropílico     |
| b) Molde de PMMA                            | h) Bisturí                  |
| c) Recorte de DVD                           | i) Pinzas                   |
| d) Portaobjetos                             | j) Spin coater              |
| e) Cinta mágica                             | k) Horno                    |
| f) Navaja                                   | l) Parilla de calentamiento |
|   | m) Bobina Tesla             |

#### ■ Base (fig. 3.2 A)):

1. Limpiar el molde con alcohol isopropílico para remover el polvo o residuos de procesos anteriores.
2. Vertir 3 g de PDMS 10:1 en el molde, cuidando que no quede PDMS sobre el poste central.
3. ★ Asegurarse que no haya burbujas en el PDMS antes de la polimerización sobre todo en o cerca de los canales. Es posible remover las burbujas con la punta de una aguja.
4. Colocar el molde en el horno a 60°C por 4 horas procurando que el molde no se encuentre ladeado.
5. Para retirar la base del molde empezar por separar las orillas insertando el bisturí entre el chip y el molde. Esto permite la entrada de aire entre el chip polimerizado y el molde, después de esto es posible jalar el chip con ayuda de una pinzas.
6. Colocar el chip sobre un portaobjetos cubierto con cinta mágica con los canales hacia arriba y cubrir para evitar la exposición al polvo.

---

<sup>1</sup> Los pasos precedidos por el símbolo ★ son pasos críticos en el proceso para asegurar una fabricación exitosa de los dispositivos microfluídicos.

▪ **Membrana microestructurada (fig.3.2 B)):**

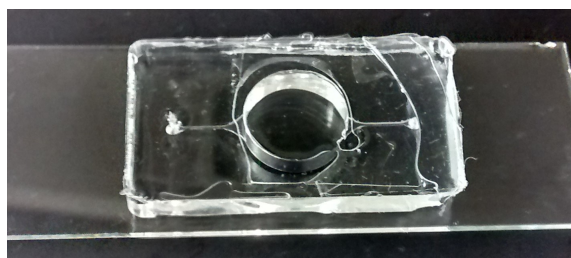
1. Colocar el recorte de DVD sobre un portaobjetos y adherirlo por las orillas con cinta mágica. Es necesario cerciorarse de que la microestructura esté hacia arriba.
2. ★ Para tener una membrana homogénea se deben pesar 0.3 g de PDMS (10:1).
3. Poner el PDMS sobre el recorte de DVD y llevar al spin coater.
4. ★ Introducir los parámetros en el spin coater para realizar dos pasos, de esta manera se obtiene una membrana con un grosor de  $60\mu\text{m}$ .
 

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Paso 1:               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <math>a = 300\text{rpm}/s</math></li> <li>○ <math>\omega = 500\text{rpm}</math></li> <li>○ <math>t = 10s</math></li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Paso 2:               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ <math>a = 300\text{rpm}/s</math></li> <li>○ <math>\omega = 1000\text{rpm}</math></li> <li>○ <math>t = 30s</math></li> </ul> </li> </ul>
--	---
5. Al retirar el portaobjetos del spin coater es necesario colarlo sobre una base lisa para que al introducirlo al horno no quede desestabilizado y así evitar que el PDMS se deslice y por consecuencia que la membrana no sea homogénea.
6. La membrana se debe dejar en el horno a  $60^\circ\text{C}$  durante 4 horas.
- 7.
8. ★ Al retirar la membrana del horno es importante mantener el recorte de DVD que tiene la membrana cubierto para evitar deposición de polvo sobre la misma.
9. Cortar, con ayuda de una navaja, la membrana al tamaño del recorte de DVD (en el spin coater la membrana cubrirá un área mayor) y separar el recorte de DVD del portaobjetos.
10. ★ Colocar el recorte de DVD con la membrana en una placa de Petri con alcohol isopropílico. Esto sirve para evitar que la membrana se enrolle en si misma debido a la estática al retirarla del sustrato.
11. Empezar por separar las esquinas de un mismo lado, usando las pinzas para levantar un poco la membrana, hasta tener un lado separado por completo.
12. Con cuidado de no rayar el recorte de DVD, colocar la navaja entre la membrana y el recorte para después empujar la membrana con la navaja hasta que se separe por completo. La membrana quedara suspendida en el alcohol.
13. ★ Por último colocar la membrana sobre un portaobjetos cubierto con cita mágica y tapparla para evitar que se deposite polvo sobre ella.

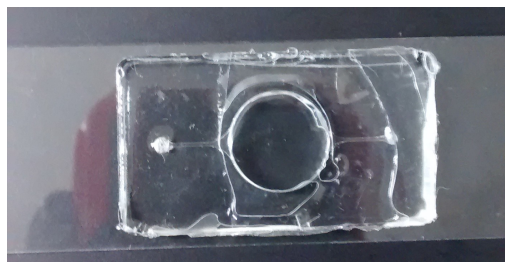
- **Montaje del chip (fig. 3.2C):** Al tener la base y la membrana polimerizadas se puede hacer el montaje final del chip.
  1. ★ Exponer la superficie de un portaobjetos limpio y la superficie de la base del chip con una bobina Tesla para generar un plasma al ionizar el aire que se encuentra en la periferia. Realizar esta exposición durante 45 segundos para activar las superficies de la base del chip y del portaobjetos. Presionar de manera uniforme el chip contra el portaobjetos para retirar cualquier burbuja que haya quedado atrapada entre las superficies.
  2. Alinear el chip con el portaobjetos y unir las dos superficies activadas.
  3. ★ Presionar sobre el chip para que las superficies hagan contacto por completo y evitar que queden burbujas de aire en la interfase.
  4. Una vez que la base se encuentra adherida al portaobjetos, exponer la superficie libre de la membrana y la superficie libre de la base por 45 segundos para activar las superficies.
  5. ★ Alinear la membrana para que abarque por completo el pozo central del chip y unir ambas superficies. Retirar lentamente el portaobjetos de la membrana para evitar que se rompa (el isopropanol que quedó atrapado entre la membrana y la cinta mágica ayuda a que la membrana no se adhiera al portaobjetos y por tanto no se rompa). Presionar con la parte trasera de las pinzas alrededor del pozo central ayudará adherir la membrana a la base del chip y evitar fugas posteriores.
  6. Dejar el chip montado sobre una parrilla a 90° C por 1 hora. Es necesario cubrir el chip para evitar que se deposite el polvo sobre el chip. Este paso es importante ya que asegura la adherencia del chip de PDMS al portaobjetos de vidrio.

En las figuras 3.3b y 3.3a se presenta un de chip microfluídico fabricado usando el proceso de fabricación por ensamblaje montado en un portaobjetos de vidrio. Es posible ver los bordes de la membrana que fue colocada por encima. Como se hace notar el los pasos críticos del procedimiento en caso de que la membrana no llegará a adherirse bien a la base del chip habría fugas, lo mismo sucede con los microcanales si el chip no se adhiriera de manera correcta al portaobjetos de vidrio.

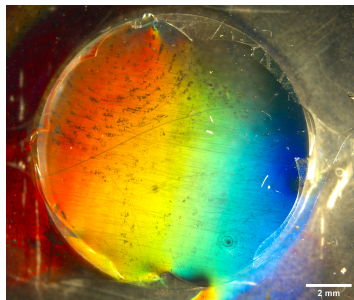
Por último, en la figura 3.3c se presenta la difracción de luz blanca resultante de la réplica de la estructura de DVD en la membrana, esto nos indica que la membrana colocada en el chip puede funcionar como una rejilla de difracción deformable, aunque la difracción va más allá del pozo central la zona de interés es la zona deformable de la membrana, es decir, los 12 mm del diámetro del pozo.



(a) Vista a 45°



(b) Vista superior



(c) Difracción de luz blanca sobre membrana sin presión interna

Figura 3.3: Chip microfluídico fabricado por ensamblaje

### 3.2. Proceso de fabricación en un paso.

Un segundo proceso de fabricación de los dispositivos microfluídicos es sugerido por la necesidad tener un proceso de fabricación que no implique unir dos componentes, ya que, como se explicará más adelante, existen diferentes errores en el momento de la adhesión de la membrana y el chip. Para este proceso de fabricación se realizó un ajuste al molde utilizado que consiste en reducir la altura del poste central del molde para obtener una membrana de  $100\ \mu\text{m}$  al momento de verter el PDMS en el molde de PMMA. Esto nos dará lugar a la fabricación de una membrana integrada en la base del chip microfluídico.

De manera general este proceso de fabricación consiste en fabricar la base del chip y la membrana microestructurada en un solo paso para proceder a hacer el montaje final del dispositivo. En la figura 3.4 se presenta un resumen gráfico del proceso de fabricación de los chips microfluídicos con una membrana microestructurada integrada.<sup>2</sup>

<sup>2</sup> Los pasos precedidos por el símbolo ★ son pasos críticos en el proceso para asegurar una fabricación exitosa de los dispositivos microfluídicos.

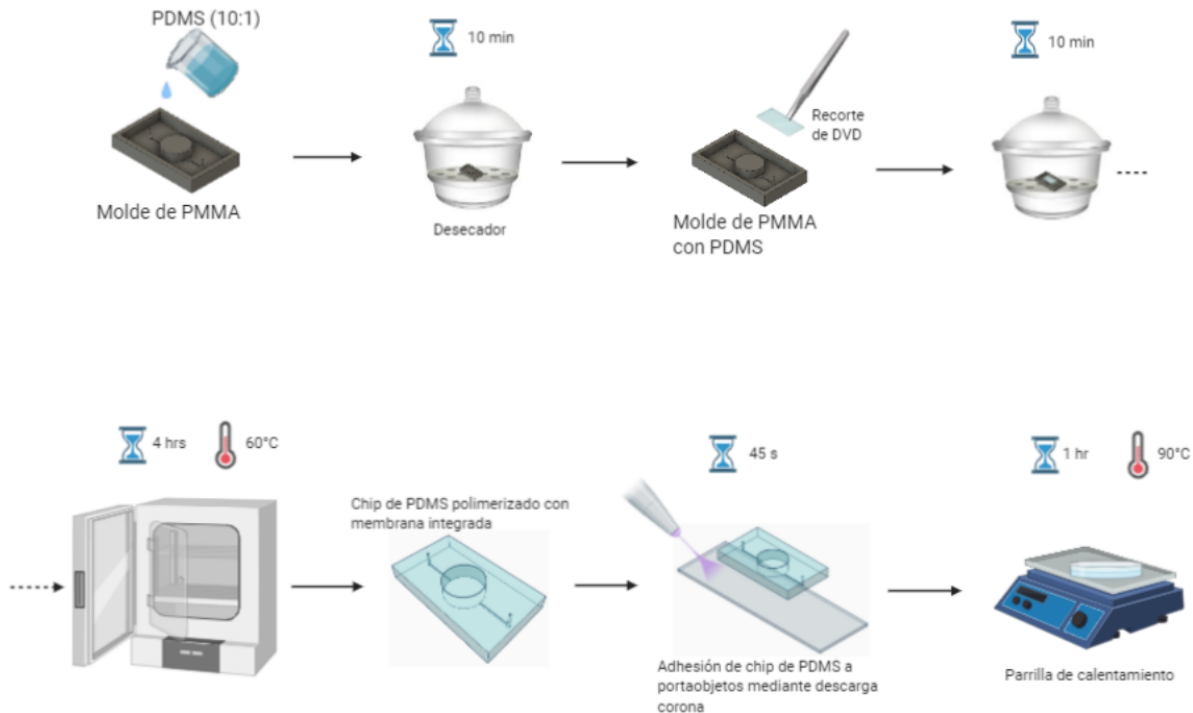


Figura 3.4: Descripción del proceso de fabricación por réplica-molde del chip microfluídico con una membrana de PDMS microestructurada con réplica de un DVD integrada a la base del chip.

#### ■ Materiales y equipo:

- |                     |                         |
|---------------------|-------------------------|
| a) 3 g de PDMS 10:1 | g) Alcohol isopropílico |
| b) Molde de PMMA    | h) Bisturí              |
| c) Recorte de DVD   | i) Pinzas               |
| d) Portaobjetos     | j) Horno                |
| e) Cinta mágica     | k) Parrilla             |
| f) Navaja           | l) Bobina Tesla         |

#### ■ Fabricación del chip:

1. Preparación de 3 g de PDMS 10:1.
2. Verter el PDMS en el molde, asegurando que no queden burbujas.
3. Para remover cualquier burbuja que haya quedado en el molde se debe meter el molde con PDMS en el desecador por 10 min o el tiempo necesario para que no haya burbujas.
4. Colocar el recorte de DVD sobre el poste central, asegurando que la microestructura se encuentra en contacto con el PDMS. No presionar el recorte de DVD contra el poste para evitar que el PDMS que está entre las dos superficies salga.



5. ★ Una vez colocado el recorte de DVD sobre el molde colocar el molde de nuevo en el desecador para retirar el aire que quedó atrapado entre el DVD y la superficie del poste central. Es importante que la zona de la membrana no presente burbujas ya que esto puede provocar fugas en el chip.
6. Colocar el molde en el horno a  $60^\circ$  por 4 horas. Verificando que se encuentre bien colocado para evitar que el recorte de DVD superior se deslice y la microestructura quede desorientada.
7. ★ Para remover el chip del molde primero hay que retirar el DVD. Esto se puede hacer con ayuda de pinzas levantado el molde por una de las orillas evitando pinchar la membrana. Colocar un poco de alcohol isopropílico entre la membrana y el DVD ayuda a que el recorte de DVD se separe más fácilmente y que la membrana no se rompa.
8. Con el bisturí despegar las orillas del chip del molde de PMMA e ir levantando lentamente. Para evitar que la membrana se quede adherida al poste central se puede usar un poco de alcohol isopropílico entre el molde y la base del chip.
9. ★ Colocar el chip en una portaobjetos cubierto con cinta mágica, con los canales hacia arriba, la membrana quedará en contacto con la cinta. El alcohol isopropílico quedará atrapado entre la membrana y la cinta evitando que la membrana se rompa más adelante.

