



**Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional,
Unidad Monterrey**

*Dispositivo microfluídico para la generación de una curva
estándar de forma automática para un inmunoensayo*

Tesis que presenta

Alan Mauricio González Suárez

para obtener el grado de Maestro en Ciencias en

Ingeniería y Física Biomédicas

Director de tesis

Dr. José Luis García Cordero

Apodaca, Nuevo León

Agosto de 2015

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi asesor, el Dr. José Luis García Cordero, por compartirme sus conocimientos y experiencia, por tenerme paciencia y confiar en mí, y por esos consejos que me han ayudado a tomar decisiones importantes. Al Conacyt, por la beca que me otorgaron para obtener el grado. A mis compañeros de laboratorio, sobre todo a Rocío Jiménez por su amistad y todas las horas que compartió conmigo aprendiendo o enseñándome algo. A mis amigos de la unidad, Andrea, Eric, Ángel, Alfonso y Mauricio, por todas esas horas de pláticas y momentos con y sin sentido. A mi familia, por el apoyo que siempre me brindan y la confianza que tienen en mí en todo lo que hago. Y finalmente, a mi novia Gaby, por siempre estar ahí aunque estuviéramos lejos, por su comprensión durante todo este tiempo y por hacer más sencillo todo.

ÍNDICE / CONTENIDO

Agradecimientos	I
Índice	II
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1 Microfluídica	3
1.1.1 Flujo volumétrico en canales microfluídicos	4
1.1.2 Difusión	9
1.1.3 Diseño y fabricación de dispositivos microfluídicos	12
1.1.3.1 Fabricación por litografía suave	13
1.1.3.2 Litografía suave multicapa, válvulas de Quake ..	14
1.2 Aplicaciones de la microfluídica	18
1.3 Inmunoensayos	19
1.3.1 Inmunoensayos en dispositivos microfluídicos	21
1.4 Otros sistemas microfluídicos de interés	24
1.4.1 Dispositivos microfluídicos generadores de gradientes de concentración	24
1.4.2 Captura mecánica de moléculas en dispositivos microfluídicos	32
1.5 Planteamiento del problema	36
2. Objetivos	37
2.1 Objetivo general	37
2.2 Objetivos particulares	37
3. Materiales y métodos	38
3.1 Diseño de los dispositivos	38
3.1.1 Cálculos teóricos de los dispositivos	38
3.1.1.1 Primer dispositivo CGG con perfil exponencial .	38
3.1.1.2 Diseño de dos capas con una zona de detección	42
3.1.2 Diseño y características de los dispositivos	44
3.2 Fabricación de los dispositivos	47
3.2.1 Fabricación de moldes	47
3.2.2 Fabricación de dispositivos de PDMS	52
3.2.2.1 Dispositivos microfluídicos de una capa	53

3.2.2.2 Dispositivos microfluídicos de dos capas	54
3.3 Control de los dispositivos	56
3.4 Métodos previos a la realización de los experimentos	58
3.4.1 Funcionalización de portaobjetos	58
3.4.2 Bloqueo de la superficie de los canales y expulsión de burbujas de aire	59
3.4.3 Obtención de imágenes	60
3.5 Metodología de los experimentos	61
3.5.1 Generación del gradiente de concentración con FITC	61
3.5.2 Experimentos en dispositivos microfluídicos de dos capas	62
3.5.2.1 Generación del gradiente de concentración	62
3.5.2.2 Prueba de botones y zonas de detección	63
3.5.2.3 Prueba de generación de curva estándar	66
4. Resultados y discusión	68
4.1 Generación del gradiente de concentración en dispositivo de una capa	68
4.2 Generación del gradiente de concentración en el dispositivo microfluídico de dos capas	71
4.3 Botones y zonas de detección	77
4.4 Prueba de generación de una curva estándar	82
4.5 Dispositivo microfluídico para pruebas futuras	86
5. Conclusiones	89
6. Perspectivas	90
Referencias	91
Apéndice	100
Apéndice A: Script de MATLAB	100

RESUMEN

Desde los inicios de la microfluídica se ha buscado aprovechar sus ventajas para simplificar sistemas manteniendo o mejorando sus características, como en el caso de los inmunoensayos. Se ha demostrado que utilizando dispositivos microfluídicos es posible alcanzar la misma resolución y sensibilidad que equipos comerciales para hacer inmunoensayos, ganando tiempo y ahorrando recursos gracias a las pequeñas cantidades de reactivos necesarias. Estos dispositivos realizan la detección de analitos pero la cuantificación de los mismos se sigue haciendo como en los equipos convencionales. En este estudio se propone integrar distintos sistemas microfluídicos para automatizar la cuantificación. Se fabricó un dispositivo microfluídico capaz de generar un gradiente de concentración de soluciones con proteínas. Inyectando dos soluciones de una proteína fluorescente en las entradas, genera 17 mezclas entre ambas creando un gradiente con un perfil exponencial. En la última porción del dispositivo se añadió una zona de detección para inmovilizar estas proteínas fluorescentes, medir la señal que emiten y generar una curva estándar. Se estudió el funcionamiento de ambas partes del dispositivo por separado, demostrando que funcionan según lo esperado. El sistema completo fue probado y los resultados obtenidos demuestran que el dispositivo propuesto puede funcionar si se modifica utilizando parámetros y consideraciones adecuadas, basadas en lo obtenido.

ABSTRACT

Since the beginnings of microfluidics it has been of interest to use the advantages it offers to simplify systems while keeping or improving their characteristics, as in the case of immunoassays. It has been demonstrated that using microfluidic devices it is possible to achieve the same resolution and sensibility than that of commercial equipment for immunoassays, saving time and resources due to the small quantities of reagents needed. These devices are focused to perform the detection of analytes but the quantification is not different from the conventional method. In this study we propose to integrate different microfluidic systems to automatize the quantification. A microfluidic device capable of generating a concentration gradient with protein solutions was fabricated. By injecting two different solutions of a fluorescent protein it can generate 17 different mixtures of them creating a gradient with an exponential profile. We also added a detection zone to immobilize these proteins, measure the signal and create a standard curve. We tested the performance of both parts of the device and it showed that they worked as expected. The system was tested as a whole and the results show that the proposed device could work if adequate modifications are made using parameters and considerations based on these results.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Microfluídica

La microfluídica es la ciencia y tecnología de controlar con precisión fluidos con volúmenes de femto a nanolitros en estructuras del orden de micrómetros [1]. Las primeras aplicaciones de la microfluídica fueron en métodos analíticos como cromatografía de gases y electroforesis capilar, donde reduciendo el diámetro de los capilares por los que fluyen las muestras a algunas decenas de micrómetros lograron reproducir los resultados de los equipos utilizados convencionalmente, demostrando que es posible reducir considerablemente el tamaño de los mismos sin perder sensibilidad [2]. Buscando reducir aún más estos sistemas de detección, encontraron que utilizando técnicas de fabricación de microelectrónica podían realizar sistemas más pequeños y que tuvieran la misma sensibilidad que uno convencional. En la década de 1970 S. Terry y colaboradores crearon un sistema de cromatografía de gases en una oblea de silicio con técnicas de fotolitografía, Figura 1.1 [3]. A partir de este sistema otros grupos comenzaron a utilizar diferentes métodos de fabricación para crear dispositivos con estructuras micrométricas para aplicaciones en biología, química y medicina, principalmente, a los que se les llama *dispositivos microfluídicos*.

Entre las ventajas de utilizar dispositivos microfluídicos está el uso de menor cantidad de reactivos y muestra, bajo costo de fabricación, espacio de trabajo reducido, flujo laminar en los canales (explicado a detalle en el siguiente punto), entre otras. Una ventaja importante en biología es que por las dimensiones de los canales la relación superficie-volumen es alta, lo que mejora el transporte de masa, lo cual disminuye considerablemente el tiempo de los ensayos analíticos y aumenta su confiabilidad [4],

[5]. Por estas ventajas la microfluídica se ha constituido como una herramienta de miniaturización de sistemas biológicos y de análisis químicos existentes [1] y como un nuevo método para resolver problemas que son complejos de resolver con técnicas convencionales, como análisis de célula única [6].

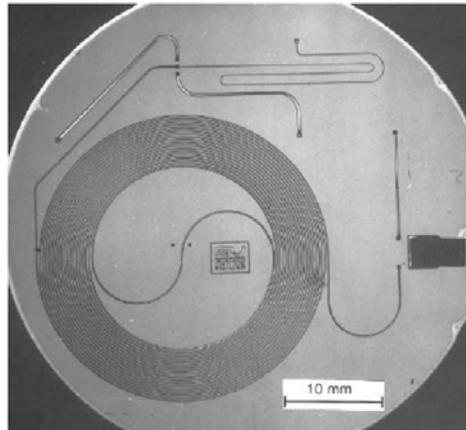


Fig. 1.1: Fotografía de un sistema de cromatografía de gases con una columna en espiral de 1.5 m en una oblea de silicio de 5 cm de diámetro (Figura tomada de [3]).

1.1.1 Flujo volumétrico en canales microfluídicos

Antes de diseñar un dispositivo microfluídico es importante conocer la teoría detrás de lo que ocurre dentro de los canales. La física y las matemáticas del flujo a escala microscópica son muy conocidas, difiriendo considerablemente de su contraparte en escala macroscópica. Al movimiento neto en una dirección de un volumen de fluido a través de un área por unidad de tiempo se le llama *flujo volumétrico* [7]. La mayor parte de la siguiente explicación proviene del libro *Theoretical Microfluidics* de H. Bruus [8].

