Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California



Programa de Posgrado en Ciencias

en Óptica

Diseño de un sistema optofluídico generador de gradiente

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de Maestro en Ciencias

Presenta:

Pedro Reynaldo Martínez Manuel

Ensenada, Baja California, México 2015 Tesis defendida por

Pedro Reynaldo Martínez Manuel

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Víctor Ruíz Cortés Director del Comité

Dra. Alma Georgina Navarrete Alcalá

Dra. Elena Tchaikina Kolesnikova

Dr. Rubén Darío Cadena Nava



Dr. Pedro Negrete Regagnon Coordinador del Posgrado en Óptica

Dra. Rufina Hernández Martínez Director de Estudios de Posgrado Resumen de la tesis que presenta Pedro Reynaldo Martínez Manuel como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Óptica con orientación en Optoelectrónica.

Diseño de un sistema optofluídico generador de gradiente

Resumen aprobado por:

Dr. Víctor Ruíz Cortés Director de tesis

En este trabajo se presenta el diseño y fabricación de un microdispositivo optofluídico generador de gradiente de densidad al cual se le implementa un sistema de confinamiento óptico mediante fibras ópticas dentro del área de análisis del dispositivo, donde mediante haces de luz guiados en las fibras, efectúan el asimiento de partículas micrométricas. El objetivo principal de este proyecto es el de desarrollar un sistema microfluídico que sea capaz de generar un gradiente de concentración de soluciones que por medio de difusión después de recorrer los microcanales del dispositivo, estos fluidos se diluyen obteniendo a la salida del sistema un gradiente de densidad. En el caso de utilizar biopartículas, dicho gradiente influirá un movimiento quimiotáctico en ellas hacia la mayor concentración de nutrientes, siendo a la salida del dispositivo, la zona donde se efectúa el estudio de movimiento y confinamiento de micropartículas. El confinamiento de tales partículas se realizó mediante el efecto de la presión de radiación de la luz, en donde las fuerzas de radiación actúan sobre partículas micrométricas, sujetándolas al atravesar el haz de propagación de las fibras ópticas, las cuales están situadas transversalmente dentro de los microcanales fabricados. Asimismo, se realizó el asimiento de microorganismos vivos, utilizando en este trabajo microalgas Isochrysis microcanales fabrican elastómero sp. Los se en polidimetilsiloxano (PDMS) a partir de moldes diseñados en AutoCAD. Los moldes son fabricados en una impresora láser 3D, lo que permite reducir el tiempo de fabricación comparado con un método de fotolitografía convencional.

Palabras clave: dispositivo microfluídico, gradiente, confinamiento, microalgas *lsochrysis sp.*

Abstract of the thesis presented by **Pedro Reynaldo Martínez Manuel** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Optic with orientation in Optoelectronic

Design of a system optofluidic gradient generator

Abstract approved by:

Dr. Víctor Ruíz Cortés Director thesis

In this thesis the design and fabrication of an optofluidic microdevice for density gradient generation is presented; this device implements an optical trapping system based on optical fibers inside the analysis area; where by means of light beams guided the fibers, the microparticles are trapped within the device. The main objective of this project is to develop a microfluidic system capable of generating a concentration gradient of solutions, by means of diffusion after going through the micro-channels of the device; these fluids are diluted along the micro-channels to obtain a density gradient at the outlet of the system. In case of using living cells, such gradient causes a chemotactic movement of living particles toward higher nutrient concentration. The trapping of particles is based on the action of radiation pressure of light, wherein the radiation forces act upon the microparticles by means of laser beams coming from a pair of optical fiber, which are transversally located to the manufactured microchannels. In addition, we also present results on confinement of living cells, the algae *lsochrysis sp.* The microchannels are made in elastomer polydimethylsiloxane (PDMS) from masters designed in AutoCAD. The masters are fabricated in a 3D laser printer; allowing to reduce manufacturing time compared to a conventional photolithography method.

Dedicatoria

El trabajo de tesis aquí realizado, está dedicado:

A mis padres Pedro Martínez Sánchez y Elodia Manuel Guzmán.

A mis hermanos Rodolfo Martínez Manuel y Leopoldo Martínez Manuel.

A mi familia Alexis Monserrat Mendoza Caudillo

y principalmente a mi hija BRIDA MONSERRAT MARTÍNEZ MENDOZA.

A todos mis amigos y familiares

Agradecimientos

Quiero agradecer a mis padres, por el apoyo y entereza que a lo largo de todo este camino han tenido para conmigo y mis hermanos.

A mis hermanos, que fueron un gran soporte en los momentos más difíciles.

A mi familia por su compañía durante este trabajo de tesis, a mi hija que fue todo el tiempo el motor que día a día me ha mantenido funcionando.

A mi director de tesis, el Dr. Víctor Ruíz Cortés por todo el apoyo y tiempo que me brindo en este lapso, además quiero agradecerle por toda la ayuda y consejos para optimizar el trabajo aquí realizado.

Al comité de tesis, por aceptar formar parte del proyecto aquí presentado.

A mis compañeros de generación, gracias por su apoyo y amistad y esos buenos momentos que pasamos durante la maestría.

A Miguel Farfán y a Marcia por su asistencia y el material que me fue dedicado, también a Alma González por auxiliarme con la impresora tantas veces.

A mis compañeros de laboratorio, en especial a Carlos Aguirre por su contribución con la bomba de inyección y a Manuel Villaseñor por apoyarme siempre que necesité durante este trabajo.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por el apoyo brindado durante la realización del posgrado.

Finalmente, a todos los que hizo falta mencionar muchas gracias por su apoyo.

Tabla de contenido

	Página
Resumen español	ii
Resumen inglés	iii
Dedicatorias	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	xii

Capítulo 1. Introducción

1.1	Objetivo general	7
1.2	Objetivos particulares	7
1.3	Estructura de la tesis	8

Capítulo 2. Metodología

PDMS (polidimetilsiloxano)	9
Impresora 3D	10
Fabricación del sistema microfluídico	12
Diseño del dispositivo microfluídico	13
Impresión del diseño	16
Fabricación de microcanales en PDMS	18
Unión PDMS-Sustrato	20
Dispositivos Microfluídicos	22
	PDMS (polidimetilsiloxano) Impresora 3D Fabricación del sistema microfluídico Diseño del dispositivo microfluídico Impresión del diseño Fabricación de microcanales en PDMS Unión PDMS-Sustrato Dispositivos Microfluídicos

Capítulo 3. Aspectos teóricos de microfluídica y asimiento óptico

3.1 Régimen de flujo	23
3.2 Sistemas microfluídicos modelados como circuitos eléctricos	26
3.2.1 Sistemas fluídicos en paralelo y serie	27
3.3 Ecuación de Navier-Stokes	28
3.3.1 Fluido en un canal rectangular	29
3.3.2 Concentración volumétrica	30
3.3.3 Difusión en los microcanales	31
3.4 Red de microcanales	34
3.5 Asimiento	36

3.6Fuerza de radiación de la luz.....37

Capítulo 4. Resultados y discusión

4.1	Arreglo óptico	42
4.2	Dispositivo tipo "Y"	45
4.3	Generador de gradiente	52
4.4	Generador de gradiente con asimiento óptico	55

Capítulo 5. Conclusiones

5.1 Fabricación	65
5.2 Dispositivos microfluídicos	65
5.2.1 Dispositivo tipo "Y"	65
5.2.2 Dispositivo generador de gradiente de densidad	66
5.2.3 Dispositivo generador de gradiente de densidad	
con asimiento óptico	66
5.3 Trabajo a futuro	67
Liste de referencies hibliográficos	60
Lista de referencias didilograficas	69

Lista de figuras

Figura

1	Dispositivo microfluídico "Lab on a chip" de diagnóstico, simple y económico (George M. Whitesides, 2006)	2
2	Diseño esquemático de una red microfluídica de un chip generador de gradiente (Jeon et al. 2000)	4
3	Esquema del interruptor, donde el haz de asimiento dirige una microesfera entre dos fibras monomodo (SMF). El grado de acoplamiento entre las dos fibras depende de la posición de la microesfera (Domachuck et al., 2005)	5
4	Esquema del dispositivo de trampa con fibra hecho a base de PDMS, la flecha roja muestra el microcanal y las fibras ópticas se señalan con flechas azules (Marchington, 2010)	6
5	Muestra al PDMS (polidimetilsiloxano), el cual es un elastómero viscoelástico y tiene la capacidad de ser moldeable. Imagen tomada de: http://www.elveflow.com/.	9
6	Impresora de alta resolución 3D Form +1 de la compañía Formlabs y torre Eiffel a escala fabricada en la impresora. Imagen tomada de: http://formlabs.com/	11
7	Diagrama de flujo para la fabricación de los dispositivos microfluídicos	13
8	Diseños realizados en AutoCAD. Maestro del dispositivo tipo "Y" a) en el plano 2D y a-1) en 3d, b) y b-1) Maestro del generador de gradiente visto en 2D y 3D respectivamente, c) Plano 2D del Generador de gradiente con microcanales para fibra óptica y c-1) su perspectiva en 3D.	15
9	Impresora láser Form+1 fabricando el Maestro	16
10	Contenedores con alcohol utilizados para hacer limpieza de los moldes de resina	17
11	Maestros fabricados con resina transparente en la impresora láser	18
12	Se muestran los pasos mencionados para realizar microcanales con el elastómero en conjunto con el molde de resina. a) molde en caja de Petri, b) báscula digital, c) vertido del PDMS en el molde, d) bomba de vacío, e) horneado y f) desprendimiento del molde y cortado del PDMS.	20

13	Pistola corona para tratamiento de plasma que logra una adherencia irreversible del PDMS al vidrio	21
14	Tratamiento de plasma sobre el PDMS y el portaobjeto con la pistola corona	21
15	Dispositivos microfluídicos fabricados y utilizados durante este trabajo. a) Dispositivo tipo Y, b) dispositivo generador de gradiente y c) dispositivo generador de gradiente con microcanales para fibra óptica	22
16	Circulación de un fluido con régimen a) laminar y b) turbulento. Imagen tomada de: www.kultec.com	25
17	Flujo impulsado por presión en una red de canales paralelos (Lee et. al, 2007)	27
18	Esquema de mezcla difusiva en un canal prolongado de longitud <i>L</i> (Kwang et al. 2011)	32
19	Red microfluídica generadora de gradiente con tres soluciones, verde, rojo y la combinación de estos dos, recombinándose entre las ramificaciones del dispositivo (Stephan et al., 2001)	35
20	Generación de gradientes con formas lineales en un diseño de red de 2 entradas/11 salidas, con la longitud de los canales modificada (indicado en mm). H. A. Yusuf, 2009	35
21	a) Gradiente de intensidad transversal de un haz de luz láser y su proyección en una pantalla. (b-d) Procesos de interacción entre un haz de luz y una partícula (Sepúlveda, Vargas y García, 2007)	39
22	Esquema del asimiento de una partícula por fibra óptica, mediante las fuerzas de radiación de la luz (Steffen Grosser, 2015)	40
23	Esquema del arreglo óptico formado para analizar los dispositivos microfluídicos	43
24	Arreglo óptico para analizar los dispositivos mediante captura de video e imágenes	44
25	Bomba de doble inyección NE-4000 utilizada para suministrar sustancias a los microcanales. b) Bomba de inyección modificada Razel	45

26	Dispositivo microfluídico tipo "Y" fabricado para estudiar las longitudes de difusión de las soluciones (en este caso, tinta azul y amarilla)	45
27	Dispositivo "Y" marcado en las áreas a analizar. Cada flecha marca un centímetro desde la unión de los canales; en las entradas tinta roja y agua	46
28	Microcanal de 600 μ m de ancho donde fluye un caudal de $20\mu l/hr$. Imagen tomada a 1 cm de la salida de las soluciones	46
29	Traza del perfil de densidad del microcanal con caudal de $20\mu l/hr$, a 1 cm	47
30	Imágenes del canal con caudal a 40µl/hr tomadas con la cámara Pixelink (lado izquierdo) y trazas de densidad de los canales graficadas en Matlab (lado derecho). a) 1 cm a la salida del canal, b) 2 cm a la salida del canal	48
31	Imágenes del canal con caudal a 55μl/h (lado izquierdo) y trazas de densidad (lado derecho). a) 1 cm a la salida del canal, b) 2 cm a la salida del canal, c) 3 cm a la salida del canal	49
32	Imágenes del canal con caudal a 80μ l/h (lado izquierdo) y trazas de densidad (lado derecho). a) 1 cm a la salida del canal, b) 2 cm a la salida del canal, c) 3 cm a la salida del canal, d) 4 cm a la salida del canal.	51
33	Figura 33. Comparativo de las longitudes de difusión en el dispositivo "Y" experimentales (puntos) y teóricas (línea continua)	52
34	Dispositivo microfluídico generador de gradiente. A las entradas se le inyectó tinta azul y tinta amarilla	53
35	Gradiente generado con tinta azul y amarilla en el canal del dispositivo (a). Traza del perfil de densidad del gradiente (b)	54
36	a) Gradiente generado con tinta azul y agua destilada en el canal de salida del dispositivo y b) traza del perfil de densidad del gradiente	55
37	Esquema del dispositivo generador de gradiente con fibra óptica. a) Vista del dispositivo en 3D, b) zona donde se realizará el asimiento con fibra óptica	56
38	Esquema del arreglo óptico utilizado para el dispositivo generador de gradiente y asimiento óptico	56