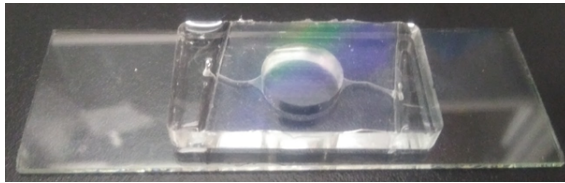
#### ■ Montaje del chip:

1. Exponer la superficie de un portaobjetos limpio y la superficie del chip con la bobina Tesla por 45 segundos para activar las superficies a unir.
2. ★ Alinear el chip y el portaobjetos y unir las dos superficies. Presionar uniformemente sobre el chip para que las superficies sellen por completo.
3. Poner el chip sobre una parrilla a  $90^\circ\text{C}$  por 1 hora. Cubrir el chip para evitar que el polvo se deposite en la superficie. Este paso asegura la adhesión permanente de las dos superficies.

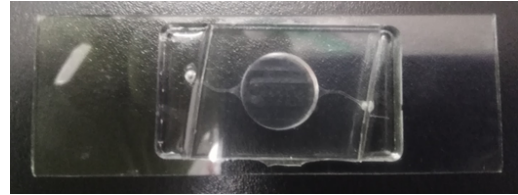
En las figuras 3.5b y 3.5a se presenta un chip microfluídico fabricado por el proceso de fabricación en un paso y montando en un portaobjetos de vidrio listo para su uso. Como es posible ver, cerca de las entradas/salidas del chip hay una deformación, esto se debe a la tensión superficial del PDMS al colocar el recorte de DVD en la parte superior del molde, dichas deformaciones no alteran el funcionamiento del chip porque las entradas y salidas del chip están libres y la altura total del pozo central sigue siendo de 4mm. También es posible observar que la superficie es homogénea y es difícil encontrar fugas en la membrana de este dispositivo.

En la figura 3.5c se presenta la difracción de luz blanca obtenida en la superficie de la membrana microestructurada replicando la estructura de un DVD, por esto es importante asegurarnos que la superficie microestructurada del DVD quede en contacto con el PDMS antes de ser polimerizado, si no fuera así tendríamos una membrana deformable lisa. En

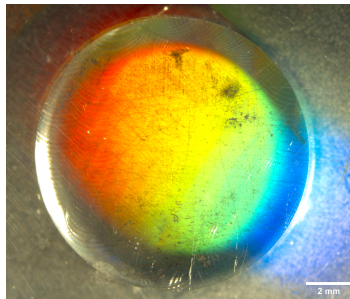
la membrana se ven algunos defectos que se pueden deber a que la superficie replicada presentaba rayones o desgaste, sin embargo la difracción de la luz blanca es posible en este dispositivo.



(a) Vista a 45°



(b) Vista superior



(c) Difracción de luz blanca sobre membrana sin presión interna

Figura 3.5: Chip microfluídico fabricado en un paso

En este capítulo se explicaron los procesos de fabricación de chips microfluídicos con membranas microestructuradas usados en este trabajo. El primer método de fabricación consiste en fabricar la base del chip y la membrana microestructurada por procesos separados y unirlos utilizando descarga corona, para por último montar el chip completo en un portaobjetos de vidrio. El segundo método de fabricación consiste en fabricar la base del chip y la membrana utilizando un solo molde lo que nos evita errores al momento de pegar dos elementos fabricados por separado.



# Capítulo 4

## Caracterización de los dispositivos

### 4.1. Construcción de la plataforma de trabajo

Una vez fabricados los dispositivos mediante los procesos de fabricación presentados en la sección anterior se realizaron diferentes pruebas para su caracterización. Para realizar estas pruebas se construyó un arreglo experimental que permitió obtener imágenes superiores y laterales de los dispositivos de manera simultánea.

Este arreglo experimental tuvo la finalidad de ayudarnos a tener una visión completa de lo que sucedía con el chip al estar sometido a diferentes cambios de presión interna. La necesidad de tener imágenes simultáneas de los dispositivos microfluídicos surge del interés de tener una correlación de datos para generar curvas de calibración, para el uso posterior de los chips. Para lograr curvas de calibración útiles era necesario conocer el radio de curvatura que corresponde a un valor específico del tamaño del spot de difracción y esto a su vez nos permite conocer el valor de presión que está proporcionando la bomba microfluídica, que no necesariamente es la presión interna del sistema. Además, el arreglo experimental se conformó por hardware disponible actualmente en el laboratorio por lo que es accesible para el resto de los integrantes del LaNSBioDyT.

El arreglo experimental (figura 4.1) propuesto consta de un microscopio estereoscópico vertical para la adquisición de las imágenes superiores, un microscopio USB para la adquisición de imágenes laterales, una bomba microfluídica FLUIGENT para generar el cambio de presión dentro del pozo central, una fuente de luz para lograr la difracción de luz blanca sobre las membranas y una computadora para controlar los dispositivos ya mencionados.

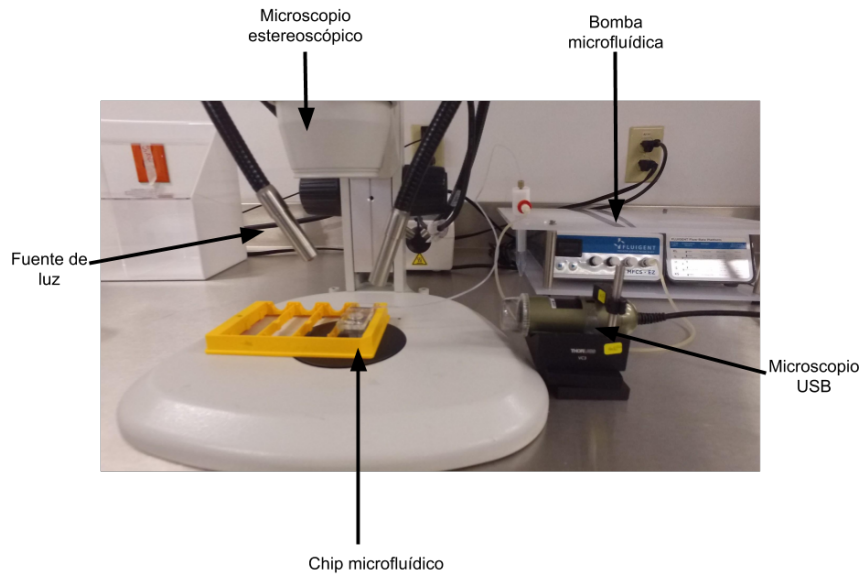


Figura 4.1: Arreglo experimental para caracterización de membranas microfluídicas.

En el arreglo experimental se considera que cada uno de los componentes tiene su propio software; en la figura 4.2 se presenta la visualización de la pantalla para el control de los dispositivos. Para el uso de las bombas microfluídicas se utilizó el software MAESFLO y un editor de código llamado SciTE para la automatización del sistema, para el microscopio estereoscópico se utilizó el software Pixelink y por último para el microscopio USB se utilizó el software DinoCapture. Más adelante en este capítulo se profundizará en el uso de los softwares, su sincronización y sus características.

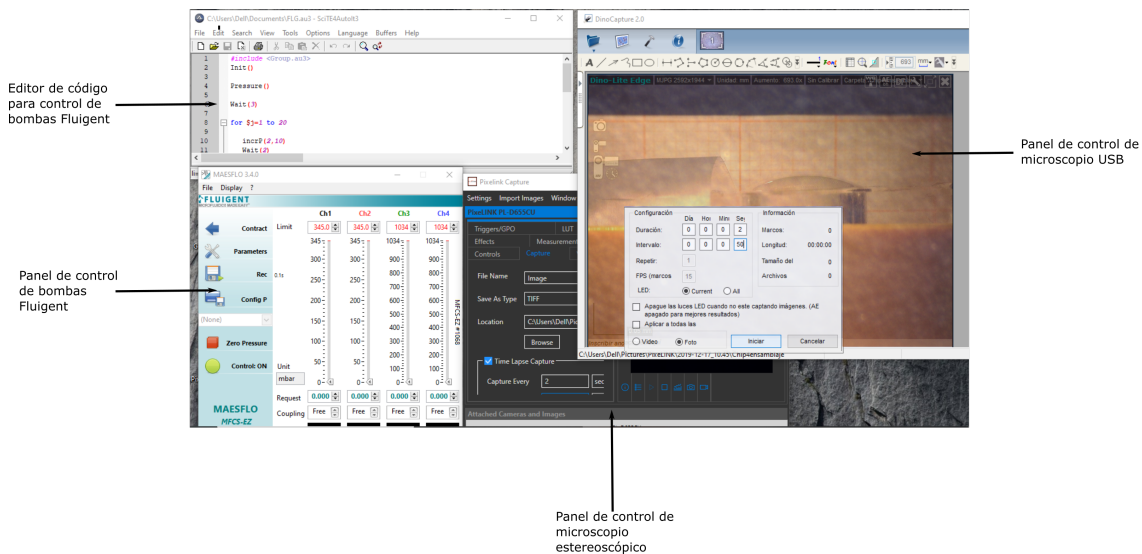


Figura 4.2: Softwares de control para caracterización de plataformas microfluídicas con membrana microestructurada.

En la figura 4.3 se presenta un diagrama del funcionamiento general de los chips microfluídicos, donde se considera que la salida de uno de los microcanales se encuentra conectado a la bomba microfluídica y la otra salida se encuentra sellada para evitar la salida del fluido inyectado y así asegurar el inflamiento de las membranas.

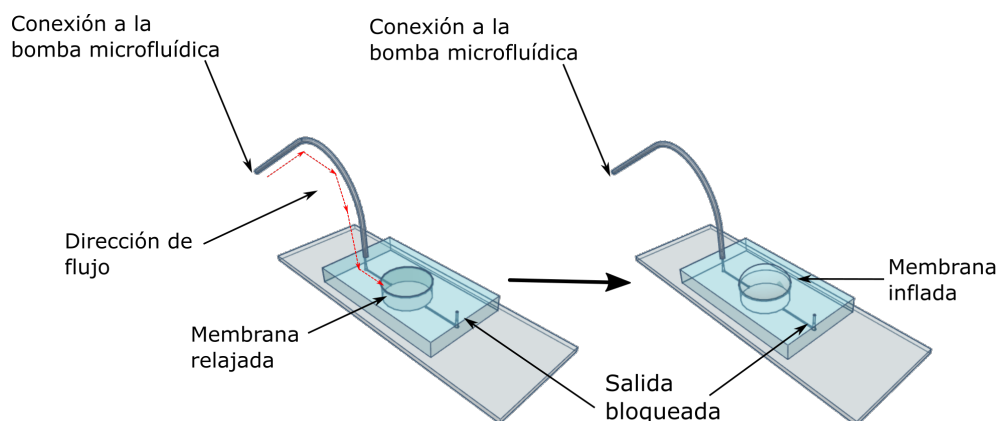


Figura 4.3: Diagrama de funcionamiento de chips microfluídicos con membrana inflable.

## 4.2. Adquisición de imágenes

La adquisición de las imágenes es un proceso crucial en la caracterización del dispositivo porque si no se tienen imágenes de buena calidad o imágenes mal enfocadas el análisis posterior se puede complicar. Para este proyecto se utilizaron imágenes superiores de las membranas al ser iluminadas con una fuente de luz blanca y también se utilizaron imágenes laterales de las membranas para observar el cambio en el radio de curvatura. En esta sección se explicará de forma detallada el proceso de adquisición de las imágenes.

### 4.2.1. Adquisición de imágenes superiores

Para la adquisición de imágenes superiores se utilizó el software Pixelink (figura 4.4) del microscopio estereoscópico Nikon disponible en el laboratorio. Este software permite la adquisición de imágenes individuales, secuencias de imágenes y vídeos. Para este trabajo se utilizó la adquisición de secuencia de imágenes, ya que el programa nos permite establecer el tiempo total durante el que se adquieren fotos y el intervalo de tiempo entre la adquisición de cada una de las imágenes. Esto nos permite la sincronización con el microscopio USB y la bomba microfluídica. Al no tener una forma directa de vincular los dispositivos esta sincronización se hace de manera manual al presionar el botón de inicio en cada uno de los programas a utilizar.

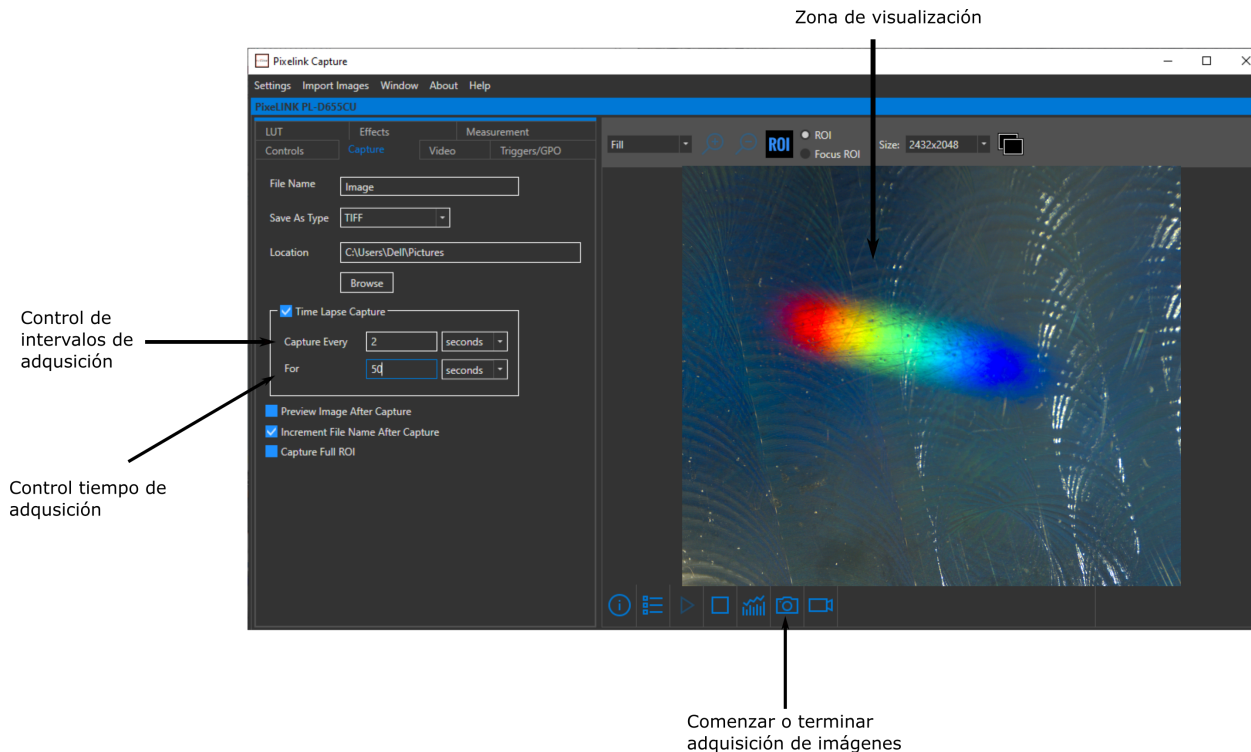


Figura 4.4: Interfaz gráfica del software Pixelink utilizado para la adquisición de imágenes superiores de los chips microfluídicos.