En la microfluídica se hacen dos asunciones importantes al calcular el flujo volumétrico en canales microfluídicos; la primera es que el fluido es incompresible, lo cual significa que su densidad permanece constante en espacio y tiempo. Esto nos lleva

a la ecuación de continuidad, que habla de la conservación de masa, y toma la siguiente forma,

$$\nabla \cdot \vec{v} = 0 \quad (1.1)$$

donde \vec{v} es el vector velocidad; esta ecuación hace referencia a que en los canales microfluídicos no hay fuentes ni sumideros, en otras palabras, no se pierde ni se gana fluido. La segunda asunción es que el fluido es Newtoniano, la viscosidad del fluido es constante.

Podemos describir el movimiento de un fluido Newtoniano incompresible a través de la ecuación de Navier-Stokes, la cual habla de la conservación de momento lineal en un volumen, y bajo estas condiciones toma la siguiente forma,

$$\rho[\partial_t \vec{v} + (\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v}] = -\nabla p + \eta \nabla^2 \vec{v} \quad (1.2)$$

donde ρ es la densidad del fluido, p es la presión ejercida sobre el fluido y η es la viscosidad del mismo. El término $(\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v}$ hace no lineal la ecuación 1.2, provocando que sea complicado obtener una solución analítica. Para facilitar los cálculos se hacen adimensionales todos los términos de la ecuación anterior utilizando una velocidad y una longitud características, V_0 y L_0 , a las que se les asignan valores comúnmente utilizados en dispositivos microfluídicos, como el ancho de un canal y la velocidad de flujo promedio. Después de hacer adimensionales los términos, el resultado es la siguiente expresión,

$$Re[\hat{\partial}_t \hat{v} + (\hat{v} \cdot \hat{\nabla}) \hat{v}] = -\hat{\nabla} \hat{p} + \hat{\eta} \hat{\nabla}^2 \hat{v} \quad (1.3)$$

en la que el tilde denota que la cantidad es adimensional, y Re es el número de Reynolds, que compara las fuerzas inerciales contra la viscosidad,

$$Re = \frac{\rho V_0 L_0}{\eta}. \quad (1.4)$$

Cuando $Re \ll 1$ la viscosidad domina y el flujo es laminar, y cuando $Re \gg 1$ dominan las fuerzas inerciales y existe turbulencia; lo anterior está representado en la Figura 1.2. Como un ejemplo, se pueden considerar valores comúnmente utilizados en

dispositivos microfluídicos: una longitud característica de $100\ \mu\text{m}$, que es una cantidad usada como el ancho de un canal; la densidad y viscosidad del agua que son $1000\ \text{kg m}^{-3}$ y $10^{-3}\ \text{Pa s}$, respectivamente; y una velocidad característica de $1\ \text{mm s}^{-1}$. Con estos valores $Re = 0.01$, lo que indica que el régimen de flujo es laminar [9].

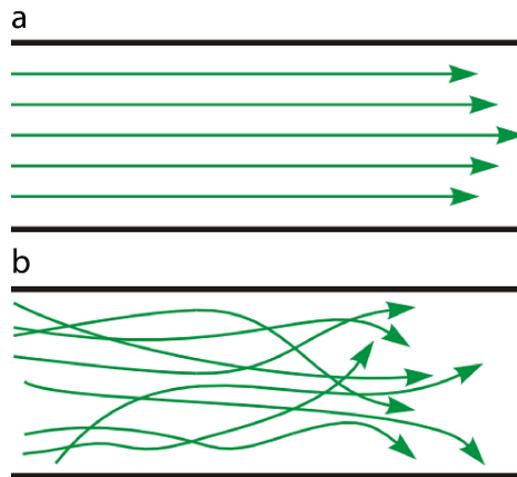


Fig. 1.2: Diferencia entre el régimen de flujo en canales microfluídicos en un plano. Las flechas indican las líneas de flujo dentro de un canal. **(a)** Flujo laminar. El fluido sigue una trayectoria en línea recta. **(b)** Flujo turbulento. El flujo neto es de izquierda a derecha, pero el fluido no sigue una trayectoria fija, cambia de dirección constantemente (figura tomada de [10]).

A bajos Re el término de viscosidad $\nabla^2 \vec{v}$ de la ecuación (1.2) domina y se puede reducir la ecuación de Navier-Stokes a una ecuación lineal,

$$0 = -\nabla p + \eta \nabla^2 \vec{v} \quad (1.5)$$

siempre y cuando el campo de velocidades no cambie con el tiempo. En microfluídica normalmente se utiliza una diferencia de presión entre entrada y salida de los canales para generar movimiento del fluido, este tipo de flujo puede ser calculado utilizando la ley de Poiseuille. Esta ley es una solución analítica para la ecuación de Navier-Stokes cuando un fluido se mueve en un solo eje a causa de una diferencia de presión en un canal cilíndrico recto y largo.

Debido a las diferentes técnicas de fabricación de dispositivos microfluídicos los canales rectangulares son los más comunes. Para calcular el flujo en estos canales no hay una solución analítica, pero se obtiene una aproximación con series de Fourier de la ley de Poiseuille. Primero, como el flujo se mueve solo en el eje x , el campo de velocidades no tiene componentes en y y z , por lo tanto,

$$v(\vec{r}) = v_x(y, z)\vec{i} \quad (1.6)$$

donde \vec{i} es un vector unitario con dirección x . De igual manera, no hay cambios de presión en los ejes y y z , por lo que el campo de presiones solo depende de x . Reescribiendo la ecuación 1.5 se obtiene,

$$\eta[\partial_y^2 + \partial_z^2]v_x(y, z) = \partial_x p(x). \quad (1.7)$$

Se considera que el ancho w del canal es mayor a la altura h , $w > h$, y el fluido se mueve en dirección del eje x a lo largo del canal de longitud L a causa de una diferencia de presión Δp constante; en la Figura 1.3a se muestra como se consideran las dimensiones del canal. Se hace una consideración de no deslizamiento en los bordes, en la que se asume que la capa de fluido que está en contacto con las paredes del canal está en reposo y el perfil de flujo es parabólico. Tomando las dimensiones de la sección transversal del canal como se muestra en la Figura 1.3b, esta consideración nos lleva a la siguiente ecuación,

$$[\partial_y^2 + \partial_z^2]v_x(y, z) = -\frac{\Delta p}{\eta L}, \quad \text{para } -\frac{1}{2}w < y < \frac{1}{2}w, 0 < z < h, \quad (1.8a)$$

$$v_x(y, z) = 0, \quad \text{para } y = \pm\frac{1}{2}w, z = 0, z = h. \quad (1.8b)$$

Con esta forma de la ecuación de Navier-Stokes podemos representar el campo de velocidades a través de series de Fourier,

$$v_x(y, z) = \frac{4h^2\Delta p}{\pi^3\eta L} \sum_{n, \text{impar}}^{\infty} \frac{1}{n^3} \left[1 - \frac{\cosh\left(\frac{n\pi y}{h}\right)}{\cosh\left(\frac{n\pi w}{2h}\right)} \right] \sin\left(n\pi \frac{z}{h}\right). \quad (1.9)$$

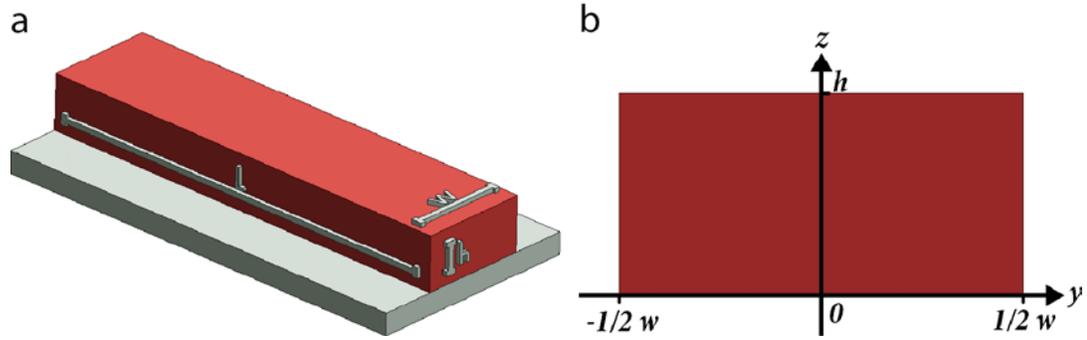


Fig 1.3: Ilustración de un canal con sección transversal rectangular. **(a)** Representación en 3D de un canal microfluídico con sus dimensiones. **(b)** Representación de la sección transversal (plano yz) del canal.

Si se integra la ecuación anterior se obtiene una aproximación del flujo volumétrico Q ,

$$Q \approx \frac{h^3 w \Delta p}{12 \eta L} \left[1 - 0.63 \frac{h}{w} \right]. \quad (1.10)$$

En la ecuación 1.10 se observa que el flujo volumétrico es directamente proporcional a la diferencia de presión en el canal microfluídico, y se puede decir que las dimensiones y forma del canal le confieren una *resistencia* u oposición al paso del fluido. Lo anterior se resume en la ley de Hagen-Poiseuille,

$$Q = \frac{\Delta p}{R_h} \quad (1.11)$$

en la cual R_h es la resistencia hidráulica del canal. A partir de las ecuaciones 1.10 y 1.11 se puede obtener una expresión para R_h cuando el canal tiene una sección transversal rectangular,

$$R_h = \frac{12 \eta L}{h^3 w \left[1 - 0.63 \frac{h}{w} \right]} \quad (1.12)$$

La ley de Hagen-Poiseuille es análoga a la ley de Ohm en los circuitos eléctricos, donde la diferencia de potencial eléctrico ΔV entre dos terminales es igual al producto de la resistencia R y la corriente eléctrica I .