39 Dispositivo generador de gradiente con fibra óptica. Muestra dos soluciones mezclándose (entrada 1 agua y entrada 2 tinta roja), la entrada 3 funciona como acceso a partículas micrométricas 58

Б	0

40	a) Corte transversal esquemático 2D del canal microfluídico confinando una partícula mediante fibra óptica. b) Asimiento de partículas de 50 µm de diámetro dentro del dispositivo, mediante presión de radiación de la luz procedente de fibras ópticas (observado en el eje Z)	59
41	Microalgas marinas Isochrysis sp. (FAO, 2015)	59
42	a) Esquema 2D del arreglo para el dispositivo microfluídico. b-d) Asimiento de microalgas (<i>Isochrysis sp.</i>) por medio del haz de asimiento de la fibra óptica en el dispositivo microfluídico	60
43	Esquema del arreglo óptico desarrollado para el guiado de un láser infrarrojo (λ = 1064 nm) a través de fibras ópticas	62
44	(a-c) Secuencia de Imágenes donde se muestra el asimiento de microalgas de aproximadamente 10 μm de diámetro con una velocidad de flujo de 20 μl/hr	63
45	Movimiento quimiotáctico de las microalgas <i>Isochrysis sp.</i> a) mayor concentración de "buffer", b) concentración media de "buffer" y nutrientes, c) mayor concentración de nutrientes	64

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Parámetros usados para conocer la velocidad necesaria a utilizar en la bomba de jeringas	33
2	Muestra la longitud de difusión y su velocidad-caudal requerida para introducir en la bomba de jeringas	33
3	Potencias detectadas en el fotodiodo de cada diodo y de la luz acoplada en cada fibra	57
4	Potencias detectadas en el fotodiodo, del haz láser y de la luz acoplada en cada fibra	62

xiii

Capítulo 1

Introducción

En el ámbito de la bioingeniería, la reducción de las cantidades de reactivos bioquímicos en los análisis y el manejo de muestras de volúmenes muy reducidos son cruciales. En esta línea, la microfluídica constituye una herramienta clave, abriendo un amplio abanico de posibilidades mediante el desarrollo de micro-canales, microcámaras, y componentes activos como pueden ser microválvulas o microbombas, por mencionar algunos. Los materiales empleados en esta disciplina son principalmente; polímero polidimetilsiloxano (PDMS) de bajo costo, en combinación con técnicas estándar de micro y nano fabricación basadas en el silicio, pyrex o sustratos (CEIT, 2015).

La microfluídica es un campo de la ciencia que está alcanzando un crecimiento acelerado, un gran número de aplicaciones para procesos en microescala y microdispositivos surgen continuamente. Estos importantes avances han beneficiado, en particular, procesos de separación en biotecnología y en farmacéutica, así como análisis en la industria alimentaria, en diagnóstico médico y ambiental. A pesar de ser un campo que aún se encuentra en pleno progreso, el desarrollo de los dispositivos microfluídicos es considerable, ya que se han logrado micro-laboratorios, conocidos en inglés como "lab on a chip" (figura 1), que son capaces de llevar a cabo las funciones de equipos convencionales, con ventajas atractivas como reducción de tiempo de analisis, menor requerimiento de muestra y reactivos, portabilidad, mayor resolución y sensibilidad, y bajo costo. El desarrollo de este tipo de sistemas en microescala ha seguido avanzando, y una de las áreas con mayor potencial para estos sistemas es en el análisis y manipulación de células. La microfluídica es esencial para el desarrollo de herramientas para análisis celular, particularmente en el desarrollo de dispositivos para migración celular, ingeniería de tejidos, mecánica celular y estudios poblacionales o individuales de células. Actualmente, la detección o separación de células se realiza por métodos de microbiología tradicionales, que en su mayoría dependen de cultivos celulares, los resultados de algunos análisis pueden demorarse de 24 a 72 horas. En aplicaciones como análisis de contaminación de alimentos o cuerpos de agua, control

de calidad y análisis clínicos, se requieren métodos y sistemas que proporcionen resultados rápidamente. Es precisamente en este tipo de situaciones donde la microfluídica puede ser la solución requerida (Sósol, Marin, Rosales y Lapizco, 2012).



Figura 1. Dispositivo microfluídico "Lab on a chip" de diagnóstico, simple y económico (George M. Whitesides, 2006).

La manera en que una célula responde y se mueve hacia una señal química, es fundamental para muchos fenómenos biológicos y médicos incluyendo morfogénesis, respuesta inmune y metástasis del cáncer. Observaciones sistemáticas del comportamiento quimiotáctico. en ambientes meticulosamente controlados V sintonizables, son necesarios para complementar el avance en el descubrimiento de las vías bioquímicas. En los análisis de quimiotaxis típicos, perfiles de concentración son establecidos por difusión desde una fuente química a través de medios porosos. En la mayoría de estos casos, el perfil de concentración se establece lenta y continuamente, para cambiar en el tiempo. Pero tienen el inconveniente de que no permiten la eliminación de cualquier sustancia química liberada por las propias células. Esto puede influir significativamente en el ambiente químico de las células. Los dispositivos microfluídicos combinan una serie de características que las hacen perfectamente adecuadas para el estudio del comportamiento quimiotáctico. Además de que permite una manipulación precisa del perfil de concentración y reduce el tiempo de transición para establecer un gradiente lineal estable en el orden de unos pocos segundos o

menos. Los dispositivos microfluídicos también pueden controlar el gradiente de densidad de sustancias y realizar una distribución de concentración que cambia dinámicamente con un ambiente químico externamente controlable (Song *et al.* 2006).

En lo que se refiere a generadores de gradiente de microfluídos, estos operan bajo condiciones de flujo continuo. Consisten en la interacción de una mezcla difusiva y el movimiento de fluido para producir un perfil de concentración temporalmente estable bien definido. En la mayoría de los casos, los dispositivos microfluídicos se caracterizan por un movimiento de fluido que corre a través de canales lisos y uno podría suponer que este es el entorno de la célula.

El primer generador de gradiente de microfluídos (Jeon *et al.*, 2000), se basa en una red piramidal de canales que actúa como una cascada de mezcla para generar un gradiente lineal entre dos niveles de concentración elegidos arbitrariamente (figura 2). Soluciones de la concentración mínima y máxima se introducen en las entradas y se bombea continuamente a través del dispositivo. En cada bifurcación de la red piramidal, el flujo se divide en ramificaciones, superior e inferior y son mezclados por difusión con el líquido de los canales vecinos. En consecuencia, una serie de niveles de concentración equidistantes se generan entre las dos concentraciones de entrada, después todas las ramas son finalmente fusionadas en un solo canal para producir un gradiente lineal que está orientado perpendicular a la dirección de la corriente del fluido. Desde su invención, este tipo de dispositivos se ha utilizado en estudios de gradiente (Beta y Bodenschatz, 2011).



Figura 2. Diseño esquemático de una red microfluídica de un chip generador de gradiente (Jeon et al. 2000).

Por otra parte, de acuerdo a Psaltis, Quake y Yang (2006) la optofluídica se menciona como una clase de sistemas ópticos que se sintetizan con los fluidos. Los fluidos tienen propiedades únicas que no se pueden encontrar en equivalentes de sólidos, y estas propiedades se pueden utilizar para diseñar nuevos dispositivos. Ejemplos de tales cualidades incluyen: la capacidad de cambiar la propiedad óptica del medio líquido dentro de un dispositivo por simple sustitución de un fluido por otro; la interfaz ópticamente lisa entre dos fluidos inmiscibles; y la capacidad de hacer fluir corrientes de fluidos miscibles para crear gradientes en las propiedades ópticas por difusión. Integración y reconfiguración son dos ventajas principales asociadas con la optofluídica. Mientras que la microfluídica ha hecho posible integrar múltiples tareas de fluidos en un chip, la mayoría de los componentes ópticos, como la fuente de luz, sensores, lentes y guías de onda, se mantuvieron fuera del chip. La integración de la optofluídica combina la óptica y la microfluídica en el mismo chip mediante la construcción de la óptica en la misma caja de herramientas fluídica. La segunda ventaja de la optofluídica radica en la facilidad con la que uno puede cambiar las propiedades ópticas de los dispositivos tan solo manipulando fluidos.

Recientemente se han desarrollado métodos físicos eficientes para la separación de partículas en fluidos mediante el uso de estos dispositivos a través de: electroforesis el cual se basa en un campo eléctrico homogéneo; dielectroforesis, basado en campo eléctrico inhomogéneo; o acustoforesis, basado en ondas acústicas estacionarias (Hongxiang, Yao y Baojun, 2012).

En el artículo de Psaltis et al. (2006) se mencionan dispositivos en los cuales la óptica y la microfluídica son usados sinérgicamente para sintetizar funciones novedosas. Un ejemplo de este tipo de dispositivos es el realizado por Domachuk et al. (2005). El concepto general es: una microesfera que es atrapada ópticamente y es puesta enfrente de la puerta de salida de una guía de onda, en este caso fibra óptica, puede actuar como unos lentes ópticamente móviles para realizar manipulación con el haz de salida. Estirando la microesfera el haz puede ser desviado en un rango de direcciones. Dumachuk usó el método para crear un interruptor totalmente óptico, estirando la esfera entre dos guías de onda encontradas cara a cara separadas a corta distancia (figura 3).



Figura 3. Esquema del interruptor, donde el haz de asimiento dirige una microesfera entre dos fibras monomodo (SMF). El grado de acoplamiento entre las dos fibras depende de la posición de la microesfera (Domachuck et al., 2005).

En algunos trabajos como el de Marchington (2010), se explora la manipulación óptica de estas partículas por medio de los dispositivos microfluídicos fabricados a base de PDMS. En el que incluye la gestión de partículas tales como la inmovilización, la clasificación, la concentración, y el transporte de objetos de tamaño celular, junto con la detección y el tratamiento de células. La manera en la que se realiza es a través de la

introducción de fibra óptica para la transmisión de un haz laser. Lo cual queda implementado en un chip de trampa óptica de doble haz utilizando fibra de cristal fotónico (figura 4).



Figura 4. Esquema del dispositivo de trampa con fibra hecho a base de PDMS, la flecha roja muestra el microcanal y las fibras ópticas se señalan con flechas azules (Marchington, 2010).

Hace algunas décadas, se realizaron las primeras investigaciones de asimiento con fibra, tal es el caso del trabajo de Constable, Kim, Mervis, Zarinetchi y Prentiss (1993) donde se efectuó manipulación de pequeñas esferas dieléctricas mediante una trampa de fuerza óptica estable, fabricada con fibra óptica y basada en las pinzas ópticas de A. Ashkin (1970).

Tomando las ventajas que conllevan elaborar los "lab on a chip", el diseñar y fabricar un sistema microfluídico que toma la idea de controlar un gradiente de concentración y así poder analizar el movimiento quimiotáctico de partículas dentro de sus redes microfluídicas, es una de las ideas principales de este trabajo. Además, se ha observado que al combinar la microfluídica con la óptica, podemos obtener una distinta y novedosa herramienta para el análisis de partículas.

Por otro lado, el asimiento de partículas mediante luz, nos permite estudiarlas de una manera más selectiva. Es precisamente con base en estos principios que surge la idea de implementar un dispositivo microfluídico generador de gradiente de densidad fabricado con PDMS, el cual contenga un arreglo de pinzas ópticas dentro del chip, para realizar asimiento de partículas mediante fibras ópticas.

1.1 objetivo general

El objetivo principal de este proyecto es el de desarrollar un sistema microfluídico del tipo generador de gradiente, para la mezcla de fluidos que se encuentran en un régimen laminar que, por medio de difusión, después de recorrer los microcanales del dispositivo estos fluidos se diluyen, obteniendo a la salida del sistema una gradiente de densidad totalmente uniforme, dicho gradiente influirá un movimiento quimiotáctico de partículas vivas hacia la mayor concentración de alimento. Siendo a la salida del dispositivo, la zona donde se efectúa el estudio de movimiento y manipulación de partículas por medio de diodos láser proveniente de un arreglo de fibras ópticas.

1.2 Objetivos particulares:

- Diseño y elaboración de moldes para microcanales mediante impresora 3D.
- Desarrollo de microcanales tipo "Y" elaborados con PDMS para realizar experimentos.
- Obtención de longitudes de difusión en mezclas de fluidos inyectados en los microcanales mediante el uso de bombas de jeringa.
- Fabricación del dispositivo microfluídico generador de gradiente de densidad.
- Manipulación de partículas por medio de luz guiada en fibra óptica dentro de los microcanales del generador de gradiente.

1.3 Estructura de la tesis

- En el capítulo dos se explicará de manera específica el proceso realizado para elaborar el dispositivo microfluídico. Se hablará sobre el diseño y fabricación de moldes en impresora 3D, además de la técnica para realizar microcanales con PDMS.
- En el capítulo tres se expondrán las teorías utilizadas para desarrollar dispositivos microfluídicos, además de la física de fluidos que rigen el flujo para generar el gradiente de densidad; así como el concepto utilizado para el asimiento de partículas empleando fibra óptica con base en los experimentos con dispositivos optofluídicos de este tipo.
- En el capítulo cuatro se expondrán los resultados producidos durante el desarrollo del dispositivo además de mostrar el confinamiento de partículas en el sistema optofluídico.
- En el capítulo cinco se presentan las conclusiones obtenidas en el proceso de este proyecto. Además se plantea el trabajo a futuro para el dispositivo aquí expuesto.