Para poder observar el patrón de difracción de la luz blanca sobre la membranas se ajustó el ángulo al que se hacía incidir la luz blanca sobre cada uno de los dispositivos. El ajuste del ángulo al que se colocó la fuente de luz se debe realizar cada vez que se utiliza un dispositivo nuevo debido a la orientación de la microestructura de la membrana. Es importante que al realizar el ajuste la luz siga el camino óptico de la cámara conectada a la computadora y no de los oculares para poder obtener una vista adecuada del patrón de difracción.

El microscopio se enfocó en la parte superior de la membrana microestructurada al estar relajada, es decir, sin estar sometida a presión interna alguna. En la figura 4.5 se presenta un ejemplo de como se visualiza la membrana en una vista superior en diferentes presiones internas. Durante las pruebas de inflamamiento el enfoque del microscopio se mantiene fijo por lo que al tener una disminución de distancia entre el microscopio y la membrana hay una perdida de enfoque, sin embargo esto no representa un problema al momento de realizar el análisis de imágenes. El aumento en la separación en la separación de los surcos de la microestructura se observa directamente como un cambio en el tamaño del patrón de difracción que se presenta sobre la superficie de la membrana.

Figura 4.5: Ejemplo de imágenes superiores obtenidas utilizando el microscopio estereoscópico; estas imágenes se tomaron con las membranas sometidas a una presión de a) 0 mbar, b) 10 mbar, c) 20 mbar y d) 30 mbar. Imágenes de un chip fabricado por ensamblaje.

### 4.2.2. Adquisición de imágenes laterales

Para la adquisición de las imágenes laterales se colocó el microscopio USB en uno de los lados del chip para poder observar el cambio en el radio de curvatura de la membrana. El software DinoCapture (figura 4.6) permite elegir durante cuanto tiempo se quieren adquirir fotos y el espacio de tiempo que debe esperar el microscopio para capturar la siguiente imagen, con esto fue posible sincronizarlo con el microscopio estereoscópico y la bomba microfluídica.

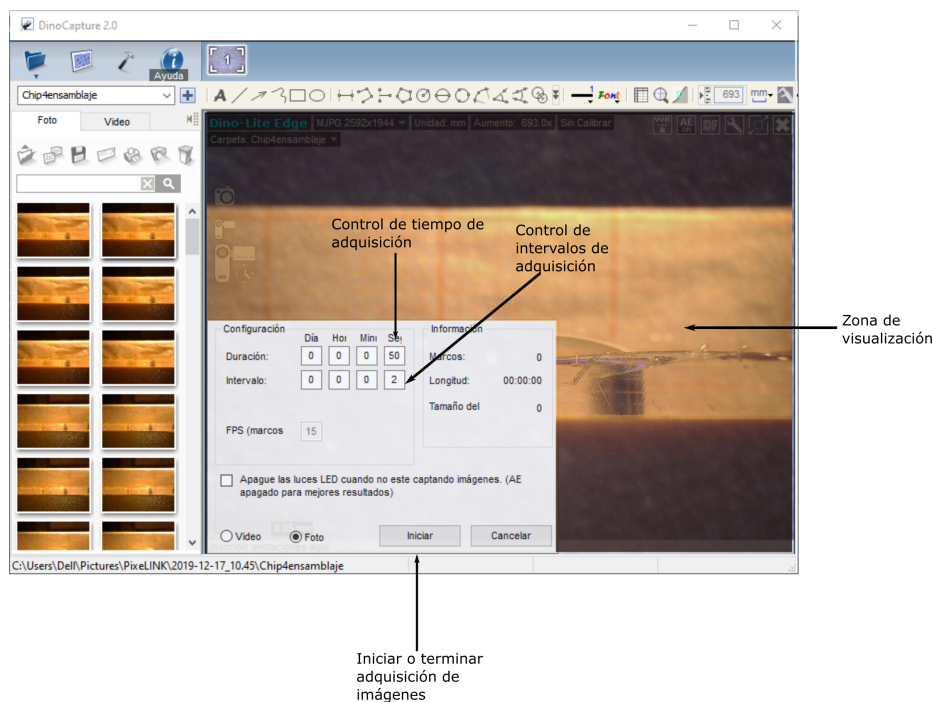


Figura 4.6: Interfaz gráfica del software DinoCapture utilizado para la adquisición de imágenes laterales de los chips microfluídicos.

Para poder observar la membrana con claridad el microscopio se enfocó en la parte superior de la membrana cuando esta se encuentra sometida a una presión en la cual es posible observar el casquete que se forma. Para evitar tener un plano lejano y tener un punto de referencia se colocó una pantalla de papel milimétrico detrás del chip. En la figura 4.7 se presentan algunos ejemplos de las imágenes laterales obtenidas durante los experimentos.



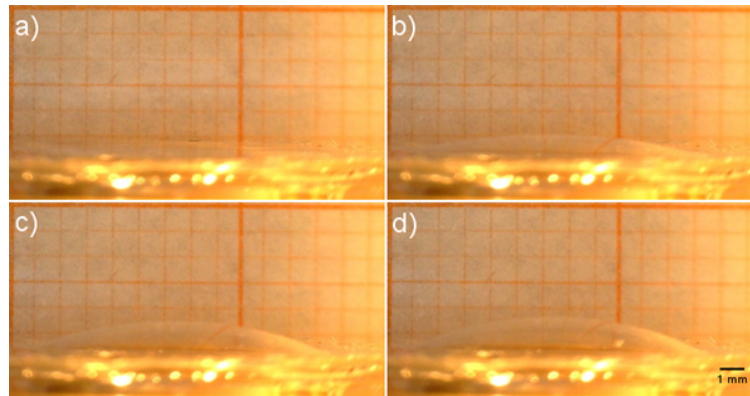


Figura 4.7: Ejemplo de imágenes laterales obtenidas utilizando el microscopio USB; imágenes tomadas cuando la membrana se encontraba sometida a una presión de a) 0 mbar, b) 10 mbar, c) 20 mbar y d) 30 mbar. Imágenes de un chip fabricado por ensamblaje.

### 4.3. Inflamamiento de membrana con cambios de presión interna

Para el control de los cambios de presión dentro de la cámara central de los dispositivos microfluidicos se utilizó una bomba microfluidica FLUIGENT. El software MAESFLO para el control de la bomba incluye una extensión para la automatización de los flujos de presión. Dicha extensión nos permite controlar el durante el que se quiere mantener la presión constante, aumentar y disminuir la presión a valores determinados o en intervalos y realizar funciones de manera cíclica. En la figura 4.8 se presenta la interfaz gráfica del programa de control y del panel para editar los códigos de automatización.

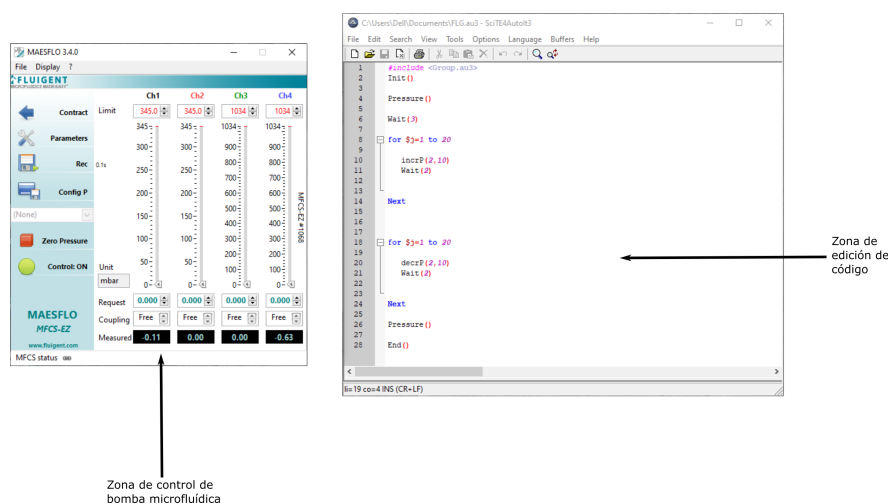


Figura 4.8: Interfaz gráfica del software MAESFLO y panel de edición de código SciTE para el control de presiones dentro de los chips microfluidicos.

En el código de control de la bomba microfluídica se estableció un tiempo de dos segundos entre cada intervalo de aumento de presión por una cantidad determinada de iteraciones. El siguiente paso fue definir el espaciamiento temporal entre cada valor de disminución de presión, este tiempo se eligió para permitir al sistema estabilizarse y tener un espacio de tiempo suficiente para la adquisición de las imágenes. Para obtener las imágenes correspondientes se estableció en la interfaz de las cámaras el tiempo de adquisición entre imágenes en 2 segundos, tiempo suficiente para que las membranas se estabilicen. Con esto podemos asegurar que las imágenes tienen una relación directa con la presión.

Una vez que se logró tener un control sobre el cambio en las presiones internas de manera automatizada y la sincronización con la cámaras (como se explicó al inicio de este capítulo) se realizó un set de cuatro pruebas diferentes; estas pruebas se realizaron con el fin de conocer el comportamiento general del dispositivo al ser sometido a diferentes cambios de presión interna. Las pruebas consistieron en aumentar y disminuir la presión dentro del pozo central de un chip fabricado por ensamblaje. Se utilizaron 4 intervalos de presión diferentes, los intervalos utilizados se presentan en la tabla 4.1. Estos rangos fueron elegidos porque nos permiten tener una visión general del comportamiento de la membrana bajo diferentes presiones, también nos permite conocer cuáles son los valores más pequeños en los que se puede identificar un cambio significativo.

Tabla 4.1: Primer set de pruebas con presión positiva realizadas en dispositivos con membranas microestructuradas.

Intervalos de presión[mbar]	Iteraciones subida	Iteraciones bajada	Presión [mbar]	maxima
10	50	50	500	
20	25	25	500	
50	10	10	500	
100	5	5	500	

Al terminar estas pruebas se decidió fabricar los chips en un sólo paso para evitar fugas en las membranas cuando se encontraban mal colocadas o se pinchaban por accidente con las pinzas. Después de conocer el comportamiento de los dispositivos fabricados por ensamblaje se planearon una serie de pruebas para conocer la reproducibilidad y repetibilidad de los resultados.

Estas pruebas consistieron en realizar 10 ciclos completos de pruebas en un chip. Un ciclo corresponde al aumento de presión dentro del pozo central hasta una presión máxima determinada y disminuir la presión hasta el punto inicial o presión mínima. Aunado a esto se realizó un ciclo de aumento y disminución de presión en 5 chips diferentes. Estos cambios de presión cíclicos se realizaron en chips fabricados por los dos tipos de fabricación. Para realizar estas pruebas la presión máxima a la que se llevaron los chips fue 200 mbar en intervalos de presión de 10 mbar, regresando a una presión mínima de 0 mbar, en intervalos de -10

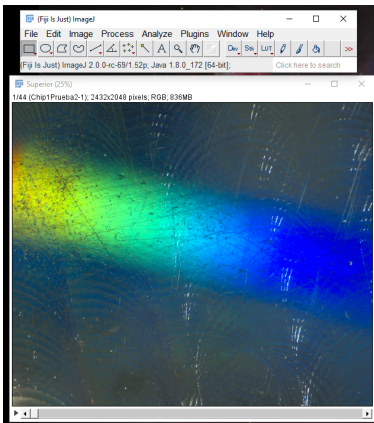
mbar. En el caso de los chips en los que se hicieron los 10 ciclos estos se realizaron de manera consecutiva. Para los chips en los que se realizó solo un ciclo al terminar se desmontaba el chip y se montaba el siguiente chip en la misma posición que el chip anterior.

## 4.4. Análisis de imágenes

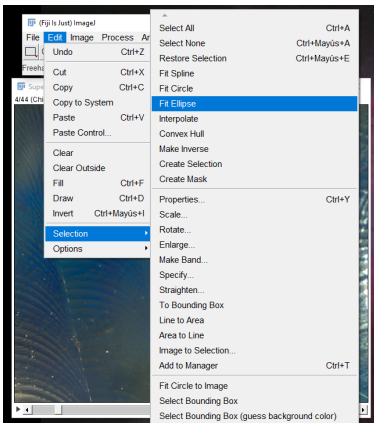
Después de realizar las pruebas de presión en los chips fue necesario hacer una análisis de las imágenes obtenidas. Por cada ciclo realizado en un chip se obtuvo una imagen lateral por valor de presión y una imagen superior por cada valor de presión. Esto nos permitió hacer una correlación directa entre el tamaño del spot de la difracción sobre la membrana y valor de presión al que corresponde. Por otro lado las imágenes laterales nos dan un valor de radio curvatura para cada valor de presión. En esta sección se ahondará en detalle sobre el proceso de análisis de imágenes.

### 4.4.1. Análisis de imágenes superiores

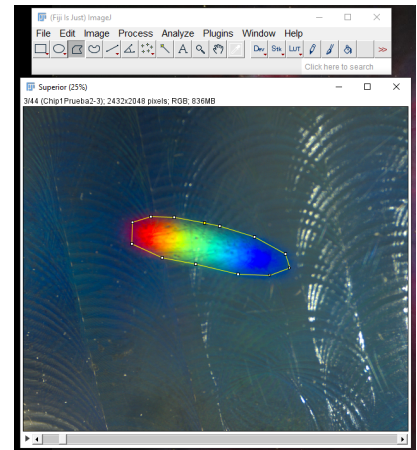
Para el análisis de las imágenes superiores se utilizó el programa libre Image J. Al tener cada una de las imágenes nombradas en orden numérico se abre la serie de imágenes (figura 4.9a) y se introduce la escala utilizada en el microscopio para tener los valores finales en milímetros. Una vez abierto el stack de las imágenes se elige el área correspondiente al spot utilizando la selección poligonal o la selección libre (figura 4.9b). Como se puede ver el área seleccionada no coincide con el área total del spot, por lo que es necesario hacer una aproximación elíptica que el programa tiene entre sus opciones (figura 4.9c), la selección elíptica permite tener un mejor control sobre la selección de los bordes del spot de difracción y evitar que estos bordes sean seleccionados arbitrariamente. Se eligió una aproximación elíptica sobre otras porque se observó que todos los dispositivos el cambio en la difracción sigue el mismo patrón y es una forma de incluir el rango completo de colores. La proyección elíptica del patrón de difracción se debe a que la blanca no incide de manera normal a la superficie de la membrana. Por último al tener la selección elíptica (figura 4.9d) se obtiene el valor del tamaño del diámetro mayor de la elipse.