Cuando hay dos o más canales microfluídicos conectados en serie (Figura 1.4a), la R_h total del sistema es la suma de las resistencias hidráulicas de cada canal,

$$R_h = R_{h1} + R_{h2} + \dots + R_{hn} \quad (1.13)$$

Si los canales están conectados en paralelo (Figura 1.4b), se considera que el flujo volumétrico se conserva en los dos puntos donde se intersectan los canales microfluídicos, por lo tanto $Q = Q_1 + Q_2 + \dots + Q_n$ y la diferencia de presión es la misma en ambos canales ya que comienzan y terminan en el mismo lugar, entonces,

$$R_h = \left(\frac{1}{R_{h1}} + \frac{1}{R_{h2}} + \dots + \frac{1}{R_{hn}} \right)^{-1} \quad (1.14)$$

Es importante recordar que lo anterior es solo valido para canales microfluídicos donde Re es bajo y $w > h$.

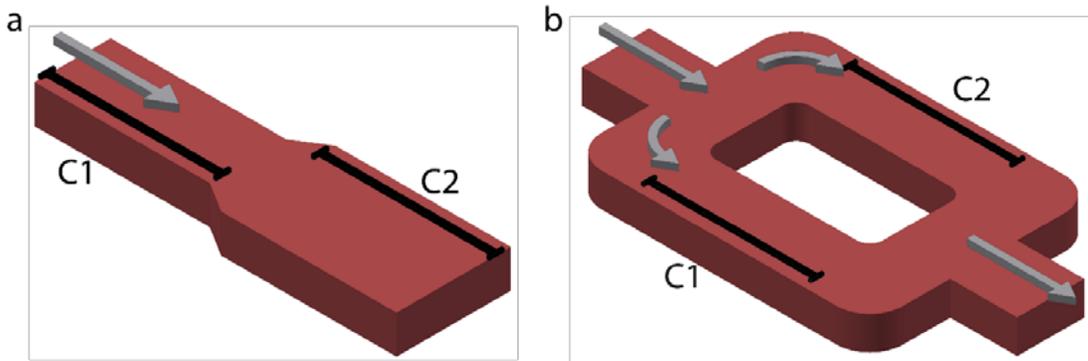


Fig. 1.4: Canales microfluídicos en serie y paralelo, las flechas indican la dirección del flujo. Para calcular la R_h total se utilizan las ecuaciones 1.13 y 1.14, respectivamente.
(a) Dos canales conectados en serie con diferente ancho, lo que les da una R_h distinta.
(b) Dos canales conectados en paralelo.

1.1.2 Difusión

En la sección anterior se resumió el comportamiento del fluido en estado estable, donde se considera que las propiedades del sistema se mantienen constantes a lo

largo del tiempo. Ahora es necesario mencionar un fenómeno dependiente del tiempo: la *difusión*.

En un sistema macroscópico, si se agregan unas gotas de colorante azul a un vaso que tiene una solución amarilla y se agita con una cuchara, la fuerza que se aplica al fluido provoca que las moléculas de ambos colores se mezclen rápidamente y en poco tiempo se forme una solución de color verde uniforme. Al hacer esto, se transportan las moléculas de un lugar a otro en el vaso a través de la fuerza aplicada con la cuchara, creando turbulencia dentro del sistema; a este tipo de transporte de moléculas se le llama *convección*.

En los canales microfluídicos, generalmente no existe turbulencia y la convección es casi nula. Para explicar lo que sucede en ellos podemos suponer que dos corrientes de flujo viajan cada una en un canal microfluídico con una concentración diferente de alguna molécula y después llegan a un canal en común (representado en la Figura 1.5), ambas corrientes seguirán su camino a través del nuevo canal, viajando una junto a la otra. Suponiendo un flujo laminar, no hay fuerzas externas perpendiculares a las corrientes de flujo que provoquen que las moléculas se mezclen y por lo tanto no hay convección. Aun así, existe una mezcla entre las soluciones pero esta vez el movimiento de las moléculas es debido al choque aleatorio entre ellas inducido por las fluctuaciones térmicas; en otras palabras, al movimiento Browniano. El movimiento neto de las moléculas es a favor del gradiente de concentración, es decir, se mueven de donde hay una mayor concentración de ellas a donde hay una menor; a este tipo de transporte de moléculas se le llama *difusión* [8], [11]. Lo anterior se observa en la Figura 1.5, en la cual las moléculas del canal 1 (C1) al estar en contacto con la solución del canal 2 (C2) que está ausente de ellas, difunden hacia el otro lado resultando en una solución homogénea después de una distancia dada.

Según se observa en la Figura 1.5, el flujo neto de moléculas es en una sola dimensión, a lo ancho del canal, teniendo que a lo largo y alto el flujo neto es cero. Considerando lo anterior se utiliza el modelo de camino aleatorio en una dimensión para obtener el

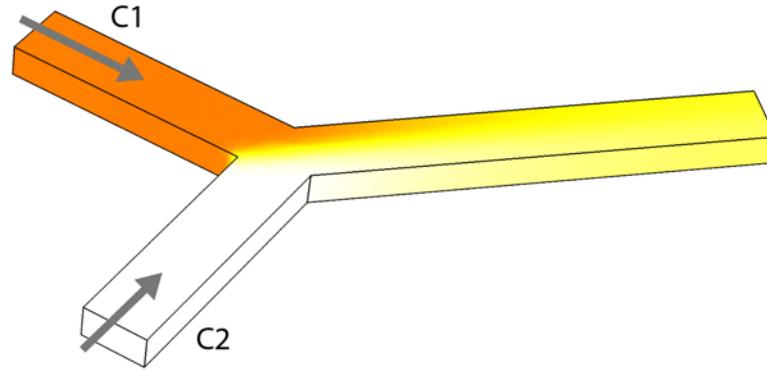


Fig. 1.5: Simulación en COMSOL Multiphysics de la difusión de moléculas en canales con flujo laminar. Las flechas grises indican la dirección del flujo. El canal 1 (C1) contiene una concentración x de alguna molécula y el canal 2 (C2) una concentración 0 de la misma. Cuando ambos fluidos se encuentran fluyen uno junto al otro y las moléculas comienzan a difundir del lugar de mayor al de menor concentración logrando una mezcla homogénea si están en contacto el tiempo suficiente.

tiempo característico, o tiempo de difusión t_D , que le toma a una molécula recorrer una distancia l ,

$$t_D = \frac{l^2}{D} \quad (1.15)$$

donde D es el *coeficiente de difusión* [8], una propiedad característica de cada molécula que a su vez depende de la viscosidad de la solución y la temperatura, y se calcula con la ecuación de Einstein-Stokes,

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_H} \quad (1.16)$$

en la cual k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, η es la viscosidad de la solución y r_H es el radio hidrodinámico de la partícula [12], [13]. De la ecuación 1.15 se puede ver que t_D depende del cuadrado de la distancia que va a recorrer la molécula, lo que significa que el movimiento por difusión de las partículas en distancias cortas es rápido, pero es cada vez más lento mientras se incrementa la distancia, o si el coeficiente de difusión es alto.

En sistemas microfluídicos generalmente el régimen de flujo es laminar, pero dependiendo de la forma y dimensiones de los canales podría existir turbulencia, lo cual en ocasiones se provoca para mezclar soluciones con más facilidad. El *número de Péclét*, Pe , es un número adimensional que nos dice que tan importante es la convección sobre la difusión,

$$Pe = \frac{V_0 L_0}{D} \quad (1.17)$$

donde V_0 y L_0 son nuevamente una velocidad y longitud características, respectivamente. Cuando el número de Péclét es $\gg 1$ la convección domina sobre la difusión, y viceversa [7], [14], [15].

1.1.3 Diseño y fabricación de dispositivos microfluídicos

Una vez que se conocen las ecuaciones que describen el comportamiento del fluido en los microcanales, podemos pasar al diseño y fabricación de los mismos. Existen diferentes técnicas para fabricar dispositivos microfluídicos, como litografía suave, micromaquinado e impresión 3D, y cada una tiene ventajas y desventajas sobre las demás. La técnica de fabricación adecuada depende de la aplicación a la cuál esté destinado el dispositivo microfluídico. Recientemente la fabricación por litografía suave ha sido la más utilizada debido a las ventajas que ofrece sobre las demás: el material con el que se hacen los dispositivos es biocompatible, transparente y de bajo costo [16], [17]; permite fabricar dispositivos complejos y hacer uso de válvulas para controlar el paso de fluido a través de los canales; tiene una alta resolución, permitiendo fabricar canales con dimensiones en el orden de nanómetros [18]–[20].

Para este proyecto se utilizó la técnica de litografía suave para fabricar los dispositivos microfluídicos, por lo que se explica a detalle el proceso a continuación.

1.1.3.1 Fabricación por litografía suave

La litografía suave es una técnica de microfabricación que se basa en la técnica de la fotolitografía, que es ampliamente utilizada en la microelectrónica [21], para crear dispositivos microfluídicos con un material flexible llamado polidimetilsiloxano (PDMS) [22]. El primer paso en el proceso es crear el diseño del dispositivo microfluídico con algún software de diseño CAD, como Autodesk AutoCAD. Ya que el diseño está terminado se imprime el negativo en alta resolución en un material transparente, para que de esta manera los canales sean translúcidos y lo demás está cubierto por la tinta. A esta impresión se le llama *máscara*.