Metodología

Los dispositivos generadores de gradiente son en la actualidad muy utilizados para realizar cultivos de bacterias, células y algunas partículas virales, así como mezclas altamente controladas de componentes químicos, además del análisis de algunas muestras, son algunos ejemplos de su empleo. Estos dispositivos tienen la ventaja de ser de bajo costo en su fabricación, además de una rápida respuesta comparado con los métodos tradicionales que comúnmente se realizan en laboratorios.

Dos de los elementos principales para la elaboración de estos sistemas microfluídicos son: el polímero PDMS y la impresora 3D. Dichos factores son de suma importancia para desarrollar el trabajo, y son descritos a continuación.

2.1 PMDS (polidimetilsiloxano)

Un material importante para este dispositivo es el PDMS (figura 5), el cual es un elastómero suave, ópticamente transparente, lo cual es importante para realizar este proyecto en el análisis de los dispositivos, además es inerte (en ella no se generan seres vivos como microorganismos indeseados), no tóxica y al ser un material hidrófobo es útil en este tipo de generadores donde se utilizan sustancias, y tiene la característica de ser moldeable conforme al diseño que el usuario requiera en el dispositivo.



Figura 5. Muestra al PDMS (polidimetilsiloxano), el cual es un elastómero viscoelástico y tiene la capacidad de ser moldeable. Imagen tomada de: http://www.elveflow.com/.

Para la fabricación de estos dispositivos optofluídicos existen diversas técnicas con distintos materiales, comúnmente se han utilizado técnicas litográficas aunado al uso de PDMS. En este proyecto se utiliza un método distinto al conocido en litografía para crear los moldes de los dispositivos.

2.2 Impresora 3D

Las impresoras 3D son máquinas que pueden fabricar piezas volumétricas, a partir de diseños 3D realizados en programas de "diseño asistido por computadora" CAD (por sus siglas en inglés). Dichas impresoras se han utilizado principalmente en la fabricación de componentes dirigidos al diseño industrial, aunque en la actualidad, se le está dando uso en el área biomédica, un ejemplo de esto, es cuando se necesitan prótesis para pacientes con alguna discapacidad; estas piezas pueden ser diseñadas en CAD con las características necesarias para cada paciente y posteriormente ser fabricadas con impresora.

Las impresoras 3D normalmente utilizan diversos polímeros como material de impresión, existen algunas que incluso pueden imprimir casas depositando cemento por capas, pero la mayoría de los modelos comerciales actualmente son de adición, o de inyección de polímeros, en las que el propio material se añade por capas.

También existen las impresoras 3D láser, en donde un láser transfiere energía para polimerizar un tipo de resina liquida, solidificando solo la pieza diseñada. Un ejemplo de estas piezas es mostrado en la figura 6, así como la impresora 3D; tal modelo de impresora será la utilizada para el trabajo de tesis.



Figura 6. Impresora de alta resolución 3D Form +1 de la compañía Formlabs y torre Eiffel a escala fabricada en la impresora. Imagen tomada de: <u>http://formlabs.com/</u>.

El funcionamiento de la mayoría de las impresoras, se basa en un inyector y cabezal que se mueve en 3 dimensiones XYZ, el software usa un diseño en 3D seccionado en capas de hasta 0.1 mm de espesor, por lo que la impresión se realiza capa por capa, una vez que el cabezal termina de inyectar el material para una capa, este se mueve en el eje Z y pasa a una segunda para realizar el mismo proceso. Debido a que el proceso es capa a capa, el tiempo de impresión suele tardar horas, y entre más complejo sea el modelo más tiempo demora.

En este proyecto se hizo uso de una impresora 3D para la fabricación de los moldes (maestros) que servirán para formar los microcanales en el PDMS y obtener así el dispositivo requerido. Las impresoras 3D dan una alternativa a la fotolitografía donde el tiempo de fabricación de los moldes puede ser reducido. Como se presenta en *top ten reviews* (2015), algunas impresoras son capaces de fabricar objetos con dimensiones máximas de 29 x 27 x 25 cm (x, y, z). Con medidas que pueden tener dimensiones mínimas de 1 µm (MIT technology review, 2015).

Para este trabajo de tesis, se utilizó la impresora 3D láser *Form1*+ de la compañía *Formalbs*. La impresora tiene una resolución con dimensiones máximas de 12.5 x 12.5

x 16.5 cm y puede construir con un grosor mínimo de 300 μ m y alturas de 25 μ m. Por otra parte la impresora utiliza un láser con longitud de onda de 405 nm y una potencia de 120 mW.

La técnica de fabricación de moldes en la impresora 3D tiene muchas ventajas sobre la fotolitografía, algunas son:

- El proceso de elaboración no requiere de recubrimiento por centrifugación, alineamiento de máscaras, tiempo de exposición a la luz, desarrollar soluciones o acceso a cuartos limpios.
- Ia impresora puede producir objetos con dimensiones de más de 100 mm Incluyendo alturas de hasta 200 mm
- el método es rápido (2 a 3 horas en el trabajo expuesto en esta investigación) y su nivel de complejidad es menor que la fotolitografía.
- Los materiales utilizados y el proceso no generan sustancias toxicas, por lo cual la impresora se puede utilizar en un ambiente de oficina.

Las desventajas de este método son:

- la resolución de la técnica para esta impresora, es baja (se pueden fabricar como mínimo canales de 250 μm de ancho). Aunque existen impresoras con mejor resolución (MIT technology review, 2015).
- \succ el material se puede deformar si es sometido a altas temperaturas.
- la rugosidad de la superficie podría limitar el desempeño óptico de las estructuras.

2.3 Fabricación del sistema microfluídico

En esta tesis se realizaron tres tipos de dispositivos microfluídicos, los cuales contribuyeron al desarrollo de nuestro objetivo. Siendo inicialmente construido un dispositivo microfluídico tipo "Y", con el fin de obtener las longitudes de difusión de las combinaciones de sustancias dentro de los canales; esta longitud de difusión será explicada detalladamente en el siguiente capítulo. También se fabricó el molde para el

generador de gradiente, el cual ayuda a obtener un gradiente de densidad bien definido. Y por último, se elaboró el maestro con el cual desarrollamos el dispositivo que contiene la fibra óptica, para el asimiento de partículas dentro de los canales.

Para poder desarrollar nuestros sistemas microfluídicos fue necesario realizar una serie de pasos, los cuales se presentan a continuación en orden consecutivo en este capítulo.

Los pasos para la fabricación de los dispositivos se describen en el siguiente diagrama de flujo (figura 7).





2.3.1 Diseño del dispositivo microfluídico.

Dado a que en este proyecto se usó una impresora 3D para realizar los moldes, es necesario primeramente, diseñar el molde del dispositivo mediante algún programa que genere archivos tipo CAD, ejemplos de dichos programas son: AutoCAD, Solidworks,

Sketchup, blender, OpenSCAD, por mencionar algunos. En este trabajo se utilizó Autocad 2015 como herramienta de diseño, debido a que ya se tenían ciertas nociones del programa.

Como se mencionó, inicialmente se fabricó un dispositivo "Y" para las pruebas de diseño, impresión, realización del PDMS, sellado del PDMS por plasma, bombeo de sustancias y medición de longitudes de difusión de estas últimas. El diseño del dispositivo tipo "Y" presentado en la figura 8a tiene dimensiones en su base de 25.4 mm de ancho, 76.2 mm de largo y 3 mm de alto. Mientras que los canales de entrada tienen forma rectangular con medidas de 100 µm de alto, 250 µm de ancho y 17 mm de largo. Por otra parte, el canal principal tiene dimensiones de 100 µm de alto, 660 µm de ancho y una longitud de 5.78 cm.

En lo que respecta al dispositivo generador de gradiente y al generador de gradiente con fibra óptica, se realizaron en el mismo software los diseños de los maestros.

El diseño del Molde para el dispositivo generador de gradiente se muestra en la figura 8b el cual cuenta con una base de 3 mm de alto, 50.8 mm de ancho y 76.2 mm de largo. Cuenta con tres entradas de 3 mm de diámetro, de las cuales dos son para introducir soluciones. Mientras que una tercera entrada será utilizada para incorporar partículas. Los canales en forma de serpiente tienen una altura de 1 mm y 400 µm de ancho. Por otro lado, a la salida de los canales serpenteados, el dispositivo cuenta con un canal principal el cual conecta a todos los demás. Este canal es la zona de análisis de nuestras partículas y cuenta con medidas de 1 mm de alto, 2 mm de ancho y 2 cm de largo.



Figura 8. Diseños realizados en AutoCAD. Maestro del dispositivo tipo "Y" a) en el plano 2D y a-1) en 3d, b) y b-1) Maestro del generador de gradiente visto en 2D y 3D respectivamente, c) Plano 2D del Generador de gradiente con microcanales para fibra óptica y c-1) su perspectiva en 3D.

Para el diseño del Molde del generador de gradiente con fibra óptica (figura 8c), se tienen las mismas medidas que en el molde anterior, con un cambio en el canal de la zona de análisis, el cual tendrá un canal transversal de 300 µm de ancho y 300 µm de alto justo 2 cm después de la conexión de todos los canales serpenteados.

2.3.2 Impresión del diseño

Después de realizar el diseño, el archivo CAD es importado a formato de archivo estereolitografía (.stl) el cual es el que reconoce la impresora. A partir de este punto, el archivo .stl es cargado en el programa de la impresora llamado *preform*, el cual es el vínculo entre la impresora y el archivo, y funciona para orientar la posición del objeto a imprimir y darle el tipo de resolución. El tiempo requerido para hacer este maestro es de aproximadamente 1 hora. Cabe mencionar, que en esta impresora existen 3 diferentes tipos de resoluciones por capa, siendo la más alta de 10 µm, la estándar de 25 µm y la más baja de 100 µm, para todos los dispositivos se utilizó la resolución estándar debido a que las demás resoluciones no afectan el diseño creado.



Figura 9. Impresora láser Form+1 fabricando el Maestro.

Finalizado el proceso de fabricación en la impresora (figura 9), se debe retirar el dispositivo de la platina con una espátula. El maestro queda con residuos de resina por lo cual es necesario pasar por un proceso de limpieza, el cual consiste en:

- (i) Introducir el molde en un contenedor con alcohol y agitarlo durante 2 minutos (figura 10).
- (ii) Depositar el molde en un segundo contenedor con alcohol y ponerlo en un baño limpiador ultrasónico durante 5 minutos, para terminar de quitar algunos residuos que pudieran quedar.
- (iii) Por último se retira el molde del contenedor y se termina de secar con una lámpara ultravioleta alrededor de 15 minutos, para que la resina se endurezca completamente.



Figura 10. Contenedores con alcohol utilizados para hacer limpieza de los moldes de resina.

En la figura 11 se exhiben los moldes finalizados, que nos ayudaran a realizar los dispositivos aquí propuestos. En la imagen 11a se tiene el maestro para el sistema tipo "Y", en 11b muestra el maestro para el generador de gradiente y 11c se presenta el maestro que se utilizará para el generador de gradiente con fibra óptica.

Una vez obtenido los moldes (figura11), se llevó a cabo el proceso de fabricación del sistema microfluídico. El maestro representa la estructura negativa (inversa) de la estructura deseada en PDMS.



Figura 11. Maestros fabricados con resina transparente en la impresora láser.

2.3.3 Fabricación de microcanales en PDMS.

Existen diversos procesos para plasmar los microcanales en el elastómero, que pueden variar en: el tiempo de horneado, tiempo de secado, tiempo y forma de pegado, etc. En esta tesis se realizó basándose en trabajos realizados anteriormente (Ayala, 2013 y López, 2013). La mayor diferencia en este trabajo, fue la de utilizar como maestro el molde grabado con la impresora láser 3D.

Se utilizó el elastómero Sylgard tipo 184 de la marca Corning, que consta de la combinación de dos sustancias, las cuales son una base de elastómero de silicón y un agente curador. Las proporciones utilizadas en este proyecto son de 10:1 gramos respectivamente, según las recomendaciones del producto. En el caso del dispositivo tipo Y utilizado fue de 22 gr de elastómero por 2 gr de curador.

a. Como primer paso se coloca el molde o maestro dentro de una caja de Petri previamente limpiado con alcohol, para contener ahí el molde y dar forma al PDMS.

- b. Se pesan las sustancias colocadas en un recipiente sobre una báscula digital en las proporciones indicadas y se revuelven por 3 minutos para que la mezcla sea uniforme (figura 12b).
- c. La mezcla se vacía sobre la caja de Petri y se esparce bien sobre el maestro.
- d. Se coloca la caja de Petri en una campana de vacío para eliminar burbujas de aire que pudieran modificar la estructura de los canales, esto se realiza por 40 minutos.
- e. Después del proceso de vacío, se tienen dos opciones para que el PDMS endurezca; (I) hornear 3 horas a 55°C y retirar del horno, o (II) dejar a temperatura ambiente 2 días, este paso con la finalidad de que el molde no se deteriore debido a la temperatura, ya que la resina no soporta altas temperaturas (≥78°C) por tiempos prolongados y comienza a deformarse.
- f. Finalmente pasado el periodo requerido, el PDMS endurecido se corta con una navaja y se retira del molde cuidadosamente para que no se fragmente.

Todos los pasos mencionados anteriormente, se ilustran en la figura (12).



Figura12. Se muestran los pasos mencionados para realizar microcanales con el elastómero en conjunto con el molde de resina. a) molde en caja de Petri, b) báscula digital, c) vertido del PDMS en el molde, d) bomba de vacío, e) horneado y f) desprendimiento del molde y cortado del PDMS.