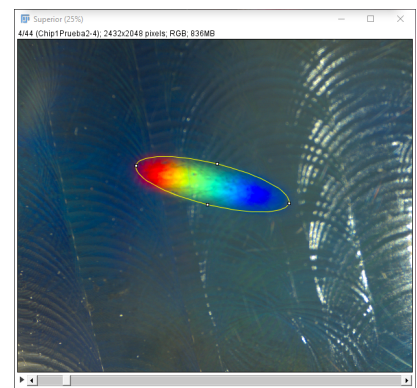
(a) Secuencia de imágenes superiores abierta en el programa Image J



(c) Aproximación elíptica



(b) Selección del spot utilizando la herramienta de selección poligonal



(d) Selección de spot usando la aproximación elíptica

Figura 4.9: Proceso de análisis de imágenes superiores utilizando ImageJ

#### 4.4.2. Análisis de imágenes laterales

Para el proceso de análisis de las imágenes laterales se generó un código de MatLab (Anexo A) que permitió hacer un proceso semi automatizado. Para generar este código se consideró que al ver la membrana de forma lateral se tiene un semicírculo en el plano  $(x,y)$ . Otra suposición hecha para el análisis lateral fue que el pozo central no se expandía al ingresar presión en él. Tomando en cuenta estas consideraciones se realizaron cálculos geométricos para conocer el radio de curvatura de la membrana y la altura del casquete de la membrana. En la figura 4.10 se presenta la forma en que se considera la circunferencia de la membrana, los tres puntos(en verde) de la circunferencia que se toman en cuenta y las mediatrices de las líneas que unen estos tres puntos (en azul).

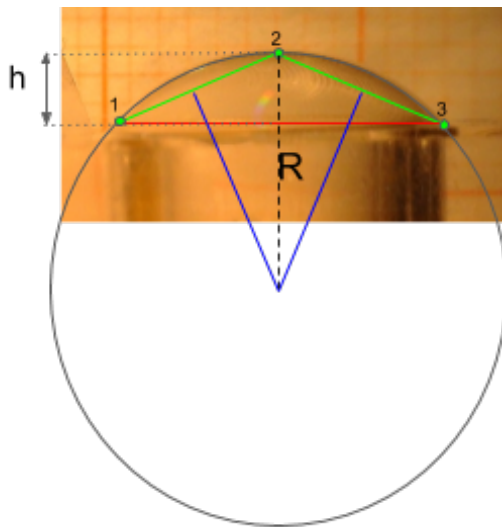


Figura 4.10: Consideraciones geométricas sobre la membrana para calcular su radio de curvatura y altura( $h$ ) del casquete que se forma.

Para cada imagen lateral obtenida se calculó el radio de curvatura obtenido por valor de presión. Si conocemos las coordenadas de los tres puntos que se encuentran en la circunferencia podemos obtener la ecuación de una línea que pase por el punto 1 y el punto 2 y la ecuación de la línea que pasa por el punto 2 y el punto 3.

Para conocer el radio de curvatura se calculan las rectas mediatrices de las ecuaciones de las rectas conocidas anteriormente y se encuentra el punto donde tiene un valor igual, con las coordenadas de este punto se calcula distancia entre este punto y el punto 2 de la circunferencia, obteniendo así el radio de curvatura. Para conocer la altura del casquete se calcula la distancia entre la recta que corresponde a la cuerda del círculo y el punto 2 de la circunferencia.

# Capítulo 5

## Resultados y discusión

Utilizando los protocolos de análisis de imágenes explicados en las secciones 4.4.1 y 4.4.2 se obtuvieron las gráficas presentadas en las figura 5.1 y 5.2 correspondientes al primer set de pruebas realizadas sobre el primer chip fabricado por ensamblaje. Dichas pruebas sirvieron para conocer el comportamiento de los chips y para conocer el manejo de los programas de cada uno de los dispositivos involucrados en la caracterización.

Se obtuvieron imágenes simultáneas del lateral de los chips y de la parte superior. En la figura 5.1 se presentan los resultados obtenidos del análisis de imágenes superiores. Como se puede apreciar en las figuras 5.1a, 5.1c y 5.1d hay puntos faltantes, esto se debe a la poca experiencia que se tenía para sincronizar los dispositivos, debido a que la sincronización se realizaba de manera manual y no se tenía considerado el error humano al presionar los botones. Sin embargo es posible tener una idea del comportamiento general del cambio en el tamaño del spot de difracción, se puede ver que hay una tendencia exponencial ( $\frac{1}{e^x}$ ).

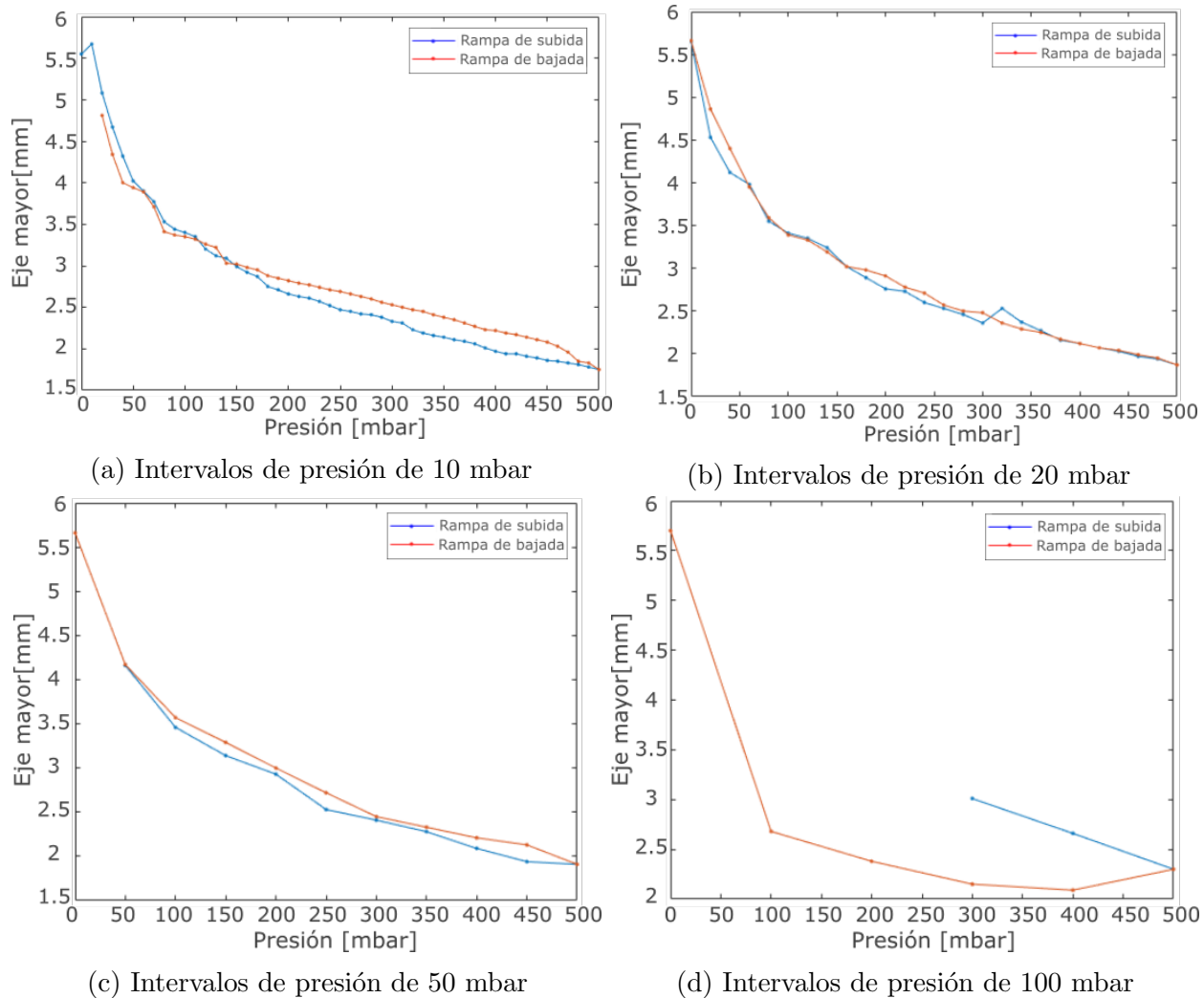


Figura 5.1: Gráficas obtenidas del análisis de imágenes superiores del primer set de pruebas realizado en los chips microfluídicos.

También se obtuvieron los resultados para las imágenes laterales obtenidas para cada prueba. En la figura 5.2 se presentan dichos resultados. Para estos casos no hay puntos faltantes en las gráficas, esto se debe a la manera en la que se realizó la adquisición de imágenes, para este primer set de pruebas se tomaron videos laterales de los chips y no imágenes individuales. Para obtener los valores del radio de curvatura de los chips se obtuvieron los cuadros que conformaban el video y se seleccionaron los que coincidían en tiempo con los cambios de presión (cada 2 segundos). En estas gráficas se puede observar que existe una tendencia general del radio de curvatura, el valor disminuye para valores mayores de presión.

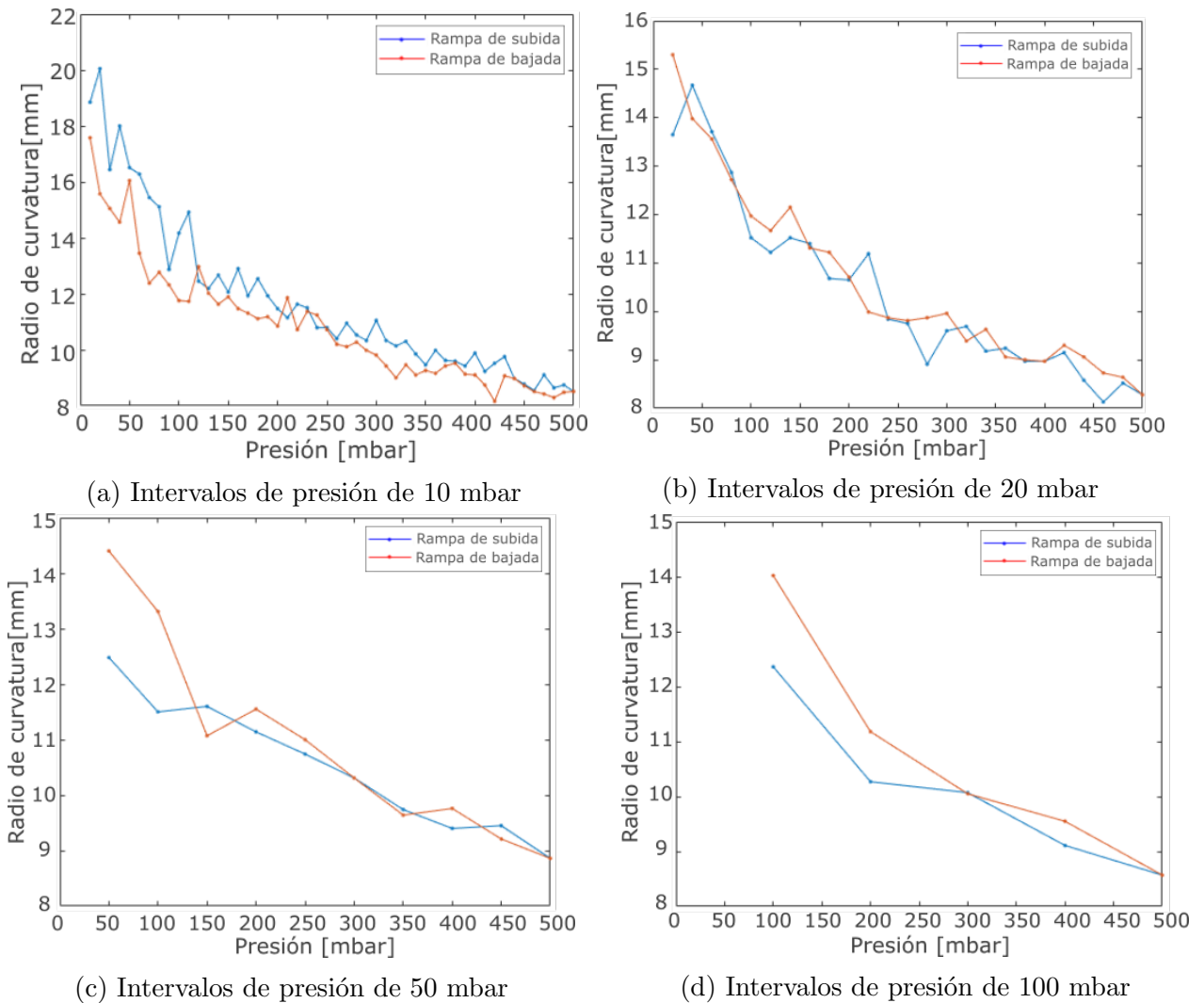


Figura 5.2: Gráficas obtenidas del análisis de las imágenes laterales del primer set de pruebas realizadas en los chips microfluídicos.

En las gráficas obtenidas, tanto para las imágenes laterales como para las imágenes superiores, se pueden ver cambios abruptos en las curvas. Se decidió repetir las pruebas cambiando los valores de presión en intervalos de 10 mbar. Este valor se eligió para tener una cantidad suficiente de puntos para generar las gráficas ya que el punto máximo de presión para estas pruebas fue de 200 mbar. Al repetir las pruebas en un chip nuevo fabricado por ensamblaje se observó un cambio en el comportamiento de las membranas, esto se debe a que la primer membrana sujeta a las pruebas presentaba fugas.



En la figura 5.3 se presenta la comparación de los resultados al tener una membrana con fugas y una membrana sin fugas. Es posible ver que el decaimiento en el tamaño del spot es más rápido en una membrana sin fugas, al ir aumentando la presión dentro del pozo central del chip los cambios en los valores son más pequeños pero son identificables.