Posteriormente, con la máscara se crea un *molde maestro* del diseño. Para esto se toma una oblea de silicio limpia (Figura 1.6a), se le vierte encima fotorresina y se pone en un *spin coater* para crear una capa de unas cuantas decenas de micrómetros (Figura 1.6b) [23]. La fotorresina es un polímero fotosensible que al ser irradiado con luz en cierto rango de longitudes de onda cambia sus propiedades físicas y químicas; el principal cambio es en la solubilidad de las partes expuestas o no expuestas ante un revelador, dependiendo si la resina es positiva o negativa, respectivamente [24]. Ya que se tiene la oblea con la fotorresina se coloca la máscara sobre la oblea (Figura 1.6c) y se expone a luz UV por unos segundos (Figura 1.6d y 1.6e), después se remueve la fotorresina no deseada con un revelador, dejando solamente las estructuras en relieve del diseño original y dando por resultado el molde maestro (Figura 1.6f) [21]. Puede sustituirse el uso de la máscara y la lámpara UV con un equipo llamado *Micro Pattern Generator*, que traza con un láser de luz UV directamente sobre la fotorresina, obviando el uso de una máscara.

Ya que se tiene el molde maestro se hace una mezcla de pre-polímero de PDMS y agente curador en relación 10:1 y se vierte sobre el molde (Figura 1.6g). El PDMS cubre el molde y se deja polimerizar ya sea a temperatura ambiente o en un horno de convección. Una vez polimerizado se despega cuidadosamente del molde maestro, dando como resultado un elastómero con los canales grabados en la base del mismo.

El resultado es una silicona flexible, biocompatible, inerte y transparente. Posteriormente, se hacen las perforaciones en las entradas y salidas de los microcanales del dispositivo por donde se inyectará el fluido y después se adhiere a una superficie plana y limpia (por lo general un portaobjetos) para sellar los canales, obteniendo así el dispositivo microfluídico (Figura 1.6h) [17]. Para adherir el PDMS al vidrio se tratan ambas superficies con plasma de oxígeno, que al ponerlas en contacto ayuda a que se formen enlaces covalentes entre sí; esto también hace a las superficies hidrofílicas, cuando normalmente el PDMS es hidrofóbico, ayudando a introducir más fácilmente líquido en los canales [25]–[27].

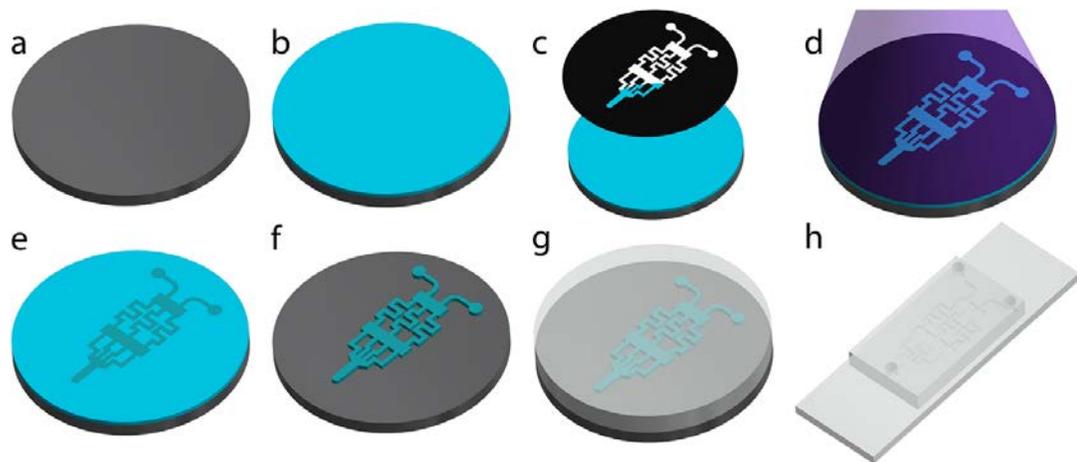


Fig. 1.6: *Proceso de fabricación por litografía suave. (a) Oblea de silicio. (b) Oblea de silicio cubierta con una fina capa de fotorresina. (c) Máscara con los canales microfluídicos impresos. (d) Exposición a luz UV. (e) Resultado de la exposición a luz UV a través de la máscara. (f) Molde maestro después del revelado. (g) Molde maestro recubierto con PDMS. (h) Dispositivo microfluídico de PDMS cortado, perforado y adherido a un portaobjetos.*

1.1.3.2 Litografía suave multicapa, válvulas de Quake

Es posible crear dispositivos microfluídicos con dos o más capas de PDMS por litografía suave, cada capa con canales y alinearlas para que funcionen en conjunto, permitiendo crear válvulas para ocluir el flujo en algunos canales [28] o bombas peristálticas para mover el fluido [29], entre otras estructuras [30]. Para obtener estos

dispositivos es necesario fabricar dos moldes maestros, uno para cada capa, después hacer una de las capas de PDMS de unas cuantas decenas de micrómetros de altura, para así pegar la otra capa encima y como resultado quede una membrana delgada de PDMS entre los canales de ambas capas.

Al crear este ensamblaje se utilizan los canales de una de las capas de PDMS como válvulas para ocluir el flujo en la otra capa, como se muestra en la Figura 1.7 [28]. La capa a la cual se ocluye el flujo se le llama *capa de flujo* y en la que se usan los canales como válvulas se le llama *capa de control*. Para que esto funcione es necesario que el molde de la capa de flujo sea fabricado con fotorresina positiva, mientras que el molde de la capa de control con fotorresina negativa. La diferencia entre ambas fotorresinas radica en que las zonas expuestas a luz UV se solubilizan en la positiva, mientras que se hacen más resistentes al revelador con la negativa. Por consiguiente, la fotorresina negativa después de exponerse se vuelve rígida; en cambio, la positiva que no es removida puede someterse a un proceso llamado *reflujo*. El reflujo consiste en calentar la fotorresina por arriba de su punto de fusión, provocando que los canales se derritan y adquieran un perfil redondeado [31].

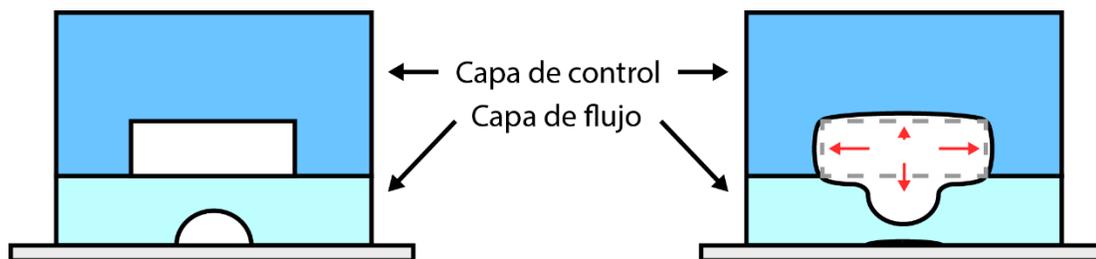


Fig. 1.7: Esquema de funcionamiento de las válvulas en los dispositivos microfluídicos. La imagen de la izquierda muestra ambas capas del dispositivo con una válvula despresurizada encima de un canal de flujo. La imagen de la derecha muestra la expansión de la válvula y deflexión de la membrana entre ambas capas al presurizar la válvula de la capa de control, ocluyendo por completo el canal de flujo.

Ya que se tienen los dos moldes, la capa de flujo se pone en un *spin coater* para depositar una capa delgada y uniforme de pre-polímero de PDMS y agente curador

en relación 20:1, aproximadamente 30 μm más alta que los canales de la misma. En el molde de la capa de control la relación de pre-polímero de PDMS y agente curador cambia a 5:1 y la altura generalmente va de los 5 a los 10 mm. Ambos moldes se calientan en un horno de convección y se sacan antes de que el PDMS se polimerice por completo (aproximadamente 30 min a 80°C), se desprende el PDMS del molde de control y se coloca encima del PDMS de la capa de flujo que aún está adherido a su molde, se alinean manualmente y se meten nuevamente al horno para que se polimericen por completo. Después se desprende el PDMS del molde, se perforan entradas y salidas y se adhiere a un portaobjetos después de tratarlos con plasma de oxígeno. De esta manera se obtiene el dispositivo multicapas.

Las capas se hacen con diferente relación de PDMS y agente curador debido a que la diferencia de concentración de agente curador entre las dos capas provoca que, cuando se pone una capa sobre la otra, haya difusión del agente curador de la capa de control a la de flujo, ayudando a la adhesión entre ellas [32]. Por otra parte, mientras más agente curador se disuelve en el PDMS éste se vuelve más rígido. La membrana que existe entre las capas de control y flujo es el PDMS de la capa de flujo, por lo que ésta es más suave y delgada que las paredes y el techo de los canales de control. Entonces, al aplicar presión positiva en los canales de control es más fácil deformar la membrana que las paredes, reflejándose en la defeción de la membrana [33].

Para ocluir un canal de flujo es necesario que un canal de control pase por encima de él para que así funcione como válvula. Se aplica presión positiva en el canal de control, éste se expande y empuja la membrana de PDMS que hay entre ambos canales hacia el portaobjetos, ocluyendo así la porción del canal que está debajo de ella. Estas válvulas fueron publicadas por el grupo de S. Quake, por lo que se les llaman *válvulas de Quake* [28].

Las válvulas son canales sin salida (canales cerrados) que pasan por encima de los canales de flujo, por lo que al diseñar la capa de control se procura que sus canales

sean lo suficientemente anchos para que con la presión que se aplique logren ocluir los canales de flujo, y lo suficientemente delgados para que no ocluyan por completo los canales de flujo por los que tengan que atravesar (Figura 1.8) [34].