2.3.4 Unión PDMS-sustrato

Existen diferentes maneras de pegar el PDMS a un sustrato (portaobjetos) como la unión en un sistema de vacío de plasma, y algunas más descritas en Haubert, Drier and Beebe (2006), en donde se recomienda utilizar un novedoso método a base de una pistola de plasma llamado sistema de descarga corona la cual se muestra en la figura 13. En este trabajo se utilizó la pistola mencionada para realizar el pegado.



Figura 13. Pistola corona para tratamiento de plasma que logra una adherencia irreversible del PDMS al vidrio. (Haubert, Drier and Beebe, 2006)

Primeramente se hace limpieza con alcohol isopropílico del portaobjetos que se va a unir con nuestros canales de PDMS, para que no haya residuos que pudieran dificultar la adherencia del PDMS al sustrato, y por último se seca muy bien con nitrógeno comprimido.

Una vez totalmente limpio el portaobjetos, se coloca con la cara a pegar hacia arriba a un lado del PDMS, que también deberá tener la parte a pegar hacia arriba. Se enciende la pistola corona y esta se hace pasar de lado a lado a una altura aproximada de 2 cm por encima del material a pegar durante 3 minutos como se muestra en la figura 14.



Figura 14. Tratamiento de plasma sobre el PDMS y el portaobjeto con la pistola corona.

Concluido este lapso, se coloca inmediatamente el PDMS sobre el portaobjetos y se presionan con algún peso durante 5 horas, esto con el objetivo de asegurar la unión de los materiales.

2.3.5 Dispositivos microfluídicos

En este trabajo se sigue el mismo proceso de fabricación para los tres tipos de dispositivos; el dispositivo "Y", el dispositivo generador de gradiente y el generador de gradiente con fibra óptica. En la figura 15 se muestran los dispositivos realizados durante este trabajo con el método de fabricación mencionado.



Figura 15. Dispositivos microfluídicos fabricados y utilizados durante este trabajo. a) Dispositivo tipo Y, b) dispositivo generador de gradiente y c) dispositivo generador de gradiente con microcanales para fibra óptica.
Aspectos teóricos de microfluídica y asimiento óptico.

En el capítulo anterior, se ha descrito la manera de fabricar microcanales y la justificación de su caracterización para ser utilizados en diferentes propósitos y posibles aplicaciones. En este capítulo se explicará el régimen de los fluidos dentro de estos canales, además de la física que constituye el generador de gradiente.

El comportamiento de los fluidos en escalas micrométricas puede diferir de los macrofluidos en factores como la tensión superficial, disipación de energía y la resistencia fluídica en el sistema. La microfluídica estudia cómo cambiar estos comportamientos y la forma en que se puede trabajar en su entorno o exploraciones para nuevos usos. Por otro lado, un parámetro importante es que la relación de superficie por volumen es muy alta, por lo que cualquier reacción química en un microfluido se ve muy acelerada.

Algunos efectos que puede aprovechar la fluídica en el dominio de los micrómetros son:

- Volúmenes pequeños (μ*L*, *nL*, *pL*, *fL*)
- Tamaños diminutos
- Bajo consumo de energía
- Flujo laminar
- Tensión superficial
- Electro-humedecimiento
- Rápida relajación térmica
- Cargas eléctricas superficiales
- Difusión

3.1 Régimen de flujo

De la lista anterior debemos tener muy en cuenta el flujo laminar, debido a que dicho flujo es el que rige el movimiento de los fluidos y las partículas en este trabajo de investigación.

Cuando dos o más partículas se encuentran en movimiento dentro de un flujo, existe un gradiente de velocidad, es decir que unas partículas se mueven más rápido que otras, y tienden a desarrollarse fuerzas de fricción que actúan tangencialmente a las mismas.

Las fuerzas de fricción que se producen tratan de introducir rotación entre las partículas, pero simultáneamente la viscosidad trata de impedir dicha rotación. Dependiendo del valor relativo de estas fuerzas se pueden producir diferentes estados de flujo.

Cuando el gradiente de velocidad es bajo, la fuerza de inercia es mayor que la de fricción, las partículas se desplazan pero no rotan, o lo hacen pero con muy poca energía; dando como resultado final un movimiento en el cual las partículas siguen trayectorias definidas, y todas las partículas que pasan por un punto en el campo del flujo siguen la misma trayectoria. Este tipo de flujo fue identificado por Osborne Reynolds y se denomina "laminar", queriendo significar con ello que las partículas se desplazan en forma de capas o láminas.

Por el contrario, si el gradiente de velocidad aumenta, entonces se incrementa la fricción entre partículas vecinas al fluido, y estas adquieren una energía de rotación apreciable, además de que la viscosidad tiene un menor efecto, y debido a la rotación las partículas cambian de trayectoria. Al pasar de unas trayectorias a otras, las partículas chocan entre sí y cambian de rumbo en forma errática, a éste tipo de flujo se denomina "turbulento" (EIA, 2012). Estos regímenes se muestran en la figura 16.



Figura 16. Circulación de un fluido con régimen a) laminar y b) turbulento. Imagen tomada de: mecatrónica, 2015.

El flujo "turbulento" se caracteriza por:

- Las partículas del fluido no se mueven siguiendo trayectorias definidas.
- La acción de la viscosidad es despreciable.
- Las partículas del fluido poseen energía de rotación apreciable, y se mueven en forma errática chocando unas con otras.
- Al entrar las partículas de fluido a capas de diferente velocidad, su momento lineal aumenta o disminuye, y el de las partículas vecinas lo hacen en forma contraria.

Reynolds estableció una relación que permite definir el tipo de flujo que posee un determinado sistema de fluidos (O. Reynolds, 1883). Para cuantificar esta idea considérese una esfera con radio *l* trasladándose con una velocidad *U* a través de un líquido con viscosidad μ y densidad ρ . La aceleración típica del fluido moviéndose alrededor del objeto es $U/\Delta t$, donde $\Delta t \approx l/U$ es el lapso típico sobre el cual los cambios ocurren en el fluido cuando la partícula se mueve. Entonces el número de Reynolds se define como (Lee, Ham and Westervelt, 2007)

$$\frac{masa \cdot aceleración}{fuerzas \ viscosas} = \frac{\rho Ul}{\mu} = \mathcal{R}.$$
(1)

El número de Reynolds \mathcal{R} es un parámetro adimensional que permite caracterizar las circunstancias del flujo. Para un flujo entre placas paralelas, si se toma como dimensión característica el espaciamiento de éstas, el número de Reynolds máximo que garantiza flujo laminar es 1000.

Experimentalmente se ha encontrado que en conductos de sección circular cuando el número de Reynolds pasa de 2400, se inicia la turbulencia en la zona central del tubo, sin embargo este límite es muy variable y depende de las condiciones de quietud del conjunto. Para números de Reynolds mayores de 4000 el flujo es turbulento. Al descender la velocidad se encuentra que para números de Reynolds menores de 2100 el flujo es siempre laminar, y cualquier turbulencia que se produzca es eliminada por la acción de la viscosidad (EIA, 2012).

3.2 Sistemas microfluídicos modelados como circuitos eléctricos

La ley de ohm es una de las reglas fundamentales para el diseño de circuitos eléctricos, la cual relaciona el cambio de potencial eléctrico ΔV a la corriente *I* en su forma sencilla $\Delta V = IR$. La resistencia *R* es dependiente al sistema, materiales, etc.

Dicha descripción algebraica para caracterizar el diseño de circuitos, tiene su forma análoga en el transporte de flujo en redes microfluídicas. Consideremos ahora un flujo de fase única. En lugar de parámetros como carga, potencial, resistencia, por mencionar algunos básicos, en microfluídica se hace un seguimiento a la razón de masa (por ejemplo, un cambio de presión) y a la viscosidad del fluido, que es una medida de la resistencia del fluido al movimiento. En muchas circunstancias, el movimiento de los fluidos es suficientemente simple que una relación lineal se puede aplicar entre el forzamiento (presión) y la salida, por ejemplo, la velocidad de flujo de líquido.

Considérese la figura 17, donde se estima que la diferencia de presión $\Delta \rho$ en la entrada es más alta que la presión a la salida. En el esquema se presenta (figura 17a), la taza de flujos Q_i , en cada uno de los tres canales en paralelo. Las velocidades de flujo individuales están relacionados con el caudal total por $Q = Q_1 + Q_2 + Q_3$, y la caída

de presión $\Delta \rho$ y Q están relacionadas por $\Delta \rho = QR_H$, donde R_H es la resistencia hidrodinámica equivalente. En este caso, ya que la misma caída de presión actúa a través de cada canal, entonces para cada elemento es $\Delta \rho = Q_i R_{Hi}$. La representación equivalente como un circuito eléctrico en paralelo se muestra en la figura 17b.



Figura 17. Flujo impulsado por presión en una red de canales paralelos (Lee et. al, 2007).

La resistencia hidrodinámica R_H está en función de la geometría del canal y la viscosidad del fluido en el canal. A un número de Reynolds suficientemente alto, podemos esperar que exista turbulencia y por lo tanto la resistencia R_H es también una función de la velocidad media del fluido o del número de Reynolds (Lee, *et al.*, 2007).

3.2.1 Sistemas fluídicos en paralelo y serie

Si se toman *N* elementos con resistencias individuales R_m , $m = \cdots$, *N*. En las dos situaciones más sencillas que existen, las resistencias pueden estar conectadas en serie o en paralelo.

Cuando los elementos son colocados en serie, entonces tenemos que la resistencia R_{ef} efectiva de la combinación es:

$$R_{ef} = \sum_{m=1}^{N} R_m.$$
⁽²⁾

Por otra parte, si los elementos son puestos en paralelo, la resistencia efectiva es:

$$\frac{1}{R_{ef}} = \sum_{m=1}^{N} R^{-1}{}_{m}.$$
(3)

El mismo resultado podemos aplicar a las redes fluídicas, con la diferencia de que se utiliza la resistencia hidrodinámica R_H en vez de la resistencia R (Lee *et al.*, 2007).

3.3 Ecuación de Navier-Stokes

En dispositivos microfluídicos, los fluidos (principalmente agua y soluciones acuosas) son aproximados propiamente como incompresibles. Por lo tanto, si se considera la ecuación de Navier-Stokes para fluidos newtonianos uniforme-viscosos incompresibles sin fuerzas de cuerpos.

$$\rho \; \frac{\partial \vec{U}}{\partial t} = -\rho \vec{U} \nabla \vec{U} - \Delta \rho + \eta \Delta^2 \vec{U}, \tag{4}$$

(razón de cambio de momento) =

donde \vec{U} es el campo de velocidad $[ms^{-1}]$, el cual hace una descripción de la velocidad del fluido en un punto dado en espacio y tiempo; y es expresado como $\vec{U} = \vec{U}(\vec{r},t)$, donde \vec{r} es un vector de posición que indica un lugar en el espacio [m], t es el tiempo $[s], \rho$ es la densidad de fluido $[kg m^{-3}]$ y η es la viscosidad [Pa s] (por lo regular se utiliza el símbolo μ), y p es la presión [Pa]. Cabe mencionar que la viscosidad es dependiente de la temperatura; el fluido se vuelve menos viscoso mientras la temperatura se incremente. La ecuación de Navier-Stokes nos dicta la velocidad en lugar de la posición. Y una vez que el campo de velocidad se resuelve, otras cantidades de interés (velocidad de flujo, caída de presión, resistencia hidráulica, etc.) se pueden encontrar (Kwang, Kangsun, Byungwook and Furlan, 2011).

3.3.1 Fluido en un canal rectangular

De acuerdo a Lee *et al.* (2007), la mayoría de los canales microfluídicos tienen forma rectangular o secciones transversales rectangulares, esto es debido a los métodos de fabricación que existen. Considerando el caso más común en el cual el canal es mucho más ancho que alto $h \ll w$. Para un flujo manipulado por presión, donde una caída de presión Δp actúa sobre una longitud *L*, el perfil de velocidad a través del canal es parabólico

$$u(y) = \frac{\Delta p}{2\mu L} \left[\left(\frac{h}{2}\right)^2 - y^2 \right].$$
(5)

El flujo correspondiente en un canal con ancho *w* es aproximadamente:

$$Q = w \int_{0}^{h} u(y) = \frac{w \Delta p h^{3}}{12\mu L},$$
(6)

con una velocidad promedio,

$$U = \frac{h^2 \Delta p}{12\mu L}.$$
(7)

La permeabilidad correspondiente es $k = h^2/12$, y la resistencia hidrodinámica es:

$$R_H = \frac{12\mu L}{(wh^3)}.$$
(8)

En las ecuaciones 5-8 (Lee et al., 2007), es evidente que las dimensiones de las redes microfluídicas, principalmente el ancho del canal, influyen de manera importante en el comportamiento de la velocidad del fluido dentro del canal.

3.3.2 Concentración volumétrica

Las redes de los microcanales nos permiten conocer de manera precisa y predecible el porcentaje de mezcla volumétrica de dos soluciones (por ejemplo, el medio y la muestra). Por lo tanto, se puede generar un conjunto de concentraciones de volumen bien definidas (también llamadas fracciones de volumen) donde dicha concentración esta descrito como la taza de flujo volumétrico de una muestra dividida por el total de la tasa de flujo volumétrico de la mezcla antes de mezclarse. Si la concentración inicial de un medio es diferente de cero ($C_{Med} \neq 0$), el valor de la concentración ($0 \le C \le 1$) de la mezcla después de mezclarse completamente será:

$$C = \frac{Q_{med}}{(Q_{Med} + Q_{Mu})} Q_{Mu} + \frac{Q_{Mu}}{(Q_{Mu} + Q_{Med})} Q_{Med},$$
(9)

donde Q_{med} es el porcentaje de flujo volumétrico del medio con la concentración inicial C_{Med} ($0 \le C_{Med} \le 1$) antes de mezclarse y Q_{Mu} es el porcentaje de flujo volumétrico de la muestra con la concentración inicial C_{Mu} ($0 \le C_{Mu} \le 1$) antes de mezclarse (Kwang, Lee, Ahn and Furlan, 2011).