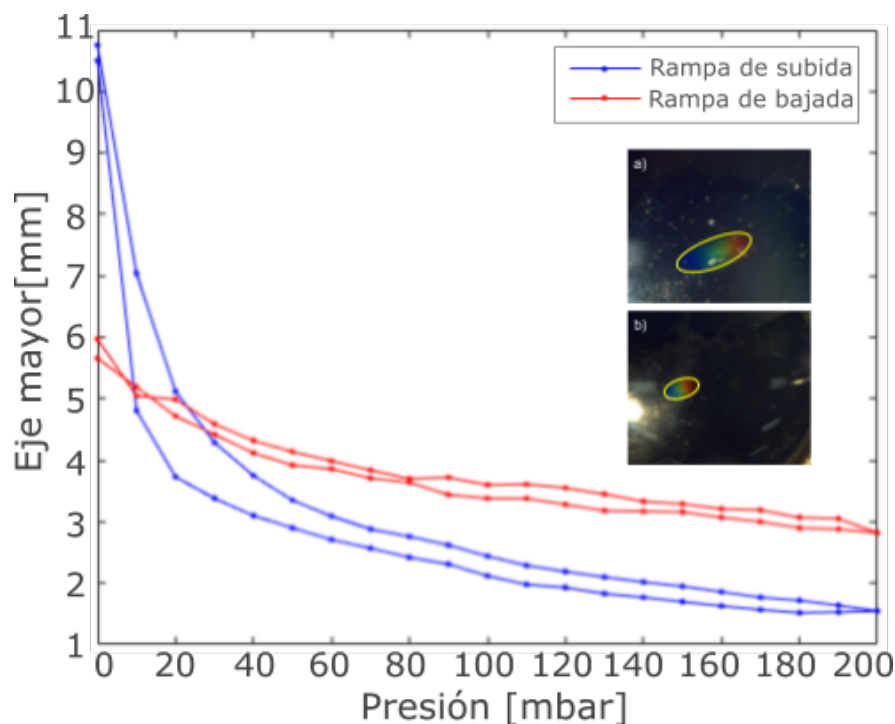
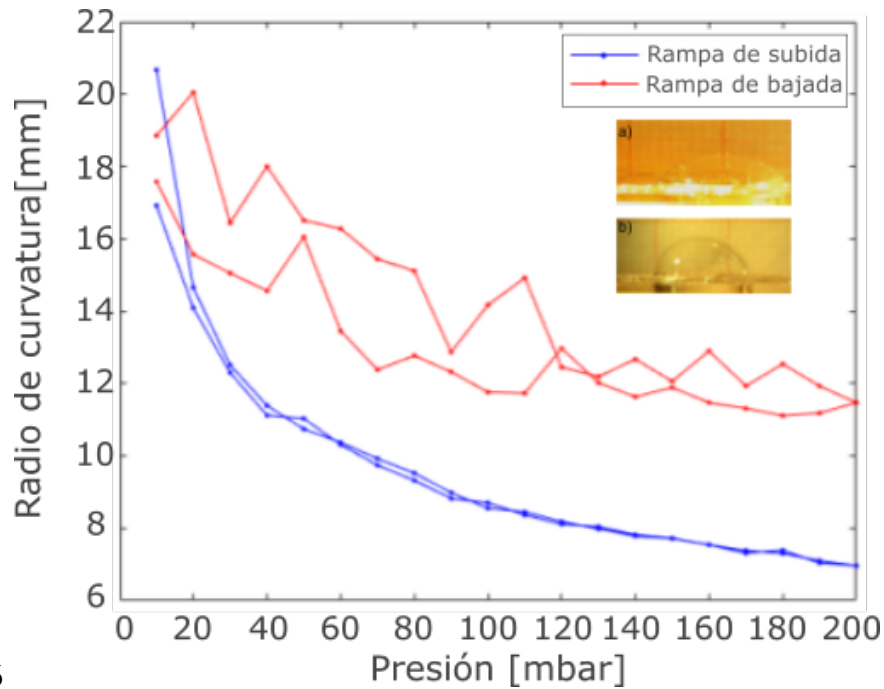


Figura 5.3: Comparación en el cambio del tamaño del spot de difracción en una membrana con fugas y en una membrana sin fugas

Simultáneamente al tener las imágenes superiores se obtuvieron imágenes laterales programando el software utilizando los botones de la interfaz gráfica que permiten seleccionar el tiempo entre cada adquisición y el tiempo total de adquisición, ya que se tenía la experiencia usando el software DinoCapture. En la figura 5.4 se presenta una comparación de los resultados obtenidos para una membrana con fugas y una membrana sin fugas. En la curva obtenida para los valores de la membrana sin fugas se presenta una tendencia exponencial y no se ven saltos grandes entre los valores. Por esto es importante tener cuidado en el proceso de fabricación para evitar tener fugas en las membranas.



5

Figura 5.4: Comparación del radio de curvatura de una membrana con fugas y una membrana sin fugas

## 5.1. Cambio en el patrón de difracción de luz blanca

En la figura 5.5a se presenta la gráfica obtenida para 1 chip fabricado por ensamblaje que fue sometido a 10 ciclos de cambio de presión. Para lograr esta gráfica se calculó el promedio de los valores obtenidos en los 10 ciclos (valores de los puntos presentados), para conocer el rango de error se calculó la desviación estandar de los valores obtenidos. En esta gráfica se observa que hay una tendencia  $\frac{1}{e^x}$  y que al ir aumentando las presiones el cambio en el tamaño del spot va disminuyendo. Se puede observar histéresis entre la rampa de bajada y la rampa de subida, esto se puede deber a que el tiempo en que la membrana tarda en relajarse es mayor al tiempo en que se cambia la presión en el pozo central del chip. Otra razón para tener histéresis en las curvas pueden ser las fugas que existen la membrana debido a los procesos de adhesión de los componentes.

En la figura 5.5b se presenta la gráfica obtenida para 1 chip fabricado en un paso que fue sometido a 10 ciclos consecutivos de cambio de presión en el pozo central, los valores presentados corresponden al promedio de los valores para cada ciclo. Se puede observar que este chip presenta el mismo comportamiento en cuanto al cambio en el tamaño del spot. Sin embargo, en este chip no se presenta una histéresis entre la rampa de bajada y la rampa de subida, esto nos puede decir que al tener una membrana que es un continuo de la base del chip se evitan las fugas en la membrana y la presión interna es constante. Además la diferencia de valores entre ciclos es pequeña comparado con las diferencias en valores del chip fabricado por ensamblaje. Estas diferencias entre las gráficas se puede deber a la presencia

de fugas en la membrana o en la unión de las membranas con la base del chip.

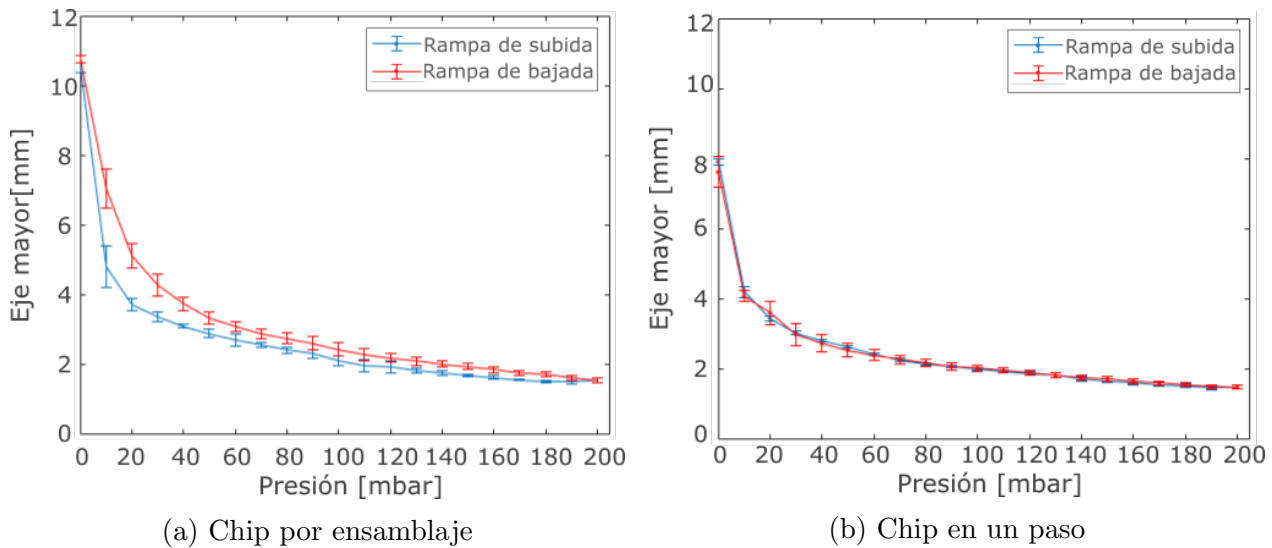


Figura 5.5: Gráficas obtenidas del análisis de imágenes superiores para pruebas de 10 ciclos en 1 chip. Se promedió el valor obtenido en cada ciclo y se graficó, las barras de error corresponden a la desviación estándar de estos valores.

Para el caso de los chips que fueron sujetos a un ciclo cada uno, podemos ver para ambos casos (5.6) que siguen la misma tendencia que el chip sometido a 10 ciclos y que comparado con los chips fabricados por el mismo proceso tienen valores muy similares. Sin embargo, para el caso de los chips fabricados por ensamblaje vemos que los valores presentados por la desviación estándar (barra de error) es de aproximadamente 2 milímetros (22%) para los valores más bajos de presión y de 1 milímetro (11%) para los valores más altos, esto se debe a que la orientación de las replicas en la membrana tiene una variación de chip a chip. Esta variación de orientación se puede deber a diferentes factores como el que no se haya usado el mismo sustrato para la fabricación de todas las membranas y al momento de despegar las membranas de los sustratos es difícil mantener la orientación inicial.

La variación entre chips fabricados en un paso es menor debido a que es más sencillo mantener la orientación del sustrato entre chips ya que al momento de la fabricación podemos asegurarnos de que el sustrato se coloque en la misma forma y se puede tener un punto de referencia en el sustrato para lograrlo. La pequeña variación que hay de un chip a otro se puede deber a que al momento de sacar el aire atrapado entre el molde y el sustrato las burbujas al escapar muevan un poco el sustrato cambiando de forma mínima la orientación de este.

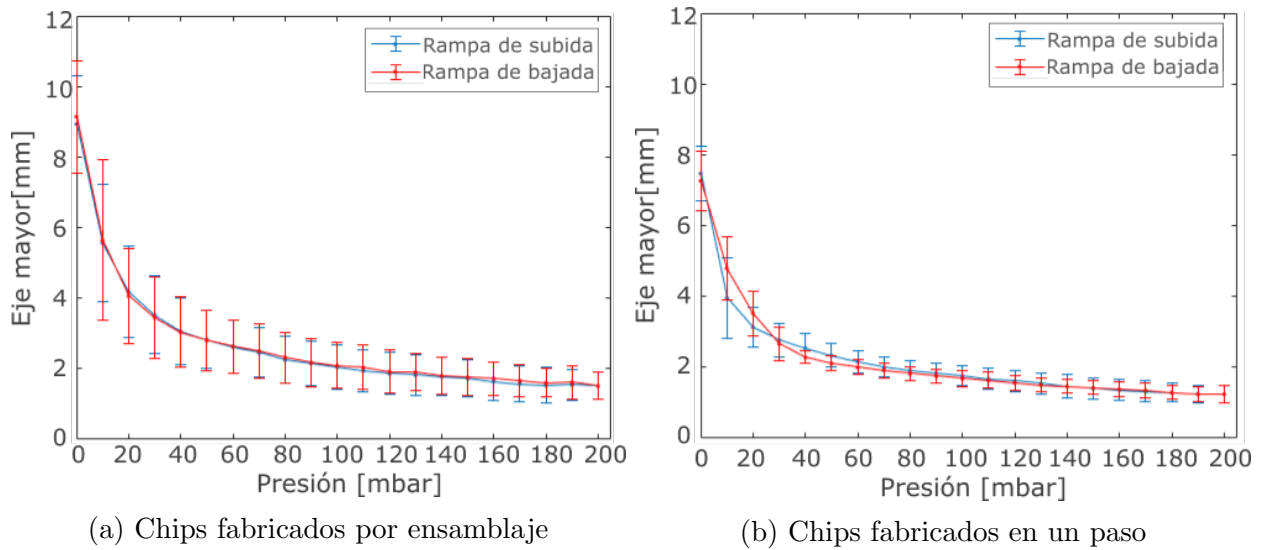


Figura 5.6: Gráficas obtenidas del análisis de imágenes superiores para 1 ciclo en 5 chips distintos. Se promedió el valor obtenido en cada chip y se graficó, las barras de error corresponden a la desviación estándar de estos valores.

## 5.2. Cambio en radio de curvatura de las membranas

Después de realizar el análisis de imágenes laterales y obtener los valores de radio de curvatura que corresponden a cada valor de presión se graficaron los resultados, para identificar los valores que corresponden a cada valor de presión y conocer el comportamiento global de los chips. En la figura 5.7a se observa la gráfica obtenida para un chip fabricado por ensamblaje sometida a 10 ciclos de cambio de presión en el pozo central. Podemos ver que tiene un comportamiento similar al cambio en el tamaño del spot de difracción sobre la membrana, una tendencia de  $\frac{1}{e^x}$ . Aunque los cambios en el radio de curvatura son menores, también se puede ver que al ir aumentando la presión los cambios en el radio de curvatura van siendo cada vez más pequeños.

En la figura 5.7b se presenta la gráfica obtenida para el chip fabricado en un paso. Podemos ver que tiene el mismo comportamiento que el chip fabricado por ensamblaje, en este chip se presenta una histéresis al ir disminuyendo los valores de presión dentro del pozo central, esto se puede deber a la velocidad con que la presión cambia dentro del pozo (2 segundos entre cada presión) y al tiempo que necesita la membrana para estabilizarse. En ambos casos la desviación estandar no sobre pasa el milímetro, en el caso del punto correspondiente a los 10 mbar puede verse una desviación estandar grande que puede deberse al tiempo de estabilización de la membranas y que al momento de hacer el análisis de imágenes es un poco complicado encontrar el punto más alto de las membranas.