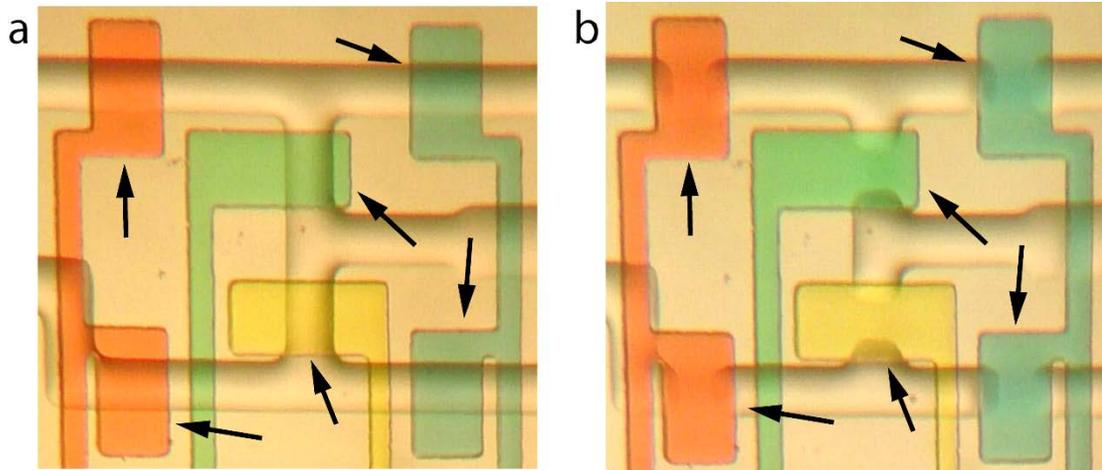


Fig. 1.8: Fotografías de un dispositivo con capa de flujo (canales transparentes) y capa de control (canales de colores). Se muestra la diferencia entre no presurizar **(a)** y presurizar **(b)** los canales, “válvulas”, de la capa de control. Las flechas indican las válvulas. Al presurizarlas se ocluyen los canales de la capa de flujo. En **(b)** puede observarse que los canales delgados de la capa de control no ocluyen canales de la capa de flujo.

1.2 Aplicaciones de la microfluídica

Desde el surgimiento de la microfluídica en la década de 1970, los dispositivos microfluídicos se han utilizado principalmente en la biomedicina con los llamados *micro total analysis systems* (μ TAS) o *lab-on-a-chip* (LOC). Son llamados así por ser sistemas en microescala que integran diferentes componentes para realizar parcialmente o en su totalidad algún tipo de análisis biológico y/o químico [35], [36].

Se ha demostrado que los dispositivos LOC pueden ser utilizados para replicar aplicaciones de sistemas macroscópicos, como por ejemplo realizar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) a múltiples genes de una bacteria [37], generar un gradiente de concentración para estudios de quimiotaxis [38] o generar liposomas gigantes por electroformación [39]. También se ha demostrado que la microfluídica permite realizar estudios que en escala macroscópica son complicados, como estudios de célula única [40], [41].

Aparte de las aplicaciones anteriores, la microfluídica es ampliamente utilizada para realizar inmunoensayos debido a que las dimensiones de los canales permiten que el transporte de moléculas sea rápido y que se requiera una menor cantidad de reactivos y muestra, reflejándose en análisis rápidos y de bajo costo [42]. La aplicación de la microfluídica en inmunoensayos es de particular interés para este trabajo, por lo que se explica más a detalle en los siguientes puntos.

1.3 Inmunoensayos

El sistema inmune es capaz de detectar sitios específicos (epítopes) presentes en la superficie de moléculas o microorganismos extraños (antígenos) mediante proteínas denominadas anticuerpos. Los sitios que detectan los anticuerpos son llamados epítopes y son sólo pequeñas zonas de moléculas llamadas antígenos, que a su vez forman parte de la molécula o microorganismo extraño [43]. Un inmunoensayo es un conjunto de técnicas analíticas que utilizan la interacción antígeno-anticuerpo para determinar la presencia y concentración de antígeno en una muestra biológica [44]. Es necesario mencionar que existen dos tipos de anticuerpos, policlonales y monoclonales; los policlonales son anticuerpos que reconocen diferentes epítopes de un antígeno, mientras que los monoclonales sólo uno [45].

Por lo general, al hacer un inmunoensayo una de las moléculas, ya sea un anticuerpo o el antígeno, se inmoviliza en una superficie para posteriormente agregar las moléculas de detección. De manera breve, una vez que el anticuerpo fue adherido a la superficie, se agrega la solución en la cual el antígeno está presente, posteriormente, la reacción es detectada mediante un segundo anticuerpo también específico para el antígeno acoplado a una molécula de detección, que puede ser un fluoróforo o una enzima que al estar en contacto con un sustrato provocan un cambio de color en el mismo. [46]. La Figura 1.9 muestra los pasos de un inmunoensayo.

Los inmunoensayos pueden clasificarse como directos o indirectos y competitivos o no competitivos. En los inmunoensayos directos la cuantificación del analito es realizada de acuerdo a la señal emitida por el anticuerpo adherido al antígeno; en los indirectos es necesario agregar un anticuerpo secundario para realizar la cuantificación. Por otra parte, en un inmunoensayo no competitivo la concentración de antígeno en la muestra es proporcional a la señal que emite el anticuerpo marcado. En el inmunoensayo competitivo se agrega un analito marcado junto con el antígeno de interés, y existe una competencia entre ambos por la unión al anticuerpo adherido

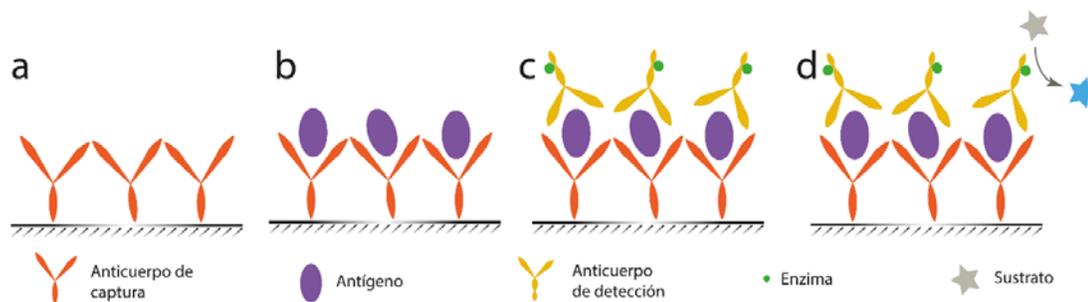


Fig. 1.9: Representación de los pasos de un inmunoensayo. Se adhiere el anticuerpo de captura a la superficie (a), posteriormente se agrega la muestra que contiene el antígeno de interés (b), en seguida se añade el anticuerpo marcado (c), y finalmente se realiza la detección (d), que en este caso representa un cambio de color en el sustrato. Entre cada paso se hacen lavados para eliminar remanentes.

a la superficie, por lo que la concentración del antígeno es inversamente proporcional a la señal que emite el analito marcado. La elección del tipo de inmunoensayo a utilizar depende de cada aplicación [47], [48].

Generalmente los inmunoensayos son hechos en placas de 96 pozos, donde en cada uno de los pozos puede agregarse una muestra distinta. Para convertir la señal obtenida a un valor numérico de concentración, es necesario tener una *curva estándar* contra la cual comparar la señal [49]. Para crear esta curva estándar se deben hacer soluciones con concentraciones conocidas del antígeno. Un método común de hacerlo es hacer diluciones a partir de una solución con una alta concentración del antígeno. Las concentraciones a utilizar dependen del antígeno a medir. Como ejemplo, en un protocolo comercial para cuantificación de factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en sangre, se utiliza como concentración más alta una solución de 500 pg/mL y a partir de ésta se generan diluciones seriales a la mitad de la concentración de la anterior hasta obtener siete soluciones, y además el tampón en el que se generan las diluciones se toma como concentración cero [50]. Estas ocho soluciones se agregan por duplicado a un pozo de la placa junto con las muestras (ocupando en total 16 pozos), y las concentraciones conocidas se utilizan para generar la curva estándar. Contra esta curva se comparan cada uno de los valores obtenidos

en los demás pozos y de esta manera se determina la concentración de antígeno en cada muestra. La señal de cada pozo se cuantifica comúnmente a través de un espectrofotómetro. La Figura 1.10 muestra un ejemplo de una placa y una curva estándar.

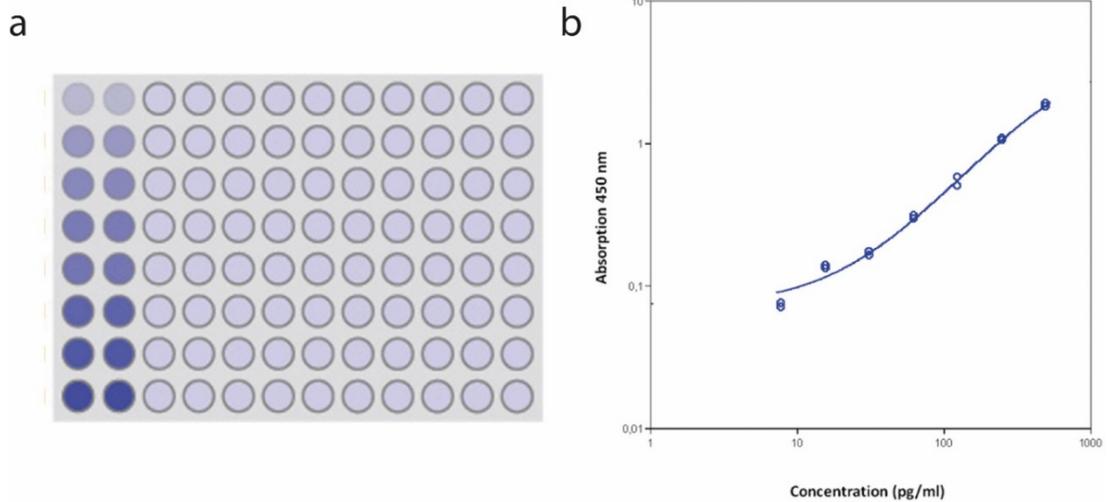


Fig. 1.10: Placa de ELISA y curva estándar. **(a)** Esquema de una placa de 96 pozos donde se ejemplifican los pozos con las diluciones para la curva estándar. **(b)** Curva estándar de un inmunoensayo para cuantificar TNF- α en sangre (Figuras tomadas de [50], [51]).