3.3.3 Difusión en los microcanales

Si fuera necesaria la mezcla completa de dos o más soluciones, la longitud de los canales L[m] suficiente para permitir una mezcla uniforme es $L > L_D$, donde L_D es la longitud de difusión la cual es la distancia mínima requerida para lograr la mezcla total por difusión en los microcanales (figura 18). La longitud de difusión de las moléculas para un líquido en un tiempo t[s] depende del coeficiente de difusión de las moléculas $D[m^2s^{-1}]$ (Kwang, *et al.*, 2011)

$$L_D = \sqrt{2Dt}.$$
 (10)

Para permitir la mezcla con una reducida longitud del canal y/o aumento de las tasas de flujo de operación, además de números de Reynolds (Re> 1) manteniéndose en un flujo laminar, necesitamos incluir diseños de "micromezcladores" en la trayectoria del flujo para mejorar los efectos de mezcla de difusión o convección; una gran variedad de micromezcladores se han utilizado para este fin (N. T. Nguyen y Z. G. Wu, 2005). Cabe mencionar que en este proyecto se utilizaran micromezcladores en forma de canales "serpenteados".

En general, una configuración simétrica de micromezcladores en líneas de flujo conectados en paralelo nos permitirá utilizar el método de división de flujo para el diseño como se muestra en la figura. En esta configuración específica, nuestro interés se centra en la concentración relativa entre las resistencias hidráulicas de los canales con las mismas estructuras de micromezcladores, no en sus valores numéricos

absolutos. Se infiere que los micromezcladores con la misma longitud y estructura están conectados en paralelo desde un nodo (o canal común) al otro. Por consiguiente, sus resistencias hidráulicas y las caídas de presión entre los dos nodos serán iguales entre sí. Por lo tanto, la relación de velocidades de flujo divididos en cada canal micromezclador será igual a "uno" e invariable a una amplia gama de velocidades de flujo de operación o números de Reynolds (Kwang et al. 2011).



Figura 18. Esquema de mezcla difusiva en un canal prolongado de longitud L (Kwang et al. 2011).

Para poder realizar difusión de soluciones dentro de los dispositivos como se requiere, es necesario calcular la velocidad de flujo. La velocidad fue calculada a partir del tiempo de difusión *t* utilizando la ecuación 10 y longitudes propuestas (1 cm, 2 cm, etc.) para realizar tal difusión. Las longitudes y velocidades obtenidas, se muestran en la tabla 2, la constante de difusión utilizada es de $1x10^{-9} \left(\frac{m^2}{s}\right)$.

Por otra parte, la bomba de jeringas trabaja con parámetros de caudal $(ml/hr, \mu l/hr, ml/min, \mu l/min)$, por tal razón fue necesario convertir la velocidad a caudal volumétrico. Utilizando todos los parámetros necesarios en la ecuación 7, de donde se despeja la diferencia de presión Δp . Aplicando este resultado a la ecuación 6 obtenemos el caudal Q. (1 cm, 2 cm, etc.). Los parámetros utilizados para resolver las ecuaciones, se muestran en la tabla 1.

Símbolo	Nombre	Medida
W	Ancho del canal	660 μ <i>m</i>
D	Constante de difusión	$1x10^{-9}\left(\frac{m^2}{s}\right)$
μ	Viscosidad	0.001 <i>Pa</i> · s
L	Longitud del canal	5.78 cm
h	Altura del canal	100 μ <i>m</i>

Tabla 1. Parámetros usados para conocer la velocidad necesaria a utilizar en la bomba de jeringas.

Los resultados obtenidos con la ecuación 6 para cada longitud de difusión, se muestran en la tabla 2, en donde obtuvimos la velocidad a la que la bomba debe seleccionarse. Cabe mencionar que los parámetros de la tabla 1 y tabla 2 solo son aproximaciones, esto es debido a que no se tiene una constante de difusión precisa de la tinta por lo tanto ésta se consideró similar a la constante de difusión del agua; por consiguiente, se asumió la viscosidad de la tinta equivalente a la del agua.

Tabla 2. Muestra	a la longitud	de dif	usión y	su velocidad	d-caudal	requerida	para	introducir	en	la
bomba de jeringa	as									

Longitud de difusión	Velocidad	Caudal
1 cm	1.8 x 10 ⁻⁴ m/s	20.7 μ <i>l/hr</i>
2 cm	3.6 x 10 ⁻⁴ m/s	41.4 μ <i>l/hr</i>
3 cm	5.5 x 10 ⁻⁴ m/s	56.5 μ <i>l/hr</i>
4 cm	7.3 x 10 ⁻⁴ m/s	82.8 μ <i>l/hr</i>

Estos resultados numéricos son utilizados para obtener un perfil de concentración uniforme en el dispositivo tipo "Y" y son analizados a detalle en el capítulo 4.

3.4 Red de microcanales

Una red piramidal de microcanales, propuesta originalmente por el grupo Whitesides (Jeon *et al.*, 2000), es la manera más popular de generar gradientes de concentración (figura 19). La generación de los gradientes se basa en la mezcla difusiva completa de fluidos por una repetida división, mezcla y recombinación de las corrientes de fluido a través de redes piramidales. Las resistencias hidráulicas, así como los caudales volumétricos, se mantienen iguales para todos los canales de mezcla verticales dentro de cada rama. Para un análisis sencillo, se hizo la aproximación de que la resistencia de los canales horizontales es insignificante en comparación con la resistencia de los canales verticales debido a que la longitud de los canales horizontales puede ser en algunos casos mucho menor que la de las verticales.

La variación estática o dinámica de las razones de flujo de entrada y concentraciones iniciales de las soluciones del medio y de la muestra y / o números y configuraciones de puertos de entrada podría dar lugar a gradientes de concentración de formas complejas (por ejemplo, lineal, polinómica y periódica) en el canal de salida de las redes piramidales.

Enfoques recientes son más generales y fiables para crear perfiles de concentración deseados, especialmente un gradiente de concentración lineal muy preciso que fue un reto con el diseño piramidal original (K. Campbell and A. Groisman, 2007). La idea principal era obtener porcentajes de mezcla volumétrica bien controlados en cada rama, mediante la modificación de la longitud del canal, y por lo tanto, las resistencias hidráulicas en los canales de mezcla verticales.

Otra perspectiva interesante es alterar el número, longitud y distancia de los divisores piramidales asimétricos a lo largo de un solo canal, generando perfiles en forma personalizada. Esto se puede observar en la figura 20.



Figura 19. Red microfluídica generadora de gradiente con tres soluciones, verde, rojo y la combinación de estos dos, recombinándose entre las ramificaciones del dispositivo (Dertinger *et al.*, 2001).



Figura 20. Generación de gradientes con formas lineales en un diseño de red de 2 entradas/11 salidas, con la longitud de los canales modificada (indicado en mm). H. A. Yusuf, 2009.

Un aspecto que se debe tener muy en cuenta cuando se trabaja con micropartículas vivas es el ambiente en el que ellas habitan, como se ha mencionado, las partículas vivas realizan un movimiento en capas o laminas y es debido a esto que es importante

trabajar en un flujo laminar; en este caso podemos establecer el tipo de flujo conociendo el número de Reynolds.

El número de Reynolds, es dependiente en gran medida de la velocidad que se ejerce en el sistema de fluidos, es por esta razón que conocer el caudal que se debe suministrar nos proporcionara un flujo controlado y por ende una zona ideal donde organismos microscópicos puedan coexistir.

Por otra parte, los dispositivos microfluídicos se comportan de manera análoga a las redes de circuitos eléctricos; por lo tanto, conociendo este principio podemos definir el caudal que viajará por dichos dispositivos mediante su resistencia hidráulica y la presión ejercida en el fluido. Lo cual es de gran utilidad, ya que en este proyecto se fabrica una red microfluídica tipo piramidal.

El nivel de concentración que se requiere en las redes microfluídicas es un aspecto importante en la mezcla de fluidos, esta es la razón por la cual se debe de conocer los porcentajes de soluciones en cada bifurcación del sistema; por otra parte, la longitud de difusión dicta en qué punto las soluciones se diluyen, siendo tales parámetros necesarios para obtener un gradiente uniforme a la salida del dispositivo generador de gradiente elaborado en este trabajo.

3.5 Asimiento

El tener un dispositivo que permite generar gradiente de densidad nos posibilita estudiar el comportamiento de células vivas dentro del chip en un ambiente controlado. Aunado a este chip, conseguir el confinamiento de las partículas mediante haces de luz en fibra óptica, nos abre posibilidades de estos estudios orientados hacía análisis biomédicos, químicos y quimiotácticos, además de permitir la separación, selección y posible disección (por ejemplo, con ayuda de otro haz) de partículas vivas en el interior de los microcanales. Para poder realizar el asimiento de materia con ayuda de luz guiada, se recurre a una fuerza llamada presión de radiación de la luz, la cual se ha estado utilizando en las últimas décadas para capturar y manipular partículas micrométricas.

3.6 Fuerza de radiación de la luz

En 1970 Artur Ashkin demostró esta presión de radiación de la luz, y diseñó un experimento para medir la presión ejercida por un láser continuo (A. Ashkin, 1970). Para evitar efectos de calentamiento debidos a la absorción de la luz, Ashkin utilizó microesferas transparentes de látex suspendidas en agua, cuyos diámetros iban desde fracciones de micrómetro hasta varios micrómetros (de 50 a 150 micrómetros). Ashkin no sólo encontró que la presión de radiación efectivamente era capaz de empujar a las partículas en la dirección de propagación del haz láser, sino que también observó que, simultáneamente, las partículas eran atraídas hacia el centro del haz, en la dirección transversal. Partiendo de estos resultados decidió colocar dos haces de luz propagándose en direcciones opuestas a lo largo de un eje horizontal, de modo que las fuerzas ejercidas por cada uno de los láseres se equilibraran entre sí en algún punto intermedio, donde la partícula quedaría atrapada por la luz. Estos descubrimientos marcaron el inicio de la investigación en una de las áreas la ciencia y la tecnología: la micromanipulación óptica.

En la micromanipulación, el láser funciona como una fuente de radiación especial. Por una parte, el hecho de que la radiación que emite es casi monocromática y coherente; esto quiere decir que está formada por un conjunto de ondas electromagnéticas que tienen casi la misma longitud de onda y que viajan de manera ordenada y sincronizada. Por otra parte, la luz del láser concentra una gran potencia, y se propaga a lo largo de una dirección bien definida. Por ejemplo, si enfocamos un haz de luz láser de 1 watt de potencia a una superficie de unos 10 micrómetros de diámetro, la cantidad de fotones que atravesarán esa superficie por unidad de tiempo será más de nueve millones de veces mayor que la cantidad de fotones que la atravesarían si la misma superficie estuviera iluminada por el Sol en el exterior de la atmósfera terrestre. En este caso, la presión de radiación sigue siendo insignificante para objetos macroscópicos, pero llega a ser muy importante al actuar sobre objetos suficientemente pequeños.

Para entender el fenómeno reconocido por Ashkin, el proceso de interacción entre la luz y una partícula esférica se ilustra mediante un trazo de rayos en la figura 21. Cuando un haz de luz incide sobre la superficie de un objeto transparente, una parte de la luz es reflejada; otra parte es transmitida (pasa a través del objeto), pero sufre refracción (se desvía), y puede haber también una pequeña parte que se absorba, transformándose en calor. Los cambios en la rapidez o dirección de propagación de la luz debidos a la reflexión y refracción implican un cambio en el momento lineal de los fotones, lo cual a su vez genera fuerzas que actúan sobre la partícula; esto se debe a que el momento lineal se debe conservar, y ocasiona la presión de radiación (Sepúlveda, Vargas y García, 2007).

Pero hay un factor adicional que permite la captura óptica observada por Ashkin, y es el hecho de que existe un gradiente de intensidad en la sección transversal del haz de luz: la intensidad es máxima en el centro y disminuye rápidamente hacia las orillas, como se ilustra en la figura 21a y en la curva roja de las figuras 21b y 21c (por lo cual el rayo a se representa un poco más grueso que el rayo b). La refracción del rayo a en la figura 21b provoca la fuerza F_a sobre la esfera, y el rayo b, simétricamente ubicado, causa una fuerza análoga F_b , pero F_a es mayor que F_b . El resultado es que la fuerza total (flecha azul) tiene dos contribuciones; una perpendicular al eje de propagación (z) que conduce las partículas hacia las regiones de máxima intensidad; y la otra que las empuja hacia adelante a lo largo del eje. La primera se conoce como fuerza de gradiente, mientras que la segunda se ha llamado fuerza de esparcimiento o dispersión.