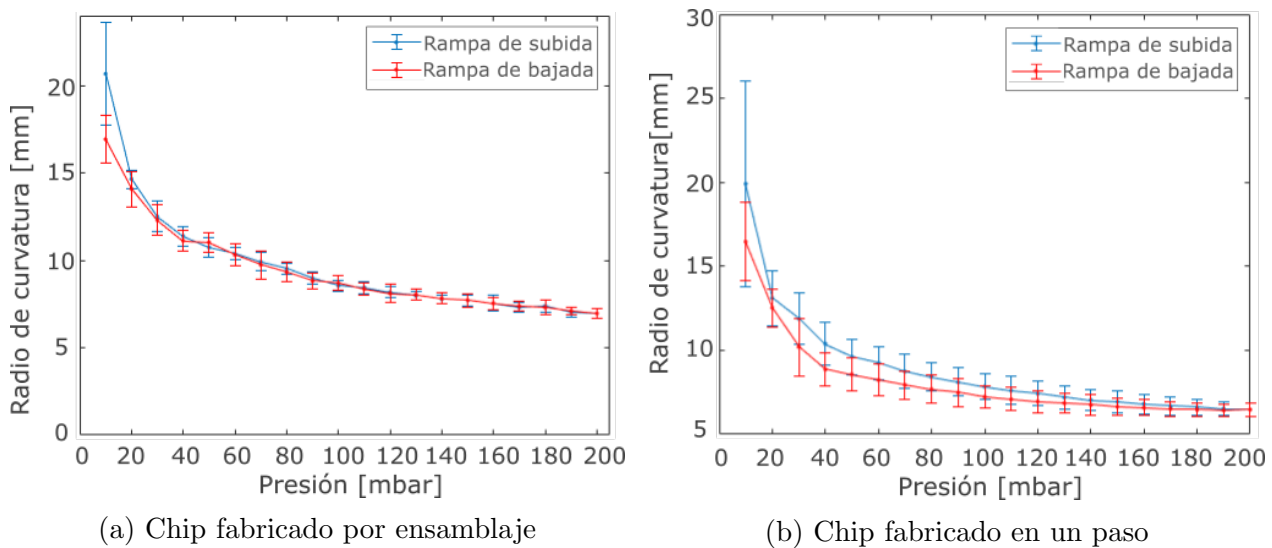


Figura 5.7: Gráficas obtenidas del análisis de imágenes laterales para pruebas de 10 ciclos en 1 chip. Se promedió el valor obtenido en cada ciclo y se graficó, las barras de error corresponden a la desviación estándar de estos valores.

En la figura 5.8a se presenta la gráfica obtenida para 5 chips distintos fabricados por el método de ensamble sometidos a un ciclo de cambios de presión cada uno. Es posible ver que la desviación entre cada chip es mayor a los 5 milímetros para los valores más pequeños de presión mientras que para los valores grandes la desviación es de 1 mm. Esta diferencia se debe a diferentes factores asociados al proceso de fabricación, siendo el principal factor la adhesión de las membranas a los chips ya que al no estar bien adherida la membrana a la circunferencia del pozo central pueden existir pequeñas fugas de aire o no se tiene una forma circular en el plano (x,y). Otro de los factores que puede generar esta diferencia entre chips es el paralaje del microscopio USB ya que al cambiar de chip se tiene que mover la orientación de éste para lograr tener una difracción sobre la membrana que sea captada por el microscopio estereoscópico y esto afecta la orientación del microscopio USB.

Para los chips fabricados en un paso, la gráfica se presenta en la figura 5.8b, en ella se puede observar que la tendencia en el cambio del radio de curvatura es visible y presenta menos cambios abruptos entre valores de presión en comparación con los chips fabricados por ensamblaje. También podemos ver que la desviación estándar entre chips es menor a 1 mm para los valores altos de presión. Que los valores en la desviación estándar entre chips disminuyan en los chips fabricados en un paso, puede ser debido a que al tener una orientación similar en el sustrato que genera la microestructura de la membrana no es necesario mover el arreglo experimental, por lo que el microscopio USB siempre tiene la misma orientación con respecto a los chips. Es importante considerar que sigue existiendo un error de paralaje al elegir los puntos en el programa que calcula los valores del radio de curvatura. Hay una histéresis en los valores de la rampa de bajada en comparación de los valores de la rampa de subida, igual que en el caso del chip sometido a 10 ciclos se puede deber al tiempo de estabilización que necesita la membrana o a un error sistemático en el proceso de análisis de

imágenes ya que las sombras al momento de tomar la imagen pueden cambiar los puntos de contraste en la imagen en escala de grises.

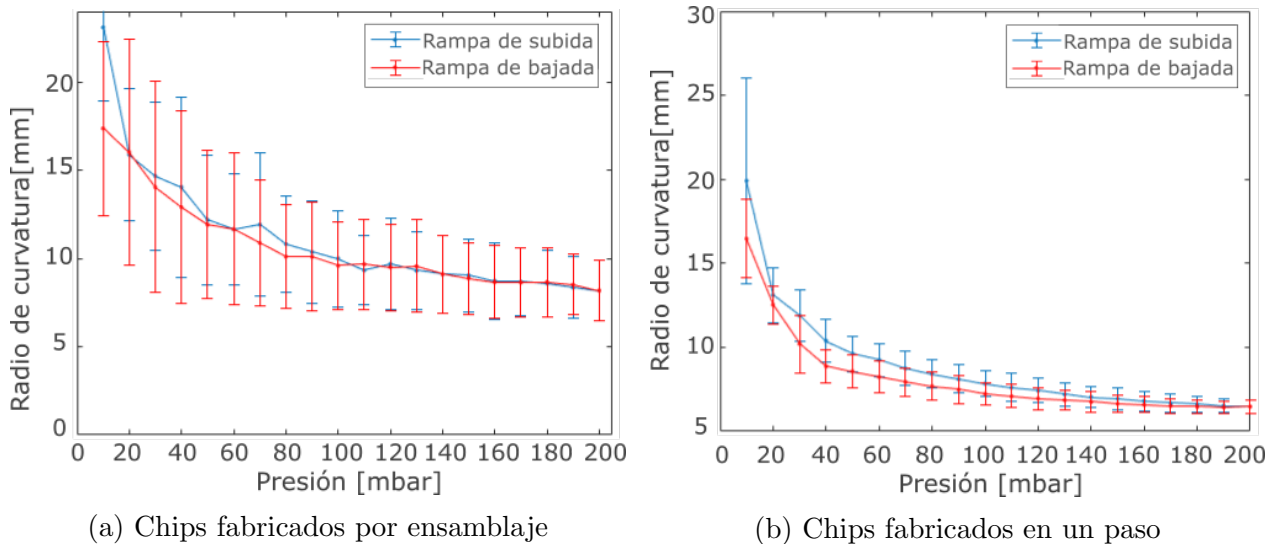


Figura 5.8: Gráficas obtenidas del análisis de imágenes laterales para 1 ciclo en 5 chips distintos. Se promedió el valor obtenido en cada chip y se graficó, las barras de error corresponden a la desviación estándar de estos valores.

### 5.3. Análisis de resultados

Como se explicó en la sección 4.1 se buscaba tener una correlación de los resultados del análisis lateral y superior de las imágenes obtenidas. Con la finalidad de conocer mejor los dispositivos con los que se está trabajando y tener una curva de referencia sobre los valores del radio de curvatura de las membranas y el área del spot de difracción en función de la presión aplicada. Debido a que no se tiene un control sobre la presión interna de los dispositivos más que los valores marcados como valores de salida del sistema FLUIGENT, es necesario otra forma de conocer el valor del radio de curvatura sin depender del valor de presión.

Al tener los resultados del análisis de imágenes laterales y superiores de los chips fabricados por los dos procesos descritos se realizó la correlación de datos con la finalidad de tener valores del tamaño del spot que nos permitan conocer el radio de curvatura de las membranas sin tener que realizar un análisis de imágenes lateral en chips que se quieran probar posteriormente. Esto sería de utilidad para, en pruebas futuras, tener un arreglo experimental que solo conste de un microscopio y que además el análisis de imágenes se haga en menos tiempo o en algún caso no necesitar análisis de imágenes si es que ya se tiene calibrado el sistema.

En la figura 5.9 se presentan las curvas “Eje mayor vs Radio de curvatura” donde se describen los valores del diámetro del patrón de difracción en función del radio de curvatura de la membrana para 1 chip fabricado por ensamblaje (figura 5.9a) y para 1 chip fabricado en 1 paso (figura 5.9b). Es importante recalcar que los puntos más cercanos al origen corresponde

al valor de presión más alto (200 mbar) y los puntos más alejados corresponden a 10 mbar, se excluyó el valor de 0 mbar debido a que en este punto el radio de curvatura es infinito ya que la membrana al no tener presión interna geoméricamente se puede ver como una recta.

Estas curvas fueron creadas usando los valores promedios del eje mayor del patrón de difracción y los valores promedios para el radio de curvatura. Se puede observar que el valor del eje mayor aumenta cuando el radio de curvatura aumenta en ambas curvas, es decir, el espacio que utiliza el patrón de difracción en la membrana aumenta cuando la membrana se encuentra casi relajada.

Para el caso de la membrana del chip fabricado por ensamblaje se observa que al retirar la presión interna la membrana no regresa al estado inicial, por lo tanto el tamaño del eje mayor del spot de difracción tampoco regresa a su valor inicial. Estas diferencias se pueden deber a que el flujo de aire no es la misma al retirarlo que al ingresarlo en la cavidad central, también hay que considerar que después de someter las membranas a varios ciclos puede existir una deformación irreversible en ellas. En un caso ideal los valores en la rama de subida y en la rama de bajada deberían ser iguales. Si regresamos a la curva 5.5a podemos ver que, para el caso del cambio en el tamaño del spot, hay histéresis, esto explica por que los puntos en el eje  $y$  no son los mismos para la rama de bajada y la rama de subida. Para el caso del eje  $x$  hay que regresar a la curva 5.7a, de aquí podemos decir que la histéresis entre la rama de subida y la rama de bajada corresponde a la separación de valores en la gráfica de correlación. Al llegar al valor de 10 mbar es muy visible la histéresis y esto se traduce en una separación muy grande en la curva que estamos observando aquí, en un caso ideal los valores deberían ser iguales al ir disminuyendo los valores de presión dentro del dispositivo.

Por otro lado para la membrana que se encuentra en el chip fabricado en 1 paso observamos valores cercanos en la rama de subida y en la rama de bajada. También se puede ver que el valor inicial del tamaño del spot de difracción es más grande que el valor final del tamaño del spot de difracción. El valor inicial del radio de curvatura se encuentra muy cercano al valor final del radio de curvatura. Como se observa los valores del radio de curvatura en la rama de subida y la rama de baja son muy cercanos entre si, mientras que para los valores del tamaño del spot hay cambios más notables. Estos cambios se pueden deber de igual manera a la fatiga de la membrana después de ser sometida a diferentes ciclos. Como se mencionó en la sección anterior las fugas presentan un papel importante en el comportamiento general de las membranas y la forma en que el flujo entra y sale del dispositivo también juega un papel, la diferencia en valores en estos dispositivos en particular se puede deber a que hay aire atrapado dentro de la cavidad central. Hay que tomar en cuenta las curvas 5.5b y 5.7b. En este caso la mayor histéresis se encuentra en la curva del cambio de radio de curvatura, sin embargo se puede ver que la curva tiene una tendencia casi lineal, este es un comportamiento que se esperaría en el resto de los dispositivos.

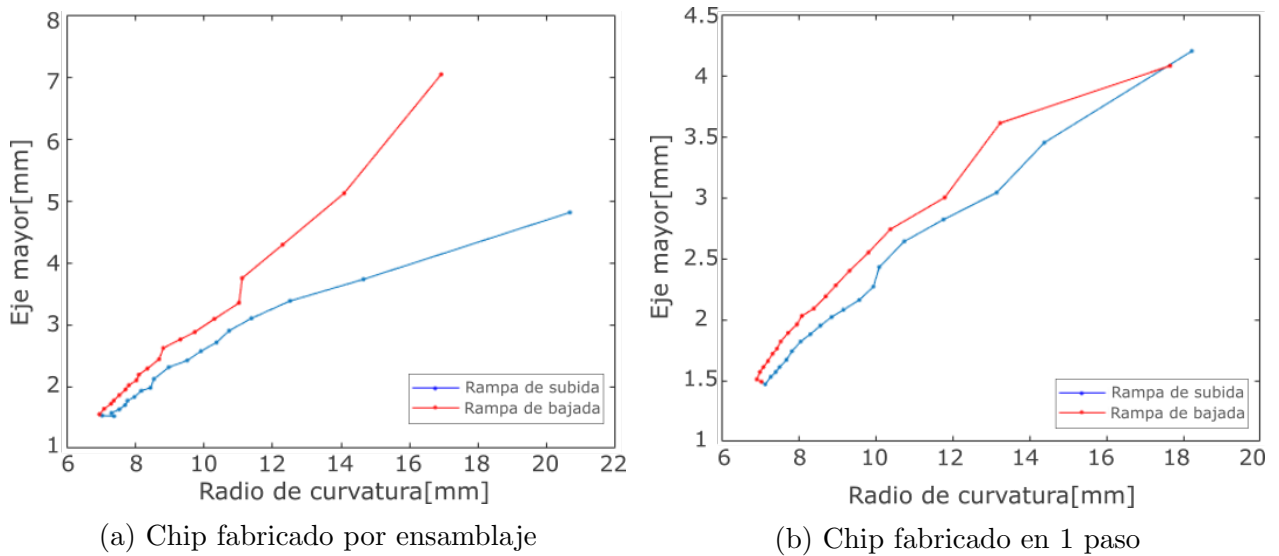


Figura 5.9: Gráficas de correlación del eje mayor del spot de difracción con el radio de curvatura para 10 ciclos en 1 chip.

Este mismo tipo de correlación se realizó para los resultados obtenidos en las pruebas hechas en 5 chips diferentes fabricados por ambos métodos. En la figura 5.10 se presentan las curvas obtenidas de la correlación del cambio en el tamaño del spot de difracción y el cambio en el radio de curvatura.