1.3.1 Inmunoensayos en dispositivos microfluídicos

Un inmunoensayo hecho con técnicas convencionales es un proceso largo. Cuando se hace en una placa de 96 pozos se requiere esperar largos periodos de incubación cada que se deposita una solución dependiendo del coeficiente de difusión de la molécula, la temperatura y el volumen que se utiliza, pudiendo ser desde una hora hasta toda la noche. Otro aspecto importante es que debido a que se requiere que la señal sea intensa para poderla detectar y cuantificar con un equipo de medición (como un espectrofotómetro), se utilizan volúmenes de 50-100 μ L por cada pozo y por cada solución empleada [43] resultando en el uso de volúmenes en el orden de mililitros.

Con la microfluídica se ha buscado disminuir el tiempo de reacción en inmunoensayos y el costo de los mismos al reducir el volumen requerido de soluciones y muestras. Por ejemplo, A. Rasooly y colaboradores fabricaron un dispositivo microfluídico en el que usan los principios de los inmunoensayos para detectar enterotoxina B estafilocócica. El dispositivo cuenta con 96 pozos de 13 μL en los que se depositan las muestras manualmente, pero que después pueden ser lavados todos al mismo tiempo a través de un canal común. Utilizaron tiempos de incubación de una hora para todas las muestras y una cámara CCD para detectar las señales de los pozos. Las ventajas que se obtienen con su sistema es el uso de una menor cantidad de muestra y un sistema de detección más barato. La sensibilidad de su sistema es similar al método convencional pero su dispositivo es muy complejo. El tiempo total del ensayo es relativamente similar a los inmunoensayos tradicionales y la curva estándar se hace de la misma manera [52].

Otro ejemplo es el dispositivo microfluídico del grupo de U. Demirci. Ellos desarrollaron un dispositivo microfluídico muy simple que utiliza los principios de los inmunoensayos para detectar y cuantificar HE4 (un biomarcador cuya presencia es indicio de cáncer de ovario) en orina. El dispositivo consta de 3 canales independientes en cada uno de los cuales se inmovilizan anticuerpos de captura y se completa el ensayo con los pasos habituales; los tiempos de incubación que utilizaron fueron de una hora. Utilizan una enzima que cambia de color en presencia de un sustrato y por medio de la cámara de un teléfono celular toman una fotografía y calculan la concentración con una aplicación en el mismo teléfono. Para las concentraciones de la curva estándar inyectan las soluciones una a una y con esos datos crean la curva estándar. En los canales se inyectan 100 μL y los tiempos de incubación son similares a los de un inmunoensayo convencional, pero la ventaja de su sistema es usar un teléfono celular para detectar y cuantificar, permitiendo que estos ensayos puedan hacerse en cualquier lugar y enviar los resultados inmediatamente a través de internet o por un mensaje de texto [53]. La Figura 1.11 muestra los dispositivos mencionados.

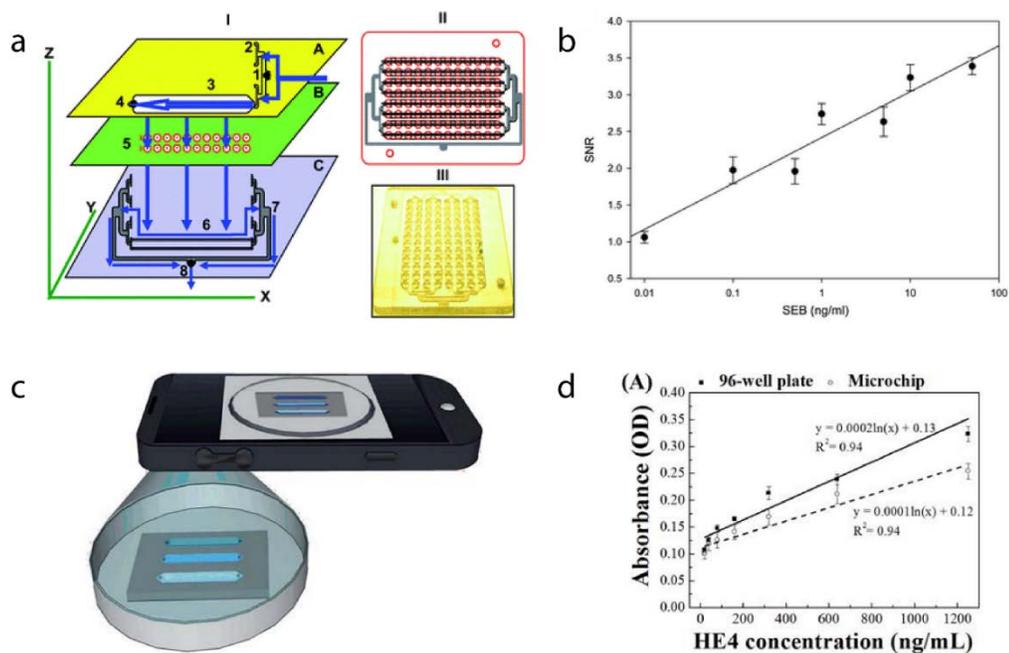


Fig. 1.11: Dispositivos microfluídicos reportados para hacer inmunoensayos. **(a)** Esquema y dispositivo de Rasooly, se muestran las capas con las que está fabricado el dispositivo. **(b)** Gráfica de concentración de enterotoxina B estafilocócica (SEB) contra la señal medida (SNR) al hacer una prueba con el dispositivo. **(c)** Esquema del dispositivo de Demirci, en el que se muestra el dispositivo y el teléfono celular con el que miden realizan la cuantificación. **(d)** Curva estándar obtenida con el dispositivo (línea punteada) y con una placa de 96 pozos (línea sólida). Muestran que el ajuste es similar con ambos métodos (figuras tomadas de [52], [53]).

Aparte de los dispositivos microfluídicos mencionados, hay otros sistemas que presentan diferentes ventajas al realizar inmunoensayos [42], pero en realidad ninguno de ellos ha resuelto el problema en su totalidad. La mayoría busca la detección de los antígenos de forma cualitativa o a través de crear las diluciones e inyectar una por una al dispositivo para crear la curva estándar, lo cual requiere el uso de más dispositivos, más instrumentos y/o experimentos más largos. Esta falta de integración de un método para cuantificar dentro del dispositivo microfluídico las concentraciones del antígeno de interés puede resolverse a través de la incorporación de otras estructuras a estos sistemas.

1.4 Otros sistemas microfluídicos de interés

1.4.1 Dispositivos microfluídicos generadores de gradientes de concentración

Con anterioridad se han reportado dispositivos microfluídicos en los cuales se inyectan dos, tres o más soluciones con moléculas o distintas concentraciones de una molécula, se fluyen a través de una red de canales microfluídicos y a lo largo de esta red se hacen mezclas controladas de las soluciones (generalmente por difusión) para generar un gradiente de concentración de las moléculas [54]. Estos sistemas han sido muy estudiados y se pueden crear gradientes de concentración con diferentes perfiles (lineales, exponenciales, sigmoidales, etc.) [55], por lo que podrían ser utilizados como un sistema para crear diluciones y generar una curva estándar. A estos sistemas les llamaremos dispositivos microfluídicos generadores de un gradiente de concentración (CGG, por sus siglas en inglés).

Los primeros dispositivos microfluídicos CGG reportados fueron por el grupo de G. Whitesides. Su sistema consiste en dispositivos que cuentan con tres canales de entrada y uno de salida, en cada canal de entrada se inyecta una solución con una concentración distinta con un flujo volumétrico constante e igual para todos, se divide el fluido de las entradas en la red de canales microfluídicos hasta dividirse a nueve canales que al final se unen en un canal ancho y se forma un gradiente de concentración con perfil lineal [56], [57]. La Figura 1.12a muestra el diseño del dispositivo, donde se observa que los tres canales de entrada llegan a un canal ancho común que después se divide en cuatro canales largos (serpentinales); el fluido de cada uno de los tres canales de entrada alimenta parcialmente a dos de los cuatro canales siguientes, combinándose con el fluido de los canales adyacentes; esto se repite en cada etapa del dispositivo. Debido a que el flujo es laminar, la mezcla de las soluciones

se da solo por difusión, por lo que los canales deben ser suficientemente largos para permitir una mezcla completa.