En el caso de la luz reflejada (figura 21c), la fuerza ejercida en cada punto del objeto es siempre perpendicular a su superficie (debido a la ley de reflexión de la luz), de manera que la fuerza resultante tiene el efecto principal de empujar al objeto en la dirección de propagación (flecha azul). Sin embargo, el gradiente de intensidad también juega un papel en este caso. De hecho, su efecto es exactamente opuesto al de la fuerza gradiente para la luz transmitida, es decir, tiende a empujar al objeto fuera de las intensidad máxima, regiones de aunque su magnitud es mucho menor (aproximadamente diez veces) que la fuerza gradiente asociada a la luz transmitida. En general, podemos decir que la fuerza de esparcimiento es aquella cuya dirección coincide siempre con la dirección de propagación del haz de luz, mientras que la fuerza gradiente es perpendicular a esta dirección (Sepúlveda, Vargas y García, 2007).



Figura 21. a) Gradiente de intensidad transversal de un haz de luz láser y su proyección en una pantalla. (b-d) Procesos de interacción entre un haz de luz y una partícula (Sepúlveda, Vargas y García, 2007).

El método ilustrado en las figuras 21b-d describe satisfactoriamente las fuerzas ópticas sólo cuando el tamaño de las partículas es varias veces mayor que la longitud de onda de la luz que se está utilizando. También se pueden atrapar partículas más pequeñas, pero los procesos físicos involucrados y su descripción son más complejos. En general, las fuerzas ópticas son directamente proporcionales a la potencia del haz de luz. Aunque la

potencia mínima necesaria para atrapar una partícula depende de su tamaño, de sus propiedades ópticas y, por supuesto, de las demás fuerzas involucradas en el sistema, pero generalmente unos cuantos miliwatts pueden ser suficientes.

Una vez que la partícula es atrapada se puede desplazar con respecto a su entorno, ya sea moviendo el haz de luz o la propia muestra que contiene a la partícula; en este caso se habla de "manipulación óptica". Otro punto importante es que estas técnicas no están restringidas a partículas esféricas: funcionan igualmente con objetos de diferentes geometrías, e incluso de formas irregulares, aunque en esos casos puede haber efectos adicionales de alineación o rotación.

En la imagen 22 se muestra el principio de funcionamiento descrito para la presión estudiada por Ashkin, donde se presenta el confinamiento de partículas aplicado con fibra óptica. Debido a que tal concepto es utilizado en el dispositivo microfluídico fabricado en este proyecto de tesis.

Los haces láser provenientes de las fibras, ejercen fuerzas de presión en la partícula, provocando que exista una fuerza de estiramiento sobre ésta, pero con dirección contraria a la presión aplicada por los haces de luz. Tales fuerzas se equilibran al utilizar dos fibras ópticas con perfiles de intensidad semejantes, causando que la partícula sea confinada entre dichos perfiles.



Figura 22. Esquema del asimiento de una partícula por fibra óptica, mediante las fuerzas de radiación de la luz (Steffen Grosser, 2015).

La presión de radiación de la luz ha logrado ser la herramienta que ayuda a confinar partículas micrométricas de una manera selectiva y controlada mediante el asimiento óptico; además de aprovechar de manera adecuada los beneficios de la luz láser para tal propósito. En este sentido, el trabajo efectuado en esta tesis, utiliza el mismo concepto de presión de radiación, pero beneficiándose de las ventajas que conlleva utilizar fibra óptica. Un ejemplo de esto, es la habilidad de introducir la fibra óptica transversalmente en los microcanales, llevando de esta manera, cualquier haz de luz láser justo a la zona donde se quiere realizar el confinamiento de partículas a analizar.

Resultados y discusión

Uno de los objetivos principales de este trabajo de investigación es generar un gradiente de concentración dentro de un dispositivo microfluídico. Para cumplir esta meta es necesario conocer la longitud de difusión de las mezclas realizadas dentro de los microcanales de los dispositivos fabricados, debido a que si se quiere obtener tal gradiente, éstas deben tener un perfil bien definido dentro del sistema microfluídico. Esto se logra calculando adecuadamente la distancia a la que las sustancias comienzan a mezclarse mediante difusión, de esta manera podemos cambiar el porcentaje de concentración de cada una de las sustancias y por ende la condición de gradiente a voluntad del usuario.

4.1 Arreglo óptico

Para realizar un estudio completo de los microcanales se desarrolló un sistema óptico que nos permitiera analizar el flujo en los dispositivos mediante imágenes y videos del mismo. Por esta razón se instaló una cámara y un arreglo óptico delante de ella, permitiendo enfocar en el área de interés. Las imágenes capturadas fueron procesadas con el software Matlab para analizar el perfil de intensidad de las imágenes del canal. Para graficar el perfil de intensidad de éstas, convertimos a una matriz de pixeles la imagen, y tomamos el promedio de intensidades de los pixeles a lo largo de todo el canal. Con esto, inferimos que el perfil de intensidad de cada canal, es la transmitancia óptica a través de éste. De esta manera, mientras mayor sea el porcentaje de transmitancia (mayor cantidad de luz que atraviesa el canal), corresponde a una menor densidad de las soluciones y conforme este porcentaje disminuya (menor cantidad de luz transmitida), la densidad de tales soluciones se incrementa. Se menciona que para estos casos no se consideraron los espectros de transmitancia del sustrato BK7 y PDMS debido a que, aunque la transmitancia es casi total (~95%), logran transmitir en el espectro visible de manera uniforme y esto no afecta el estudio de las imágenes.

En la figura 23, podemos observar el esquema del arreglo realizado para el análisis de los dispositivos, el cual consta de una cámara PixeLINK PL-B778U para la captura de imágenes y video. Frente a la cámara tenemos una lente con una distancia focal de 10 cm. Seguida de la lente, se colocó un objetivo de microscopio MITUTOYO con amplificación 10X y distancia de trabajo de 3.3 cm, corregido al infinito y finalmente se instaló el dispositivo a analizar. El dispositivo es sostenido por un sistema de posicionamiento de traslación en XYZ de alta sensibilidad, con el propósito de enfocar de manera precisa la zona a analizar, fue colocada una lámpara a cierta distancia sobre el dispositivo para iluminar el área. Por último se instaló un sistema de inyección de las jeringas conectadas a las entradas del dispositivo. Cabe mencionar que para los dispositivos generadores de gradiente, se utilizó una bomba de inyección (modificada) de la marca Razel (figura 24b). Esta bomba se usó para inyectar partículas en la tercera entrada del dispositivo, en el caso de los generadores de gradiente.



Figura 23. Esquema del arreglo óptico formado para analizar los dispositivos microfluídicos.

Cabe mencionar que para los dispositivos "Y" y generador de gradiente, se usó una lente que tiene una distancia focal de 5 cm. Sin embargo para el dispositivo generador

de gradiente con fibra óptica se colocó una lente con distancia focal de 10 cm, debido a que en los dos primeros solo era necesario enfocar para tener una vista total del ancho del canal. Lo cual se logró con la lente F = 5 cm. Mientras que para el dispositivo con fibra óptica fue necesario observar un área menor, para analizar el comportamiento de las partículas a estudiar, lo cual se logra para este arreglo con una lente F = 10 cm.

En la imagen 24 se muestra el dispositivo colocado en el arreglo óptico instalado para analizar el área de estudio de cada dispositivo.



Figura 24. Arreglo óptico para analizar los dispositivos mediante captura de video e imágenes.

Finalmente después de los pasos anteriormente mencionados, es posible realizar pruebas con el dispositivo microfluídico. Estas pruebas se realizaron con una bomba de jeringa de doble inyección (NE-4000 Double Syringe Pump), que consta de dos jeringas impulsadas a la misma velocidad y presión, como se muestra en la figura 25a. Para los dispositivos microfluídicos con tres entradas fue necesario utilizar una segunda bomba de inyección de una jeringa de la marca Razel (figura 25b).



Figura 25. a) Bomba de doble inyección NE-4000 utilizada para suministrar sustancias a los microcanales. b) Bomba de inyección modificada Razel.

4.2 Dispositivo tipo "Y"

Una vez fabricado el dispositivo en forma de "Y" (figura 26), se iniciaron las pruebas inyectando primeramente dos soluciones distintas en las entradas (algunas tintas y agua). El objetivo del dispositivo es obtener distintas longitudes de difusión de las concentraciones entrantes, esto con el fin de controlar la distancia a la que se realiza la mezcla mediante la presión de flujo producida por la bomba de jeringas.



Figura 26. Dispositivo microfluídico tipo "Y" fabricado para estudiar las longitudes de difusión de las soluciones (en este caso, tinta azul y amarilla).

En el sistema de traslación el dispositivo "Y" fue desplazado en el eje x para ir analizando centímetro a centímetro la difusión existente de las soluciones y su concentración (figura 27). Desplazamientos en el eje y nos permite orientar el centro del canal del dispositivo y posicionarlo dentro de los márgenes de la cámara PixeLINK y el desplazamiento en el eje z nos permitió enfocar el canal a la distancia de trabajo del objetivo de microscopio.



Figura 27. Dispositivo "Y" marcado en las áreas a analizar. Cada flecha marca un centímetro desde la unión de los canales; en las entradas tinta roja y agua.

Una vez obtenidos los caudales para cada longitud, se procedió a programar esos caudales (tabla 2) en la bomba e inyectar las soluciones en el dispositivo, en este caso las sustancias fueron tinta roja vegetal y agua destilada. El flujo introducido en el dispositivo en todo momento fue constante.

Se tomó una imagen del dispositivo a 1 cm de la unión de los microcanales (figura 28). Para un primer caso se inyectaron soluciones con un caudal de 20 µl/hr. De acuerdo a la tabla 2, la longitud de difusión se realiza a 1 cm. En la figura 29 se presenta el perfil de densidad de las sustancias en el microcanal.



Figura 28. Microcanal de 600 μ m de ancho donde fluye un caudal de $20\mu l/hr$. Imagen tomada a 1 cm de la salida de las soluciones.



Figura 29. Traza del perfil de densidad del microcanal con caudal de $20\mu l/hr$, a 1 cm de la unión.

Analizando el perfil podemos ver que la densidad de las sustancias se vuelve casi homogénea. Comprobando de esta manera la cantidad de caudal que debe suministrar la bomba para tener una difusión uniforme a 1 cm en este dispositivo.

El perfil de densidad no es uniforme en su totalidad debido a que representa un promedio de la intensidad de los pixeles en el eje y de la imagen y éste genera ruido en los diferentes valores que se encuentran graficados a lo largo de la traza.

Utilizando la misma técnica, se toma imagen a 1cm para un caudal de 40μ l/hr. Después se vuelve a tomar una imagen, pero esta vez a 2 cm. Los resultados se muestran a continuación en las imágenes de la figura 30.

En la traza del perfil de densidad de la figura 30a, se exhibe que existe alta transmitancia en el agua y por lo tanto todavía no se ha logrado la difusión, pero al situarnos a 2 cm a lo largo del canal en el eje x, la densidad en las trazas disminuye (figura 30b), volviéndose uniforme.

Cabe señalar que la densidad mayor pertenece a la tinta, mientras que la densidad menor es propia del agua destilada.



Figura 30. Imágenes del canal con caudal a 40μ l/hr tomadas con la cámara Pixelink (lado izquierdo) y trazas de densidad de los canales graficadas en Matlab (lado derecho). a) 1 cm a la salida del canal, b) 2 cm a la salida del canal.

Como se observa en la figura 30, la longitud de difusión queda bien definida en la gráfica de densidad de concentración, como es de esperar de acuerdo a la tabla 2.

Se tomaron imágenes a 1, 2 y 3 cm con un caudal de 55μ l/h (figura 31a-b). De acuerdo a los resultados obtenidos en la tabla 2, la difusión de las soluciones se realiza a 3 cm para tal caudal. Lo cual se observa en las trazas de perfil de densidad de la figura 31.

Figura 31. Imágenes del canal con caudal a $55\mu l/h$ (lado izquierdo) y trazas de densidad (lado derecho). a) 1 cm a la salida del canal, b) 2 cm y c) 3 cm después de la unión de los microcanales.

Al comparar los resultados para 1 cm (31a) y 2 cm (31b) se observa que la dilución de la tinta con el agua se realiza conforme aumentamos la velocidad en la bomba de inyección. Al llegar a la longitud de difusión, la gráfica del canal a 3 cm (31c) nos muestra que el perfil de densidad es homogéneo. De esta manera, este resultado esta de acuerdo con tabla 2, en la que observamos que la densidad se vuelve más uniforme.

Por último, se expone la difusión en la figura 32 para una velocidad de 80μ l/h, para longitudes que van de 1 a 4 cm (figura 32a-d). En donde veremos que la distancia para lograr una dilución de soluciones casi comprende toda la longitud del canal de salida; además se observa que, como en el caso anterior, en los primeros centímetros del canal la diferencia de densidad del agua y la tinta son notorias en sus trazas de perfil.

Figura 32. Imágenes del canal con caudal a 80μ l/h (lado izquierdo) y trazas de densidad (lado derecho). a) 1 cm a la salida del canal, b) 2 cm a la salida del canal, c) 3 cm a la salida del canal, d) 4 cm a la salida del canal.

Para 1, 2 y 3 cm podemos observar en las gráficas de la figura 32 que la dilución de las sustancias se va generando conforme la longitud aumenta. Para una velocidad de 80µl/h la difusión se logra a los 4 cm, confirmando de manera experimental los resultados numéricos obtenidos en la tabla 2.

Figura 33. Comparativo de las longitudes de difusión en el dispositivo "Y" experimentales (puntos) y teóricas (línea continua).