En la curva 5.10a se presenta la gráfica para 5 chips fabricados por ensamblaje sometidos a 1 ciclo de cambios de presión cada uno. Vemos que el valor final del tamaño del spot es mayor a un radio de curvatura menor comparado con el punto inicial, nosotros esperaríamos lo contrario, esta diferencia puede deberse a la fatiga presentada por la membrana, ya que al ser sometida a varios ciclos la membrana puede deformarse. Sin embargo para los valores bajos de radio de curvatura los valores del tamaño de spot son muy similares. Es necesario tomar en cuenta las curvas 5.6a y 5.8a. Para esta curva los valores del cambio tamaño del eje mayor que corresponde a los valores grandes de presión son muy similares en la rampa de bajada y en la rampa de subida, para valores altos de presión los valores empiezan a ser diferentes. En el caso del cambio en el radio de curvatura las diferencias entre la rampa de subida y la rampa de bajada son más grandes. En esta curva es importante tener en cuenta la desviación de los valores promedio (valores graficados), porque como podemos recordar para el caso de los chips fabricados por ensamblaje la desviación de los valores para el cambio en el eje mayor y el radio de curvatura son mayores al 10 %.

Los resultados obtenidos para los chips fabricados en un paso se presentan en la figura 5.10b. En valores pequeños de radio de curvatura los valores del eje mayor son muy similares entre la rampa de baja y la rampa de subida, mientras que al ir aumentando el valor del radio de curvatura existe una diferencia mayor entre los valores del eje mayor. El valor inicial y el valor final para el radio de curvatura se encuentran muy cercanos, sin embargo los valores del eje mayor tienen una diferencia de un poco más de un milímetro. Esta diferencia se puede



deber a la forma en que el aire es retirado del dispositivo por la bomba microfluídica. Es necesario tener en mente las gráficas obtenidas para el cambio en el tamaño del eje mayor del spot de difracción (figura 5.6b) y para el cambio en el radio de curvatura de las membranas (5.8b). En este caso los valores del cambio en el mayor del spot de difracción para los valores altos de presión son los mismos y aunque los valores del radio de curvatura difieren tienen valores muy cercanos incluso en valores pequeños de presión. En este caso hay que tener en cuenta que los valores de desviación del valor promedio es menor al 5 % para el cambio en el radio de curvatura y en el tamaño del spot de difracción.

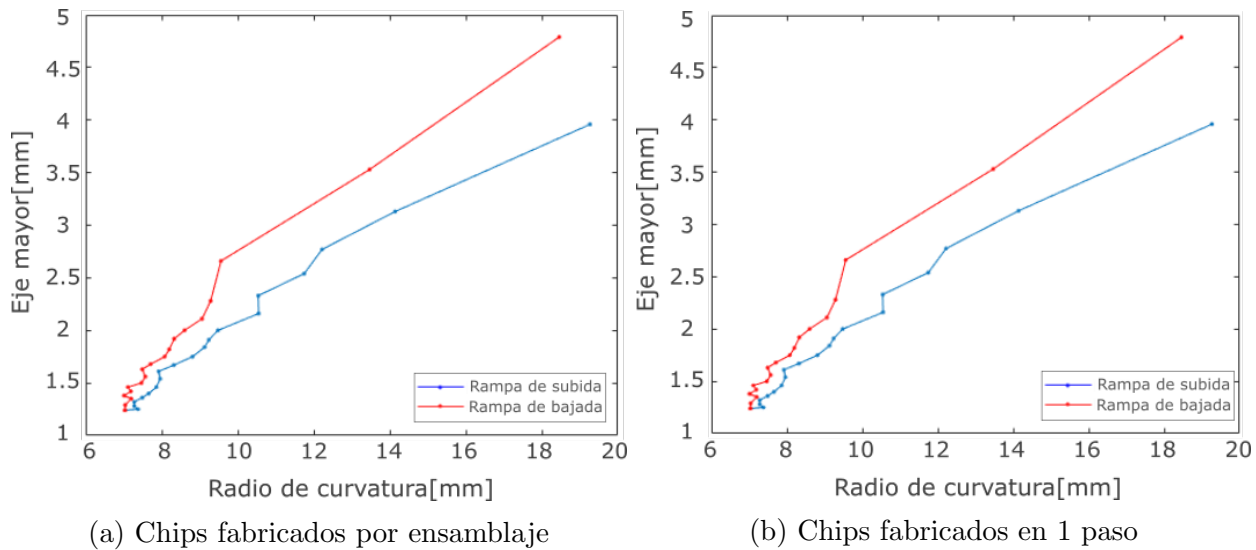


Figura 5.10: Gráficas de correlación del eje mayor del spot de difracción con el radio de curvatura para 1 ciclo en 5 chips diferentes.

Al comparar el comportamiento de los dispositivos fabricados por ensamblaje y por un paso vemos que las fugas y la orientación de los surcos juegan un papel importante en el comportamiento global de las membranas. Al tener una forma más sencilla de asegurar la orientación de los sustratos de DVD que sirven para generar las réplicas sobre las membranas los valores para el tamaño del spot serán más homogéneos y tendremos desviaciones pequeñas. Aunado a esto, tener una forma de fabricar las membranas directamente sobre el bulto del dispositivo reduce la probabilidad de tener fugas por un mal pegado de las membranas o por la perforación accidental de las mismas como consecuencia tenemos en resultados con una alta reproducibilidad y repetibilidad.

# Capítulo 6

## Conclusiones

En este trabajo se presentaron dos procesos de fabricación de chips microfluídicos con membranas deformables microestructuradas para lograr la difracción de luz blanca en su superficie. El primer proceso presentado propuso fabricar la membrana y la base del chip por separado, para adherirlos cuando el pre-polímero utilizado se encuentra polimerizado completamente, este tipo de fabricación tiende a generar fugas en los dispositivos debido a que en el momento de la manipulación de la membrana se puede perforar con las pinzas utilizadas o por las fallas en el proceso de adhesión membrana-base.

En el segundo proceso de fabricación se propuso utilizar un molde de PMMA que permitiría la fabricación de la membrana unida directamente a la base del chip por lo que el paso de adhesión membrana-base no es necesario. Este proceso de fabricación permite tener un control directo sobre la orientación de la réplica sobre la membrana, mientras que en el proceso de fabricación por ensamblaje es muy difícil tener control sobre este parámetro por la forma en la que se maneja la membrana al ser despegada del sustrato.

Se realizó un análisis de las imágenes laterales y superiores obtenidas al someter las membranas a ciclos de cambios de presión interna para tener una comparación directa de la deformación de la membrana en los chips microfluídicos fabricados por los procesos de fabricación propuestos. De este análisis de imágenes se obtuvieron diferentes curvas para conocer la repetibilidad y reproducibilidad de los experimentos utilizando los chips microfluídicos. Fue posible someter a las membranas a una deformación interna al automatizar una bomba microfluídica que nos permitió generar ciclos de deformación en las membranas. En los experimentos realizados se encontró que la desviación de los datos obtenidos referentes a la deformación de la membrana (radio de curvatura y tamaño del patrón de difracción) es menor en los chips microfluídicos fabricados en un paso. De estos resultados podemos concluir que el mejor método para la fabricación de los chips es el segundo método propuesto, debido a que en estos chips las fugas son menores y la orientación de los surcos se puede controlar de una mejor manera. Es importante considerar que el método de fabricación por ensamblaje nos permite la fabricación de dispositivos microfluídicos con membranas de diferentes materiales.

Se puede obtener una correlación de datos (cambio en el tamaño del spot y cambio en el radio de curvatura) para tener una calibración de los dispositivos que sea independiente del

valor de presión de salida de las bombas microfluídicas utilizadas. Esta correlación puede ser útil para optimizar el arreglo experimental para aplicaciones posteriores de los dispositivos microfluídicos presentados en este trabajo.

El código generado para el análisis de imágenes laterales permite una semi-automatización del proceso de análisis, haciendo que este proceso sea más rápido y se puedan analizar grupos específicos de imágenes. El proceso de análisis de las imágenes superiores es más lento, sin embargo, permite una mejor visualización de los cambios en las membranas ya que el spot de difracción es sensible a cambios muy pequeños en la distancia de líneas que lo generan y esto también contribuye a que haya un menor error entre mediciones.

El diseño de los dispositivos microfluídicos presentados en este trabajo presentan las características necesarias para ser adaptados a su uso para cultivos celulares y su monitoreo. Tienen un espacio asignado para realizar cultivos celulares, el material es biocompatible y cuenta con un sistema de microcanales que permiten el recambio de medio de cultivo o fluido dentro del dispositivo. Es posible montar los dispositivos en los sistemas de microscopia disponibles en el laboratorio y es posible su caracterización de forma indirecta gracias a la microestructura de la membrana deformable.

# Capítulo 7

## Trabajo a Futuro

### 7.1. Fabricación de chips con membrana de Colágena tipo I

Como trabajo a futuro se propone realizar la fabricación de chips microfluídicos con membranas de colágena tipo I y realizar pruebas de inflamación en estas membranas. Además de ser posible se debe buscar la opción de generar membranas microestructuradas que permitan un análisis de imágenes superiores como el presentado en este trabajo.

#### 7.1.1. Colágena tipo I

La colágena es la proteína más abundante en los humanos, conformando un 25-30 % de la masa total de las proteínas [39]. En particular, la colágena tipo I se encuentra en forma de fibras en tejidos conectivos como ligamentos y tendones. Este tipo de colágena juega un papel importante en la matriz extracelular (MEC) ya que determina su resistencia a las fuerzas de tracción. En cultivos celulares la colágena tipo I es usada en películas delgadas para promover la diferenciación, adhesión, proliferación y migración de diferentes tipos celulares[40].

Las fibras de colágena tipo I tienen una formación jerárquica (figura 7.1). Una fibra de colágena se conforma de un conjunto de fibrillas que a su vez se conforman de un conjunto de arreglos de triple hélice derecha formada por una agrupación de tres cadenas polipeptídicas izquierdas. Dichas cadenas se construyen de la repetición Gly-X-Y donde X es prolina y Y es 4-hidroxiprolina. Cada cadena está formada por más de 1000 aminoácido, las fibras de colágena pueden llegar a tener 300 nm de largo y un diámetro de 1-5 nm[18].

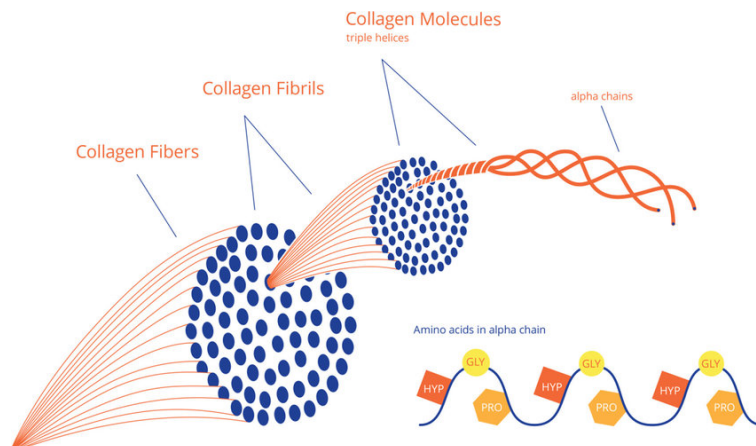
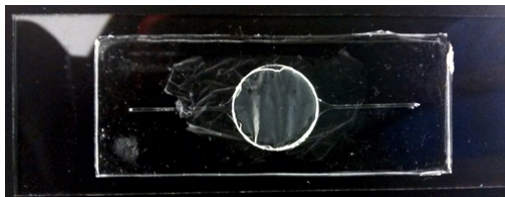


Figura 7.1: Estructura jerárquica de una fibra de colágeno[41].

### 7.1.2. Primeras pruebas en chips con membranas de colágena I

Se han realizado algunas pruebas para saber establecer un proceso de fabricación de chips con membranas de colágena I (figura 7.2a), además se ha realizado pruebas preliminares para conocer los límites de las membranas de colágena fabricadas con el protocolo establecido actualmente, en estas pruebas se encontró que es posible deformar las membranas de colágena y llegar hasta una presión de 70 mbar(figura 7.2b).



(a) Vista superior



(b) Vista lateral de membrana deformanda

Figura 7.2: Chip microfluídico con membrana de colágena tipo I

# Apéndice A

## Código para análisis de imágenes laterales

Para realizar el análisis de las imágenes laterales se generó un código en MatLab. Dicho código despliega la imagen a analizar para elegir 3 puntos de la membrana y con esto calcular el radio de curvatura (figura A.1). Al analizar todas las imágenes el programa genera un archivo con los resultados en la carpeta que se le indique. Por otro lado para realizar el análisis de las imágenes superiores se utilizó la aproximación elíptica del programa ImageJ, este software nos da la opción de generar un archivo con los resultados por paquete de imágenes.