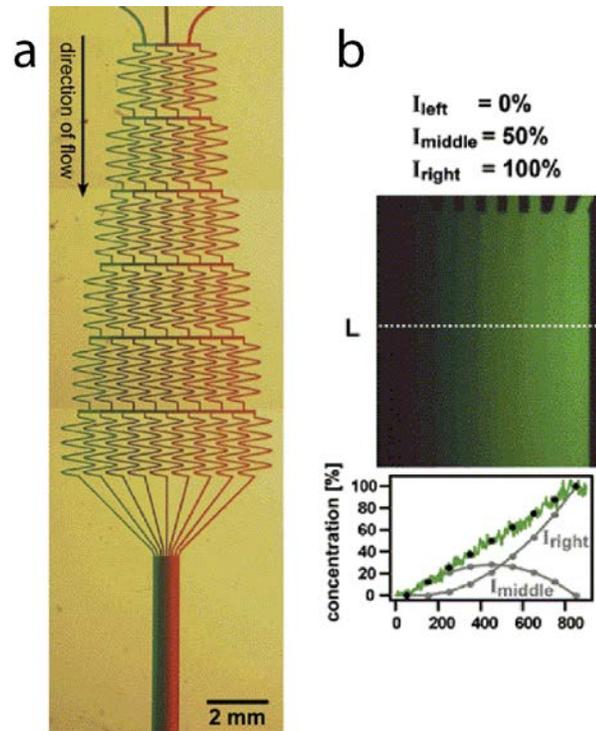


Fig. 1.12: Dispositivo microfluídico CGG de G. Whitesides para generar un gradiente de concentración lineal. **(a)** Fotografía del dispositivo que muestra la formación de un gradiente de concentración formado al inyectar tres soluciones con colorante; las entradas (canales superiores) recorren la red de canales microfluídicos dividiéndose en nueve canales que al final se unen en un canal de salida único (canal inferior). **(b)** Micrografía del canal de salida al inyectar soluciones con distintas concentraciones de FITC en las entradas. La línea punteada indica el lugar donde se realizó la medición. En la gráfica los puntos negros indican los valores de concentración esperados y la línea verde los valores obtenidos, los puntos y líneas grises indican la contribución de la entrada del centro y de la derecha a la línea verde (Figuras tomadas de [56]).

Para lograr un gradiente de concentración con un perfil lineal, el dispositivo se diseñó de manera que todos los serpentines que se originan en un mismo canal ancho tengan el mismo flujo volumétrico y así el volumen de fluido que sale de un canal ancho hacia la siguiente etapa de serpentines se distribuya equitativamente entre estos canales;

esto es logrado al hacer todos estos serpentines con las mismas dimensiones para que tengan la misma resistencia hidráulica, ya que al estar entre dos canales anchos en común la diferencia de presión en todos ellos es la misma. La Figura 1.12b muestra el resultado obtenido al inyectar tres soluciones con concentraciones distintas de isotiocianato de fluoresceína (FITC), una molécula fluorescente, en el dispositivo.

Basándose en el dispositivo reportado por G. Whitesides, A. Groisman y colaboradores publicaron un método para diseñar dispositivos microfluídicos que generen un gradiente de concentración con diferentes perfiles cambiando la resistencia de los serpentines. El método consiste en elegir el perfil y las concentraciones que se desean obtener a la salida del dispositivo y a partir de eso utilizar relaciones basadas en la ley de Hagen-Poiseuille (ecuación 1.11) para determinar la resistencia que debe tener cada canal de la red, provocando que en cada canal haya un flujo volumétrico distinto y así la proporción de volumen de cada serpentín que alimenta a otro de la siguiente etapa sea distinta [58].

Para calcular los parámetros del dispositivo, primero establecieron algunas condiciones: (1) el dispositivo cuenta con sólo dos entradas para inyectar soluciones, siendo esta la primer etapa, k_0 . (2) Todos los serpentines tienen el mismo ancho w y altura h , difiriendo solamente en su longitud L . (3) El volumen proveniente de cada serpentín de la etapa k se divide en 3 serpentines de la siguiente etapa ($k + 1$), a excepción de los serpentines de los extremos, que se dividen sólo en 2; de esta manera, en los serpentines nones de la etapa $k + 1$ se mantienen todas las concentraciones de los canales de la etapa k , mientras que en los serpentines pares se hace una mezcla de éstos. (4) Cada etapa cuenta con N serpentines, siendo N_k el último de ellos; se sabe que la primer etapa ($k = 0$) tiene dos serpentines ($N_0 = 2$) y la segunda ($k = 1$) tiene tres ($N_1 = 3$) debido a que sólo pueden mezclarse una vez entre ellos, se puede inferir que,

$$N_{k+1} = N_k + (N_k - 1) \text{ y} \tag{1.18a}$$

$$N_k = 2^k + 1. \tag{1.18b}$$

(5) Por último, eligieron utilizar un dispositivo de cuatro etapas ($k = 4$), con lo que se obtiene $N_4 = 17$, un dispositivo con 17 serpentines en la última etapa.

El flujo en los serpentines de cada etapa puede calcularse si se considera que el serpentín n de la etapa k ($\langle k, n \rangle$) provee de flujo a tres canales distintos, por lo que el flujo volumétrico en dicho serpentín está dado por:

$$Q_{k,n} = \alpha_{k,n}Q_{k+1,p-1} + Q_{k+1,p} + \beta_{k,n}Q_{k+1,p+1} \quad (1.19)$$

donde $p = 2n - 1$ y $\alpha_{k,n}$ y $\beta_{k,n}$ son las porciones de flujo que provee a sus serpentines izquierdo y derecho de la siguiente etapa, respectivamente. El serpentín $\langle k + 1, p - 1 \rangle$ es alimentado por los serpentines $\langle k, n \rangle$ y $\langle k, n - 1 \rangle$ y el $\langle k + 1, p + 1 \rangle$ por los serpentines $\langle k, n \rangle$ y $\langle k, n + 1 \rangle$, y sus concentraciones c están dadas por:

$$c_{k+1,p-1} = \alpha_{k,n}c_{k,n} + \beta_{k,n-1}c_{k,n-1} \quad (1.20a)$$

$$c_{k+1,p+1} = \beta_{k,n}c_{k,n} + \alpha_{k,n+1}c_{k,n+1}. \quad (1.20b)$$

Se considera que el 100% del flujo en un serpentín par proviene de las porciones de los serpentines de la etapa anterior que lo alimentan, por lo que se dice que,

$$\alpha_{k,n} + \beta_{k,n-1} = 1 \quad (1.21a)$$

$$\beta_{k,n} + \alpha_{k,n+1} = 1. \quad (1.21b)$$

Por sustitución se obtiene,

$$\alpha_{k,n} = \frac{c_{k+1,p-1} - c_{k,n-1}}{c_{k,n} - c_{k,n-1}} \quad (1.22a)$$

$$\beta_{k,n} = \frac{c_{k+1,p+1} - c_{k,n+1}}{c_{k,n} - c_{k,n+1}}. \quad (1.22b)$$

En el primer serpentín de cada etapa $\alpha = 0$, y en el último $\beta = 0$. Las Figuras 1.13a y 1.13b muestran una fotografía del diseño y un esquema de cómo se divide el flujo en los canales anchos.

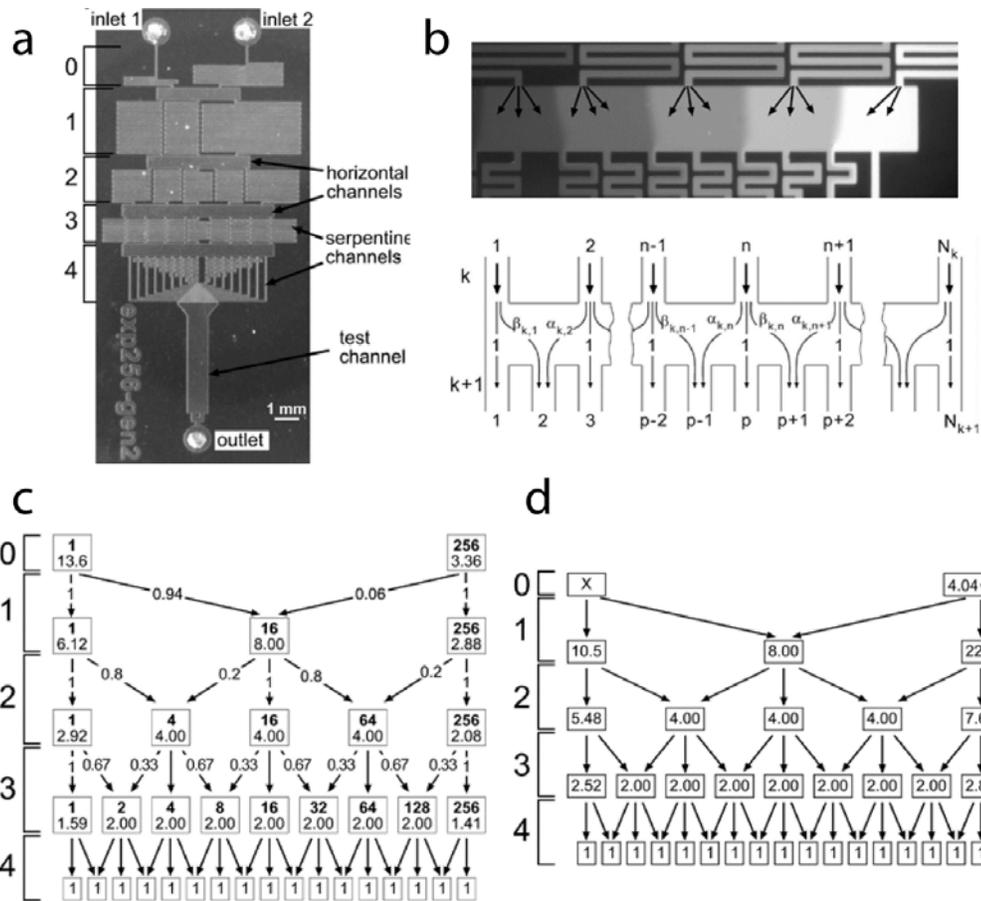


Figura 1.13: Dispositivo microfluídico CGG con perfil exponencial reportado. **(a)** Micrografía del dispositivo. **(b)** Micrografía y diagrama que muestran cómo se divide el volumen de un serpentin en la siguiente etapa; en la imagen de arriba puede observarse como la solución de un serpentin se divide en tres en los canales centrales y en dos en el del extremo. **(c)** Esquema con las concentraciones y flujos volumétricos de cada serpentin; la concentración es el número en negritas y el flujo volumétrico es el valor inferior en cada recuadro, ambos valores en unidades relativas. Los valores en las flechas indican la porción de fluido que se irá en cada dirección. **(d)** Esquema que muestra la longitud de cada serpentin en unidades relativas (Figuras tomadas de [58]).