En la figura 33 se muestra una comparación de las longitudes de difusión obtenidas teóricamente (línea continua) y las encontradas experimentalmente (puntos). Se puede observar que los valores experimentales son muy semejantes a los obtenidos teóricamente. Lo que permite tener certeza de las velocidades de flujo a utilizar para obtener la difusión de los fluidos a las distancia deseadas.

4.3 Generador de gradiente

Después de haber encontrado las longitudes de difusión matemáticamente y posteriormente analizadas por las trazas de perfil de transmitancia del microcanal procesadas en Matlab, se procedió a realizar el generador de gradiente.

El dispositivo tiene dos entradas E_1 y E_2 de las cuales se derivan tres canales serpenteados, también llamados micromezcladores (m_{11} , m_{12} , m_{13}), después se derivan a cuatro micromezcladores más (m_{21} , m_{22} , m_{23} , m_{24}). Las salidas de estos cuatro microcanales son unidas en un canal terminal, en donde se generaría el gradiente de cuatro niveles. La razón de estos canales serpenteados es debido a que se quiere tener una mezcla uniforme al final para tener bien definido el gradiente. Por otro lado, la longitud de estos canales serpenteados, depende de la longitud de difusión, la cual fue calculada con el dispositivo "Y". Por lo tanto se conoce la velocidad a la que la bomba debe inyectar para que exista una mezcla dentro de cada micromezclador. El dispositivo microfluídico se muestra en la figura 34. Le fue inyectada dos soluciones, en este caso tinta azul y tinta amarilla con una velocidad de bombeo de 20 $\mu l/hr$, para observar la dilución en su recorrido dentro de los microcanales.

Figura 34. Dispositivo microfluídico generador de gradiente. A las entradas se le inyectó tinta azul y tinta amarilla.

El dispositivo generador de gradiente cuenta además, con una tercera entrada E_3 que se une con los cuatro canales de salida de los micromezcladores, esta unión deriva en un canal principal de un grosor mayor, donde se genera el gradiente y analizan las partículas.

La entrada E_3 cumplirá la función de dar ingreso a las partículas a estudiar, mientras las dos entradas principales funcionaran como suministro de alimento y medio para partículas vivas, cuando el caso sea necesario.

De la misma manera que el dispositivo "Y", el generador de gradiente también es analizado en el arreglo óptico y su perfil procesado en Matlab, mediante la imagen del canal principal de salida. El área de análisis fue propuesta a 2 cm después de las uniones de las salidas de los canales serpenteados.

La figura 35a nos muestra el gradiente formado en la zona a estudiar, a esta imagen también se procesó su perfil de densidad (figura 35b) mostrando notoriamente un gradiente uniforme de concentraciones de las tintas inyectadas, el cual era esperado obtener.

Figura 35. Gradiente generado con tinta azul y amarilla en el canal del dispositivo (a). Traza del perfil de densidad del gradiente (b).

Como se puede apreciar en la figura 36, con este dispositivo se puede determinar el gradiente de concentración de sustancias. Este dispositivo podrá ser utilizado para

establecer un gradiente deseado en un medio con nutrientes y una solución reguladora ("buffer"), para microorganismos vivos que se requieran analizar en este dispositivo.

De la misma manera se estableció un segundo estudio del gradiente con este dispositivo, en esta ocasión con tinta azul y agua destilada (figura 36a) a una velocidad de 20 $\mu l/hr$. Este segundo análisis se realizó con el propósito de utilizar del modo de color RGB de la imagen únicamente el color azul, con el fin de verificar que las densidades se graficarán de manera correcta la transmitancia (figura 36b), y evitar interpretar de modo inadecuado una combinación de colores por parte del RGB.

Figura 36. a) Gradiente generado con tinta azul y agua destilada en el canal de salida del dispositivo y b) traza del perfil de densidad del gradiente.

4.4 Generador de gradiente y asimiento óptico

Una vez formado el gradiente con el dispositivo anterior, se procedió a realizar la parte final de este trabajo, la cual consiste en introducir fibra óptica en el canal de salida de manera transversal a este, como se muestra en el esquema de la figura 37a. Es en el área del gradiente generado en donde se colocaron las fibras, con la finalidad de implementar un sistema de asimiento óptico (2 cm a la salida de los canales micromezcladores).

Figura 37. Esquema del dispositivo generador de gradiente con fibra óptica. a) Vista del dispositivo en 3D, b) zona donde se realizará el asimiento con fibra óptica.

El dispositivo con fibra óptica se utilizó para realizar asimiento de partículas por medio de presión de radiación de la luz (figura 37b). Para lograr este objetivo primeramente se realizó un arreglo óptico, para acoplar en la fibra óptica haces de luz provenientes de diodos laser con una longitud de onda de 650 nm y que contaban con una potencia de $\sim 7 mW$ como se muestra en la figura 38.

Figura 38. Esquema del arreglo óptico utilizado para el dispositivo generador de gradiente y asimiento óptico.

Se utilizó fibra óptica multimodal, debido a que es más sencillo acoplar la luz en ellas que con fibra monomodo la cual tiene un núcleo mucho menor. La fibra cuenta con un diámetro de $250 \ \mu m$ de núcleo y en total (contando el revestimiento) tiene un diámetro de $550 \ \mu m$. Se montaron dos objetivos de microscopio con amplificación 5X delante de los diodos láser, los cuales fueron controlados de manera individual con un driver que cumplía la función de aumentar o disminuir la potencia de cada diodo. Para medir la potencia de la luz guiada a la salida de la fibra óptica, se hizo uso de un medidor de potencia de la marca Newport. Los valores obtenidos de la potencia de la luz guiada en el medidor se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Potencias detectadas en el fotodiodo de cada diodo y de la luz acoplada en cada fibra.

	Potencia del diodo	Potencia acoplada en la fibra	Porcentaje
Fibra 1	P = 6.8 mW	4.96 mW	73 %
Fibra 2	P = 7.02 mW	5.04 <i>mW</i>	72 %

Después de acoplar un alto porcentaje de potencia de luz en las fibras, se procedió a colocarlas dentro del dispositivo. El sistema microfluídico, se fabricó siguiendo los pasos del capítulo dos, es decir se realizó el PDMS del dispositivo, se ionizó con la pistola de plasma tanto al PDMS como al portaobjetos, y justo antes de unirlos se insertaron las fibras. Una vez insertada la fibra dentro de los canales fabricados para ésta, se unió el portaobjetos al polímero y así terminar de sellar el dispositivo. El dispositivo montado en el sistema de traslación para su análisis, se muestra en la figura 39.

Figura 39. Dispositivo generador de gradiente con fibra óptica. Muestra dos soluciones mezclándose (entrada 1 agua y entrada 2 tinta roja), la entrada 3 funciona como acceso a micropartículas.

Cabe señalar que la fibra fue colocada manualmente dentro del dispositivo, pero el canal que se diseñó para la fibra, no permitía ningún movimiento indeseado de la guía de onda. Por lo cual al insertar la fibra dentro de su microcanal, ésta queda bien sujeta. Una vez sellado el dispositivo, las fibras no se pueden quitar o mover.

Posterior a la elaboración del dispositivo se llevaron a cabo las pruebas de asimiento con partículas micrométricas de poliestireno (figura 40a). Estas pruebas se realizaron colocando en los canales de entrada 1 y 2 solamente agua. En la entrada 3, se introdujeron partículas de 50 μm , a una velocidad de bombeo de 20 $\mu l/hr$.

En la imagen 40b se puede observar el canal de salida del dispositivo, el cual tiene un ancho de 1.73 mm y 1 mm de alto, se observan partículas las cuales son sujetadas por la presión de radiación del haz láser proveniente de las fibras ópticas, en donde los haces se encuentras perpendiculares al flujo de las partículas de polietileno.


Figura 40. a) Corte transversal esquemático 2D del canal microfluídico confinando una partícula mediante fibra óptica (Piñón, Castelli, Hirst, and Sharping, 2013). b) Asimiento de partículas de 50 μm de diámetro dentro del dispositivo, mediante presión de radiación de la luz procedente de fibras ópticas (observado en el eje Z).

Una vez que se comprobó que el asimiento se realizó con éxito para las partículas de poliestireno, se comenzó a trabajar con partículas vivas. Los microorganismos que se usaron fueron las microalgas *Isochrysis sp.* Las cuales tienen dimensiones de aproximadamente de 10 μ m (figura 41). Para llevar a cabo este trabajo, se hizo uso del dispositivo microfluídico de la figura 38.



Figura 41. Microalgas marinas Isochrysis sp. (FAO, 2015).

En esta ocasión se empleó en las entradas distintas soluciones, en la entrada 1 se introdujo la solución reguladora ("buffer") para las microalgas y en la entrada 2 se inyectó un medio con nutrientes, y se generó el gradiente con estas sustancias a una

velocidad de 20 $\mu l/hr$. En la entrada 3 se inyectaron las partículas de *Isochrysis sp.* a la misma velocidad.

En la figura 42 se muestra una secuencia de cuadros (uno por segundo de video), donde se aprecia el asimiento de las microalgas dentro del canal. Para eliminar las reflexiones hacia la cámara por parte de la luz del láser, se colocó un filtró enfrente del objetivo Mitutoyo de amplificación de 10X capaz de bloquear la longitud de onda cercana a la del diodo láser utilizado, lo cual también nos permitió observar con una mejor nitidez los microorganismos.



Figura 42. a) Esquema 2D del arreglo para el dispositivo microfluídico. b-d) Asimiento de microalgas (*Isochrysis sp.*) por medio del haz de asimiento de la fibra óptica en el dispositivo microfluídico.

Lo que nos muestra la figura 42 es una secuencia de imágenes (b-d), donde las flechas en negro indican la dirección del flujo que acompaña a las partículas, mientras que las partículas encerradas en negro, son las partículas llevadas por dicho flujo. Por otra parte las flechas en rojo indican la dirección de propagación de la luz, mientras que las áreas encerradas en rojos indican partículas confinadas. La figura 42a nos muestra el esquema del arreglo planteado para inyectar las soluciones en las entradas del dispositivo, en donde se ha señalado la región de análisis donde se han confinado las microalgas y se han capturado las imágenes de la figura 42b-d.

Al realizar el asimiento, se pudo detectar que las microalgas podían salir de la presión de confinamiento. Esto podría deberse a diversos factores, pero principalmente nombramos los siguientes.

- > A causa del movimiento helicoidal que realizan.
- La cantidad de fotones irradiados en el área de las microalgas es menor que en las partículas de poliestireno.
- La energía transferida no es del todo suficiente para lograr sujetar de manera prolongada las partículas.

Por lo tanto, se decidió aumentar la potencia con la cual se confinaba a las partículas, de esta manera la cantidad de fotones que permiten asir a las partículas sería mayor y por ende la energía para sujetarlas. Sin embargo no era posible aumentar la potencia con la que se contaba en los diodos láser (λ =650 nm/Pmax~7 mW). De tal manera que se vio en la necesidad de cambiar la fuente de luz, y en consecuencia realizar un nuevo dispositivo con el molde ya fabricado para tal sistema.

Como primera medida se cambió el láser utilizado por uno con mayor potencia. Por disponibilidad en el laboratorio, se hizo uso de un láser que emite en el infrarrojo con una longitud de onda de 1064 nm y una potencia de ~1 W.

Como segunda medida, se cambió ligeramente el arreglo óptico para las fibras, al utilizar un divisor de haz 50:50 para proporcionar a las fibras la emisión requerida con

una potencia similar, el esquema de este cambio se muestra en la figura 43. En este caso, se posicionó un filtro enfrente del haz de salida, para evitar reflexiones que pudieran dañar el láser debido a su alta potencia.



Figura 43. Esquema del arreglo óptico desarrollado para el guiado de un láser infrarrojo ($\lambda = 1064 nm$) a través de fibras ópticas.

Después de alinear el haz láser hacia las fibras ópticas, se midió la potencia de salida de cada fibra. La potencia obtenida se muestra en la tabla 4.

	Potencia del láser	Potencia acoplada en la fibra	Porcentaje
Fibra 1	P = 500 mW	442 mW	88 %
Fibra 2	P = 500 mW	347 mW	69.4 %

Tabla 4. Potencias detectadas en el fotodiodo, del haz láser y de la luz acoplada en cada fibra.

Después de haber acoplado las fibras, se procedió nuevamente a sellar el dispositivo con las fibras dentro, tal y como se hizo con el dispositivo anterior.

Como se hizo anteriormente, se colocaron las mismas sustancias en las entradas 1 y 2 ("buffer" y nutrientes) y microalgas en la tercera entrada. Se hizo fluir a una velocidad de $20 \ \mu l/hr$ los resultados encontrados se muestran en la figura 44.



Figura 44. (a-c) Secuencia de Imágenes donde se muestra el asimiento de microalgas de aproximadamente 10 μm de diámetro con una velocidad de flujo de 20 $\mu l/hr$.

En la secuencia de cuadros de la figura 44 (a-c), las flechas en rojo muestran la dirección de propagación del haz de luz láser proveniente de las fibras y en círculos rojos las microalgas confinadas. Mientras que las flechas en azul representan la dirección del flujo y en círculo azul las microalgas que no han sido atrapadas, pero son desplazadas por el flujo.

En este último análisis, se pudo notar que las partículas confinadas, ya no eran capaces de escapar del asimiento debido al aumento de potencia en los haces de las fibras. Lo que era de esperar debido a la cantidad de fotones emitidos hacia las partículas, lo cual es interpretado en mayor energía y así una presión de radiación más fuerte que con el láser anterior.