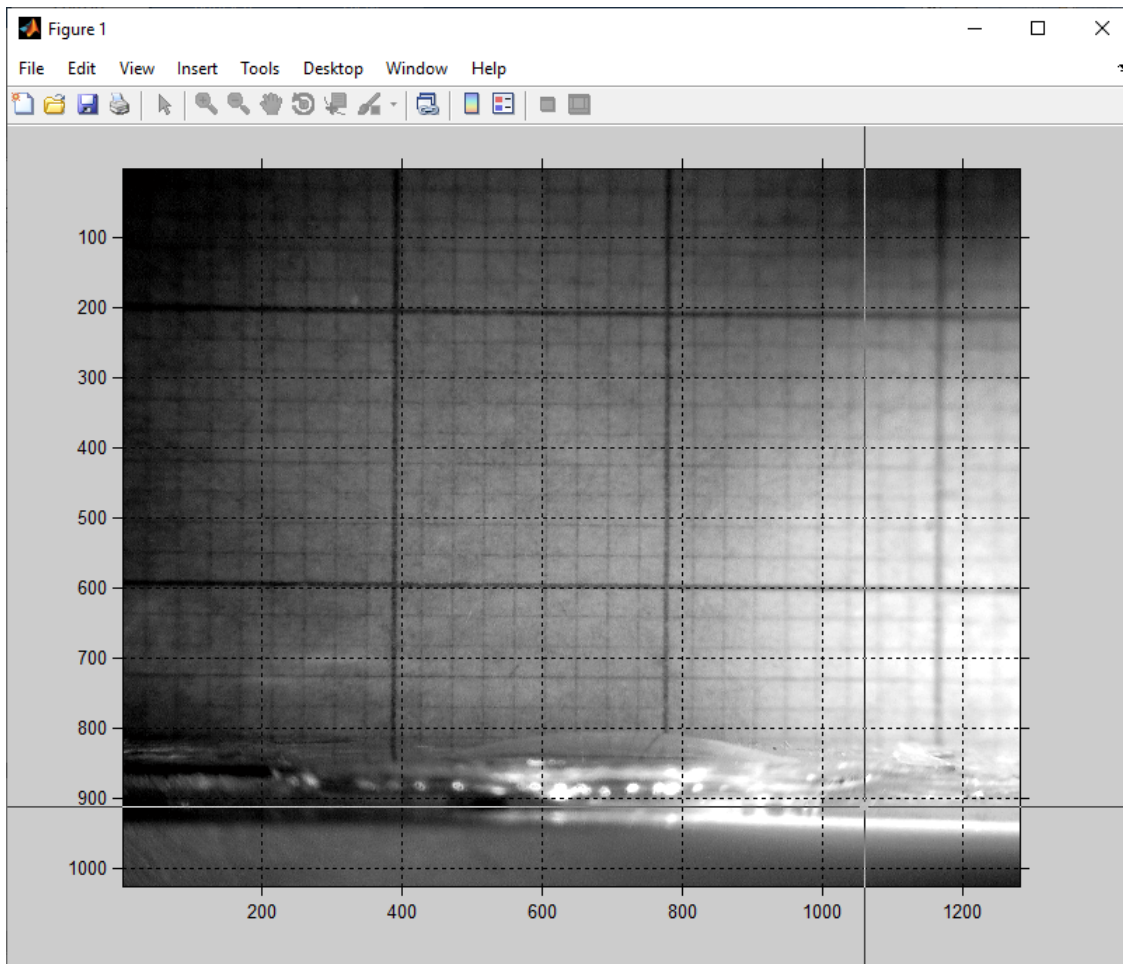


Figura A.1: Ventana para elegir 3 puntos de la circunferencia de membrana para calcular el radio de curvatura

El primer paso dentro del programa es elegir la carpeta donde se encuentran las imágenes que queremos analizar, establecer el formato de las imágenes y el número de píxeles por milímetro para hacer la conversión de unidades.

```
clc;
clear all;
close all;
format bank;

path=uigetdir;
imtype=inputdlg('Extensión de las imágenes:');
imtype=imtype{1};
cd(path); %cambia al folder donde se encuentran las imágenes
names=dir(strcat(path,'\','*',imtype)); %nombres de las imágenes
[~,ndx] = natsortfiles({names.name});
names=names(ndx);
pix=inputdlg('Píxeles por mm:');
px=str2double(px);
radio=[];
altura=[];
angulo=[];
cuerda=[];
imagen=[];
```



El programa hace un ciclo para barrer todas las imágenes dentro de la carpeta elegida y despliega la siguiente imagen automáticamente.

```

for i=1:length(names) %Recorre todas las imágenes dentro de la carpeta
    close all;
    I = imread(names(i).name); %pasa por todas la imágenes que se
        %encuentran en el folder

    I2=imadjust(rgb2gray(I));
    imshow(I2); %te muestra la imagen en escala de grises
    axis on;
    grid on;
    hold on;

    x=zeros(2);
    y=zeros(2);

    hold on
    for j=1:3 %Abre la imagen para elegir los tres puntos que se
        %quieren tomar de referencia. Se aconseja tomar los
        %puntos de las orillas y el punto
        % más alto de la circunferencia, empezando por el punto de
        % la izquierda, siguiendo con el punto más alto y por último
        %el punto de la derecha

```

Para calcular el radio de curvatura se necesitan elegir 3 puntos de izquierda a derecha. Los puntos deben ser las orillas de la membrana y el punto central más alto. Al tener estos puntos el programa guarda las coordenadas de los puntos.

```

%Guarda las coordenadas de los 3 puntos

x1=floor(x(1)); y1=floor(y(1));
x2=floor(x(2)); y2=floor(y(2));
x3=floor(x(3)); y3=floor(y(3));

```

Con estas coordenadas se calcula la ecuación de la recta que se encuentra entre el punto 1 y el punto 2 y la recta que se encuentra entre el punto 2 y 3. Se calcula las pendientes de las mediatrices de estas rectas para luego encontrar la ecuación de las mediatrices de las rectas anteriores. Con esto se encuentra el punto central de la circunferencia y se calcula el radio de curvatura.

```

%Encuentra las ecuaciones de las rectas que pasan por los 3 puntos
f1= polyfit([x1, x2], [y1, y2], 1);
f2= polyfit([x2, x3], [y2, y3], 1);

syms x

m1=(-1)/(f1(1)); %pendiente la mediatriz de los puntos 1 y 2
%Coordenadas del punto medio entre los puntos 1 y 2
px1=floor((x1+x2)/2);
py1=floor((y1+y2)/2);
fm1= m1*x-(m1*px1)+py1; %Ecuación de la mediatriz de los puntos 2 y 3

m2=(-1)/(f2(1)); %pendiente la mediatriz de los puntos 2 y 3
%Coordenadas del punto medio entre los puntos 2 y 3
px2=floor((x2+x3)/2);
py2=floor((y2+y3)/2);
fm2= m2*x-(m2*px2)+py2; %Ecuación de la mediatriz de los puntos 2 y 3

%Coordenadas del punto central de la circunferencia
xc=floor(solve(fm2==fm1, x));
yc=floor(subs(fm1, x, xc));

```



# Bibliografía

- [1] G. M. Whitesides, “The origins and the future of microfluidics,” *Nature*, vol. 442, no. 7101, pp. 368–373, 2006.
- [2] N. Convery and N. Gadegaard, “30 years of microfluidics,” *Micro and Nano Engineering*, vol. 2, pp. 76–91, 2019.
- [3] F. S. Ligler and C. R. Taitt, *Optical biosensors: today and tomorrow*. Elsevier, 2011.
- [4] D. Mark, S. Haeberle, G. Roth, F. Von Stetten, and R. Zengerle, “Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications,” in *Microfluidics based microsystems*, pp. 305–376, Springer, 2010.
- [5] J. C. McDonald, D. C. Duffy, J. R. Anderson, D. T. Chiu, H. Wu, O. J. Schueller, and G. M. Whitesides, “Fabrication of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane),” *ELECTROPHORESIS: An International Journal*, vol. 21, no. 1, pp. 27–40, 2000.
- [6] S. Trietsch, T. Hankemeier, and H. Van der Linden, “Lab-on-a-chip technologies for massive parallel data generation in the life sciences: A review,” *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 108, no. 1, pp. 64–75, 2011.
- [7] P. Abgrall and A. Gue, “Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem—a review,” *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 17, no. 5, p. R15, 2007.
- [8] E. Primiceri, M. S. Chiriaco, R. Rinaldi, and G. Maruccio, “Cell chips as new tools for cell biology—results, perspectives and opportunities,” *Lab on a Chip*, vol. 13, no. 19, pp. 3789–3802, 2013.
- [9] M. Mirasoli, M. Guardigli, E. Michelini, and A. Roda, “Recent advancements in chemical luminescence-based lab-on-chip and microfluidic platforms for bioanalysis,” *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 87, pp. 36–52, 2014.
- [10] A. Giannitsis and M. Min, “Usage of microfluidic lab-on-chips in biomedicine,” in *2010 12th Biennial Baltic Electronics Conference*, pp. 249–252, IEEE, 2010.
- [11] F. Kurth, E. Györvary, S. Heub, D. Ledroit, S. Paoletti, K. Renggli, V. Revol, M. Verhulsel, G. Weder, and F. Loizeau, “Organs-on-a-chip engineering,” in *Organ-on-a-chip*, pp. 47–130, Elsevier, 2020.

- [12] B. Zhang, A. Korolj, B. F. L. Lai, and M. Radisic, “Advances in organ-on-a-chip engineering,” *Nature Reviews Materials*, vol. 3, no. 8, pp. 257–278, 2018.
- [13] S. Ahadian, R. Civitarese, D. Bannerman, M. H. Mohammadi, R. Lu, E. Wang, L. Davenport-Huyer, B. Lai, B. Zhang, Y. Zhao, *et al.*, “Organ-on-a-chip platforms: a convergence of advanced materials, cells, and microscale technologies,” *Advanced healthcare materials*, vol. 7, no. 2, p. 1700506, 2018.
- [14] J. E. Sosa-Hernández, A. M. Villalba-Rodríguez, K. D. Romero-Castillo, M. A. Aguilar-Aguila-Isaías, I. E. García-Reyes, A. Hernández-Antonio, I. Ahmed, A. Sharma, R. Parra-Saldívar, and H. Iqbal, “Organs-on-a-chip module: a review from the development and applications perspective,” *Micromachines*, vol. 9, no. 10, p. 536, 2018.
- [15] S. N. Bhatia and D. E. Ingber, “Microfluidic organs-on-chips,” *Nature biotechnology*, vol. 32, no. 8, p. 760, 2014.
- [16] P. F. Davies and S. C. Tripathi, “Mechanical stress mechanisms and the cell. an endothelial paradigm,” *Circulation research*, vol. 72, no. 2, pp. 239–245, 1993.
- [17] Y. Sei, K. Justus, P. LeDuc, and Y. Kim, “Engineering living systems on chips: from cells to human on chips,” *Microfluidics and nanofluidics*, vol. 16, no. 5, pp. 907–920, 2014.
- [18] M. Karsdal, *Biochemistry of collagens, laminins and elastin: structure, function and biomarkers*. Academic Press, 2019.
- [19] K. Kaarj and J.-Y. Yoon, “Methods of delivering mechanical stimuli to organ-on-a-chip,” *Micromachines*, vol. 10, no. 10, p. 700, 2019.
- [20] D. Qin, Y. Xia, and G. M. Whitesides, “Soft lithography for micro-and nanoscale patterning,” *Nature protocols*, vol. 5, no. 3, p. 491, 2010.
- [21] X. Jiang, W. Zheng, S. Takayama, R. G. Chapman, R. S. Kane, and G. M. Whitesides, “Micro-scale patterning of cells and their environment,” in *Principles of Tissue Engineering*, pp. 359–384, Elsevier, 2014.
- [22] A. Yadegari, F. Fahimipour, M. Rasoulianboroujeni, E. Dashtimoghadam, M. Omid, H. Golzar, M. Tahriri, and L. Tayebi, “Specific considerations in scaffold design for oral tissue engineering,” in *Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering*, pp. 157–183, Elsevier, 2017.
- [23] Y. Xia and G. M. Whitesides, “Soft lithography,” *Annual review of materials science*, vol. 28, no. 1, pp. 153–184, 1998.
- [24] D. B. Wolfe, J. C. Love, and G. M. Whitesides, “Nanostructures replicated by polymer molding,” *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, 2004.
- [25] S. Seethapathy and T. Gorecki, “Applications of polydimethylsiloxane in analytical chemistry: A review,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 750, pp. 48–62, 2012.

- [26] “Introduction to poly-di-methyl-siloxane (pdms).” <https://www.elflow.com/microfluidic-reviews/general-microfluidics/the-poly-di-methyl-siloxane-pdms-and-microfluidics-2/>.
- [27] A. Mata, A. J. Fleischman, and S. Roy, “Characterization of polydimethylsiloxane (pdms) properties for biomedical micro/nanosystems,” *Biomedical microdevices*, vol. 7, no. 4, pp. 281–293, 2005.
- [28] “Sylgard 184 silicone elastomer.” <https://www.dow.com/en-us/pdp/sylgard-184-silicone-elastomer-kit.01064291z.html>.
- [29] P. N. Prasad, *Introduction to biophotonics*. John Wiley & Sons, 2004.
- [30] A. Gibbons, O. Lang, Y. Kojima, M. Ito, K. Ono, K. Tanaka, and E. Sivaniah, “Real-time visualization of cardiac cell beating behaviour on polymer diffraction gratings,” *RSC advances*, vol. 7, no. 81, pp. 51121–51129, 2017.
- [31] E. G. Loewen and E. Popov, *Diffraction gratings and applications*. CRC Press, 2018.
- [32] A. Guglielmelli, S. Nemati, A. E. Vasdekis, and L. De Sio, “Stimuli responsive diffraction gratings in soft-composite materials,” *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 52, no. 5, p. 053001, 2018.
- [33] K. Hosokawa and R. Maeda, “In-line pressure monitoring for microfluidic devices using a deformable diffraction grating,” in *Technical Digest. MEMS 2001. 14th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (Cat. No. 01CH37090)*, pp. 174–177, IEEE, 2001.
- [34] K. Hosokawa, K. Hanada, and R. Maeda, “A polydimethylsiloxane (pdms) deformable diffraction grating for monitoring of local pressure in microfluidic devices,” *Journal of micromechanics and microengineering*, vol. 12, no. 1, p. 1, 2001.
- [35] J. A. Rogers, R. J. Jackman, O. J. Schueller, and G. M. Whitesides, “Elastomeric diffraction gratings as photothermal detectors,” *Applied optics*, vol. 35, no. 34, pp. 6641–6647, 1996.
- [36] O. J. Schueller, D. C. Duffy, J. A. Rogers, S. T. Brittain, and G. M. Whitesides, “Reconfigurable diffraction gratings based on elastomeric microfluidic devices,” *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 78, no. 2-3, pp. 149–159, 1999.
- [37] G. Ye and X. Wang, “Glucose sensing through diffraction grating of hydrogel bearing phenylboronic acid groups,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, no. 2, pp. 772–777, 2010.
- [38] Y. Ruiz Hernández, “Fabricación y caracterización de un chip de inflamamiento para proporcionar estímulos mecánicos a células,” 2020.
- [39] V. Rodwell, D. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennelly, and P. A. Weil, *Harpers illustrated biochemistry 31st edition*. McGraw Hill Professional, 2018.

- 
- [40] A. Bonnomet, C. Terryn, J. Cutrona, A. Jonquet, P. Birembaut, and J.-M. Zahm, “Analysis of cell dispersion and migration by video-microscopy,” in *Methods in enzymology*, vol. 505, pp. 233–254, Elsevier, 2012.
- [41] W. Nijhuis, D. Eastwood, J. Allgrove, I. Hvid, H. Weinans, R. Bank, and R. Sakkers, “Current concepts in osteogenesis imperfecta: bone structure, biomechanics and medical management,” *Journal of children’s orthopaedics*, vol. 13, no. 1, pp. 1–11, 2019.