Simultáneamente al estudio con el asimiento en las microalgas, también es observado el movimiento quimiotáctico de éstas en el área de análisis del dispositivo (figura 42a). Para esta prueba, no se utilizó la fuente láser, debido a que se desea mostrar tal movimiento quimiotáctico.



Figura 45. Movimiento quimiotáctico de las microalgas *Isochrysis sp.* a) mayor concentración de "buffer", b) concentración media de "buffer" y nutrientes, c) mayor concentración de nutrientes.

La región de microcanal con una mayor concentración de solución "buffer" se muestra en la figura 44a, por lo que se observa que hay una mínima población de microorganismos. Con el movimiento realizado por las microalgas, se puede deducir la generación del gradiente de soluciones en este caso a base de "buffer" y nutrientes. En la figura 44b se muestra la región del microcanal donde hay una concentración por igual de solución "buffer" y de nutrientes y se observa una mayor concentración de microalgas. Finalmente en la figura 44c se observa la zona donde el fluido tiene la mayor concentración de nutrientes y también la mayor concentración de microalgas.

Conclusiones

En este capítulo se mencionan las conclusiones de este trabajo con base en los resultados mostrados en los capítulos anteriores.

5.1 Fabricación

Se demostró que es posible utilizar una técnica diferente a la de fotolitografía para realizar moldes para dispositivos microfluídicos mediante el uso de una impresora 3D. Se señala que las dimensiones de los microcanales dependen principalmente de la resolución de tal impresora.

Por otra parte, utilizando esta técnica se reduce el tiempo de fabricación del maestro. El lapso de tiempo que toma a la impresora para fabricar cada maestro es tan solo de dos horas, proceso que con técnicas típicas de fotolitografía puede demorar hasta dos días.

5.2 Dispositivos microfluídicos

Se fabricaron tres tipos de dispositivos microfluídicos con una función indicada para cada uno, como se menciona a continuación.

5.2.1 Dispositivo tipo "Y"

Se obtuvieron valores de las longitudes de difusión para un canal de geometría rectangular utilizando las expresiones de la tabla y se compararon con las longitudes de difusión experimentales. Se comprobó que las longitudes de difusión calculadas numéricamente correspondían a las longitudes de difusión realizadas experimentalmente en el microcanal tipo "Y" fabricado. Por medio del procesamiento de imágenes a distintas longitudes del canal, se obtuvieron las trazas del perfil de densidad del microcanal. Con longitudes de canal de 1, 2, 3 y 4 cm, los caudales de inyección 20,

40, 55 y 80 µl/hr respectivamente, se ratifica la difusión homogénea de las soluciones con las gráficas.

5.2.2 Dispositivo generador de gradiente de densidad

De este dispositivo se logró obtener un perfil de gradiente de densidad, utilizando soluciones distintas para cada entrada, se realizaron difusiones dentro de las bifurcaciones del dispositivo que derivan en un canal principal. Se recurrió al procesamiento de una imagen tomada a 2 cm en el canal principal con un flujo de inyección en las entradas de 20 µl/hr. El resultado obtenido en las trazas del perfil de densidad, demostró un gradiente de soluciones definido, siendo éste el resultado deducido para las longitudes de los microcanales del dispositivo, de acuerdo a los cálculos de longitud de difusión realizados para el dispositivo "Y".

5.2.3 Dispositivo generador de gradiente de densidad con asimiento óptico

En este dispositivo se demostró que es posible realizar asimiento de partículas de poliestireno de tamaño micrométrico. Haciendo uso de la fuerza de presión ejercida por la luz guiada en las fibras, se logró confinar partículas de poliestireno de 50 µm de diámetro para un caudal de 20 µl/hr y potencia de luz láser en cada fibra de ~5mW, la longitud de onda del láser utilizada fue de 650 nm.

Además de partículas de poliestireno, se trabajó con microorganismos vivos, lo cual es un aspecto importante para los dispositivos microfluídicos orientados a la medicina, ya que con este dispositivo se puede estudiar con mayor profundidad las partículas que son capturadas en el sistema microfluídico. En este trabajo se confinaron microalgas *Isochrysis sp.* dentro del dispositivo con un caudal de flujo de 20 µl/hr utilizando un haz laser con longitud de onda de 1064 nm y potencia acoplada en las fibras de ~400 mW.

Por otra parte, también se estudió el movimiento quimiotáctico en el sistema microfluídico generador de gradiente. Se expuso en este dispositivo tal movimiento por parte de las microalgas hacia la mayor concentración de nutrientes. Ratificando de esta manera el gradiente de concentración generado en la zona de análisis del dispositivo.

5.3 Trabajo a futuro

Después de realizar este trabajo, se llegó a la conclusión de que el generador de gradiente dispone de una amplia gama de posibilidades para mejorarse, y ser aún más funcional y así obtener mayores beneficios del sistema. Entre las cuales se destacan:

- ➤ Las dimensiones de los canales están altamente relacionadas con la longitud a la que las sustancias se diluyen, y por otra parte, entre menor sea la longitud de difusión menor cantidad de sustancias se requieren. En este sentido, al momento de fabricar los microcanales de los maestros, las medidas de dichos canales estaban limitadas a la resolución de la impresora. Por lo que teniendo una impresora de mejor resolución (≤ 100 µm), las cuales ya existen, se pueden adquirir canales de menores dimensiones. Obteniendo como resultado menores longitudes de difusión y por lo tanto volúmenes de concentración ínfimos.
- La resina con la que se fabrican los moldes en la impresora no soporta altas temperaturas (> $60^{\circ}C$). Este se convierte en un factor limitante en el tiempo de horneado del PDMS, debido a que toma hasta 4 horas aproximadamente dejarlo en el horno. En este año, la compañía Formlabs (productora de la impresora Form 1+) of rece una resina moldeable capaz de soportar hasta $\sim 240 \,^{\circ}C$. Lo cual sería una ventaja si se realizaran moldes con dicha resina, ya que la limitante de temperatura anularía tiempo horneado disminuiría la se V el de considerablemente al orden de solo minutos. Esto se traduce en inclusive menor tiempo de fabricación del ya establecido en este trabajo.
- Al realizar el asimiento de partículas vivas, solo se realizó con microalgas Isochrysis sp. Pero aún queda mucho por explorar en esta parte de la investigación, ya que el dispositivo también se podría utilizar en células, bacterias, cultivos, etc.
- El asimiento de los microorganismos también podría permitir separarlos por tamaño, esto se lograría haciendo un estudio más detallado de la energía

requerida en los haces de las fibras ópticas contra flujo inyectado, para presionar cierto tamaño de partículas y dejar pasar otras con menor o mayor área.

Utilizar diferentes longitudes de onda en la fuente de luz, debido a que la energía emitida por los fotones hacia los microorganismos está relacionada con la frecuencia de la luz, teniendo a mayor longitud de onda menor frecuencia y por ende menor número de fotones transfiriendo momento a las partículas. Dicho momento es lo que produce el asimiento de las partículas. En caso contrario, a menor longitud de onda mayor frecuencia y de esta manera se tiene más energía, lo cual se traduce en una mayor transferencia de momento por parte de los fotones.

- Ashkin A. (1970). Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure. *Physical review letters, 24 (4),* 156.
- Ayala Cruz H. C., (2013). Diseño de un sistema optofluídico para la manipulación de partículas. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 91 p.
- Beta, C., and Bodenschatz, E. (2011). Microfluidic tools for quantitative studies of eukaryotic chemotaxis. European journal of cell biology, 90(10), 811-816.
- Campbell K. and Groisman A., (2007). Generation of complex concentration profiles in microchannels in a logarithmically small number of steps. *Lab on a Chip, 7*, 264-272.
- Constable, A., Kim, J., Mervis, J., Zarinetchi, F., and Prentiss, M. (1993). Demonstration of a fiber-optical light-force trap. Optics letters, 18(21), 1867-1869.
- CEIT (2015). Dispositivos microfluídicos. Recuperado el 5 de Agosto del 2015, de: <u>http://ceit.es/es/sectores-industriales/salud-y-alimentacion/sensores-</u> <u>biomems/dispositivos-microfluidicos</u>.
- Dertinger, S. K., Chiu, D. T., Jeon, N. L., and Whitesides, G. M. (2001). Generation of gradients having complex shapes using microfluidic networks. Analytical Chemistry, 73(6), 1240-1246.
- Domachuk P., M Cronin-Golomb, Eggleton B., Mutzenich S., Rosengarten G. and Mitchell A., (2005). Application of optical trapping to beam manipulation in optofluidics. *Optics Express, 13,* 7265–7275.
- Elveflow (2015). Elveflow microfluidic flow control. Recuperado en septiembre de 2015, de:<u>http://www.elveflow.com/microfluidic-flow-control-products/soft-lithography-products/softlithobox-pdms-soft-lithography-station/</u>
- EIA (2012). Recuperado en septiembre de 2015, de: http://fluidos.eia.edu.co/hidraulica/laminar_turbulento.htm
- FAO (2015). Hatchery operation: culture of algae. Recuperado en octubre de 2015, de: http://www.fao.org/docrep/007/y5720e/y5720e08.htm
- Fernández Rivas, D. (2011). Microfluídos: nuevas fronteras. *Revista Cubana de Fisica*. 28 (1), 60-67.

Formlabs (2015). Productos. Recuperado en septiembre de 2015, de: http://formlabs.com/products/3d-printers/form-1-plus/

- Grosser, S., Fritsch, A. W., Kießling, T. R., Stange, R., and Käs, J. A. (2015). The lensing effect of trapped particles in a dual-beam optical trap. *Optics express*, 23(4), 5221-5235.
- Haubert K., Tracy Drierb and David Beebe, (2006). PDMS bonding by means of a portable, low-cost corona system. *Lab chip, 6, (12)* 1548–1549
- Hongxiang Lei, Yao Zhang, and Baojun Li, (2012). Particle separation in fluidic flow by optical fiber. *Optics express*, 20 (2), 1292-1300.
- Jeon, N. L., Dertinger, S. K., Chiu, D. T., Choi, I. S., Stroock, A. D., and Whitesides, G. M. (2000). Generation of solution and surface gradients using microfluidic systems. *Langmuir*, *16*(22), 8311-8316.
- Lee, H., & Ham, D. (2007). CMOS biotechnology. R. M. Westervelt (Ed.). New York: Springer.
- López Aguilar E. (2012). Guiado de partículas mediante un campo evanescente estructurado en un sistema optofluídico. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 115 p.
- Marchington R. F. (2010). Applications of microfluidic chips in optical manipulation & photoporation. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy. Optical Trapping & Microphotonics Groups School of Physics & Astronomy, University of St Andrews, 203 p.
- McDonald JC, Chabinyc ML, Metallo SJ, Anderson JR, Stroock AD and Whitesides GM, (2002). Prototyping of microfluidic devices in poly (dimethylsiloxane) using solid-object printing. *Analytical Chemistry*, *74* (7), 1537-1545.
- MIT technology review, (2015). Micro 3-D Printer Creates Tiny Structures in Seconds. Recuperado en noviembre de 2015 de: http://www.technologyreview.com/news/511856/micro-3-d-printer-creates-tinystructures-in-seconds/
- Nguyen, N. T., and Wu, Z. (2005). Micromixers a review. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, *15*(2), R1.
- Oh, K.W., Kangsun Lee, Byungwook Ahna and Edward P. Furlan, (2011). Design of pressure-driven microfluidic networks using electric circuit analogy. *Lab chip*, *12*, (3) 515-545.

- Song, L., Nadkarni, S. M., Bödeker, H. U., Beta, C., Bae, A., Franck, C., and Bodenschatz, E. (2006). Dictyostelium discoideum chemotaxis: threshold for directed motion. European journal of cell biology, 85(9), 981-989.
- Piñón, T. M., Castelli, A. R., Hirst, L. S., and Sharping, J. E. (2013). Fiber-optic trap-ona-chip platform for probing low refractive index contrast biomaterials. *Applied optics*, *52*(11), 2340-2345.
- Psaltis, D., Quake, S. R., and Yang, C. (2006). Developing optofluidic technology through the fusion of microfluidics and optics. Nature, 442(7101), 381-386.
- Reynolds, O. (1883). An experimental investigation of the circumstances which determine whether the motion of water shall be direct or sinuous, and of the law of resistance in parallel channels. *Proceedings of the royal society of London*, *35*(224-226), 84-99.
- Sabine, L. (2015). Informe del mes de Agosto. Recuperado en Agosto de 2015, de: <u>http://mklorenasabinepena829369.blogspot.mx/2015/08/informe-del-mes-de-agosto.html</u>
- Sepulveda, K. V., Vargas, I. R., y Garcia, R. R. (2007). Pinzas ópticas: las delicadas manos de la luz. *Ciencia, Revista de la Academia Mexicana de Ciencias*, *58*, 18-25.
- Sósol Fernández R.E., Marin Lizarraga V.M., Rosales Cruzaley E. y Lapizco Encinas B.H., (2012). Análisis de células en dispositivos microfluídicos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(2), 227-248.
- Top ten reviews, (2015). 3D printers review. Recuperado en noviembre de 2015 de http://3d-printers.toptenreviews.com/
- Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. Nature, 442(7101), 368-373.
- Yusuf, H. A., Baldock, S. J., Barber, R. W., Fielden, P. R., Goddard, N. J., Mohr, S., and Brown, B. J. T. (2009). Optimization and analysis of microreactor designs for microfluidic gradient generation using a purpose built optical detection system for entire chip imaging. Lab on a Chip, 9(13), 1882-1889.