Según la ecuación 1.12, la resistencia hidráulica depende de las dimensiones del canal, y si w y h son iguales en todos los serpentines ($w = 50 \mu m$ y $h = 40 \mu m$ para el dispositivo de A. Groisman), se puede decir que la resistencia hidráulica solo depende de la longitud del serpentin,

$$R_h = \gamma L, \quad (1.23a)$$

$$\gamma = \frac{12\eta}{h^3 w \left[1 - 0.63 \frac{h}{w}\right]}. \quad (1.23b)$$

donde γ es ahora una constante.

Para obtener los valores de Q , c y L de cada serpentín, se establece que la L de todos los canales de la última etapa ($k = 4$) es igual, y por consiguiente también Q . Se puede partir de esta asunción y decir que $L = 1$ y $Q = 1$, ambas en unidades arbitrarias. Entonces, $Q_{4,n} = 1$.

Para la concentración, ya se había mencionado que el conjunto de valores se elige para que se ajuste al perfil deseado. Para este trabajo nos enfocamos en el únicamente en el perfil exponencial que es el de interés. Entonces, el conjunto de valores que eligieron para la cuarta etapa es la siguiente progresión geométrica:

$$c_{4,n} = [1, \sqrt{2}, 2, 2\sqrt{2}, 4, \dots, 128, 128\sqrt{2}, 256].$$

Como se mencionó con anterioridad, los canales impares mantienen la concentración de los canales de la etapa anterior, por lo que a partir de este conjunto de concentraciones se pueden obtener todos los valores de c para todas las etapas. Al final, para la primer etapa ($k = 0$) se tienen solo los valores 1 y 256, y estas son las concentraciones en unidades relativas de las soluciones que se inyectan por las entradas del dispositivo. Con estos valores y las ecuaciones 1.19, 1.22a y 1.22b es posible obtener los valores de Q para todos los serpentines. La Figura 1.13c muestra los valores de c y Q para todos los serpentines del dispositivo.

Recordando la ley de Hagen-Poiseuille y tomando en cuenta la ecuación 1.23,

$$Q = \frac{\Delta p}{R_h} = \frac{\Delta p}{\gamma L}, \quad (1.24)$$

y como Δp es igual en todos los serpentines de una misma etapa, se obtiene,

$$L_{k,n} Q_{k,n} = L_{k,n+1} Q_{k,n+1} \quad (1.25a)$$

$$\frac{L_{k,n}}{L_{k,n+1}} = \frac{Q_{k,n+1}}{Q_{k,n}}, \quad (1.25b)$$

con lo que se puede obtener L para todos los serpentines de una misma etapa ya que se conocen todos los valores de Q .

Según los cálculos de Q , el flujo en los canales centrales disminuye a la mitad al avanzar una etapa, por lo que la relación de L entre los canales centrales de las distintas etapas es,

$$L_{1,2} = 2L_{2,3} = 4L_{3,5} = 8L_{4,9},$$

con lo que se completan los cálculos del dispositivo. Los valores en unidades arbitrarias de la longitud de los serpentines se muestra en la Figura 1.13d.

Con las ecuaciones y relaciones anteriores se obtienen todos los valores teóricos esperados en unidades relativas y pueden utilizarse para calcular los valores reales para un dispositivo. Para comprobar la teoría, calcularon los parámetros para un dispositivo en el que inyectaron dos soluciones de isotiocianato de fluoresceína (FITC) que tiene un coeficiente de difusión $D = 5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ en agua a 25 °C. Como el flujo es laminar, la difusión será totalmente lateral a lo largo del canal vertical, por lo que se calcula el tiempo que le tomará a las dos soluciones mezclarse completamente considerando sólo el ancho w del canal,

$$t_D = \frac{w^2}{2D} = \frac{(5 \times 10^{-3} \text{ cm})^2}{5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}} = 5 \text{ s}. \quad (1.26)$$

Después, utilizan $L_{1,2} = 31 \text{ mm}$ como un parámetro a partir del cual calcular las demás longitudes y el flujo que habrá en los serpentines. Si se divide $L_{1,2}$ entre t_D se obtiene la velocidad promedio en ese serpentin,

$$\bar{v}_{1,2} = \frac{L_{1,2}}{t_D} = 6.2 \text{ mm s}^{-1} \quad (1.27)$$

y, al conocer el área transversal A del canal (wh), se calcula el flujo volumétrico que debe haber en el canal para que las soluciones tengan tiempo suficiente de mezclarse,

$$A = wh = (50 \mu\text{m})(40 \mu\text{m}) = 2000 \mu\text{m}^2 \quad (1.28a)$$

$$Q_{1,2} = \bar{v}_{1,2}A = (12.4 \text{ mm s}^{-1})(2 \times 10^{-3} \text{ mm}^2) = 0.0124 \text{ mm}^3 \text{ s}^{-1} \quad (1.28b)$$

Convirtiendo las unidades de $Q_{1,2}$ a $\mu\text{L min}^{-1}$, se obtenemos $Q_{1,2} = 0.744 \mu\text{L min}^{-1}$ y con esto se calculan los flujos volumétricos en cada serpentín. Ahora se conocen las dimensiones y el flujo volumétrico de todos los serpentines y las entradas.

Por último, para probar todo el sistema, inyectaron soluciones de FITC en las entradas a una concentración de 0.059 ppm (151.52 nM) para la entrada de la izquierda y 15 ppm (385.22 μM) para la de la derecha. En la Figura 1.14 se muestran los resultados teóricos y experimentales obtenidos al probar el sistema.

Según se observa en la Figura 1.14, el dispositivo publicado funciona como se esperaba, los datos experimentales concuerdan con los cálculos teóricos y reportan también que el gradiente de concentración es estable si el flujo volumétrico en las entradas es constante [58].

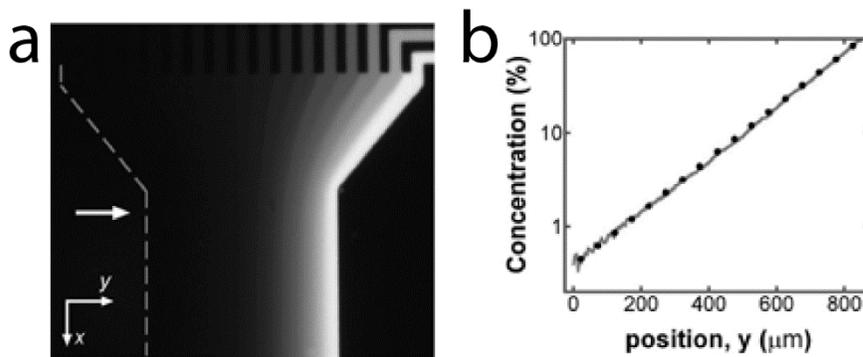


Fig. 1.14: Resultados experimentales y teóricos obtenidos por A. Groisman. **(a)** Fotografía del canal de salida en donde se juntan las 17 soluciones con diferentes concentraciones. La flecha blanca indica en dónde se midió el perfil de concentración. **(b)** Gráfica de la posición en y a lo largo del canal de salida contra la concentración. Los puntos representan los cálculos teóricos y la línea gris indica el perfil obtenido al analizar la imagen (Figuras tomadas de [58]).

Este tipo de dispositivos microfluídicos se han utilizado principalmente para estudios de quimiotaxis o migración celular [54]–[58], pero gracias a sus características podría

emplearse como un método para generar las diluciones necesarias para una curva estándar en un inmunoensayo. La ventaja de utilizar estos dispositivos es que el método para diseñarlo está ya desarrollado y hacer modificaciones al sistema para agregar nuevos componentes es una tarea relativamente sencilla.

1.4.2 Captura mecánica de moléculas en dispositivos microfluídicos

Un dispositivo CGG permitiría crear diluciones a partir de dos concentraciones iniciales, pero para generar una curva estándar es necesario atrapar los antígenos y cuantificarlos; para lograr esto existe un método reportado por el grupo de S. Quake, que consiste en bloquear sitios de canales microfluídicos y atrapar moléculas mecánicamente en ellos [59].

En el trabajo publicado describen un sistema que consiste en un arreglo de 2400 cámaras circulares controladas por 7233 válvulas. En las Figuras 1.15a y 1.15b se observan dos cámaras circulares conectadas por un canal que están controladas por cuatro válvulas. Una de estas válvulas es circular y está situada justo encima de una de las dos cámaras, pero con un diámetro menor. Cuando esta válvula es presurizada, empuja la membrana que está debajo de ella hasta que está en contacto con la superficie del portaobjetos, pero debido a que el diámetro de la válvula es menor al de la cámara, sólo una porción del techo de la cámara está en contacto con el vidrio, como se ve en las Figuras 1.15c y 1.15d. Si la presión en la válvula es suficiente, la membrana se mantendrá en esa posición aunque haya flujo en los canales de la capa de flujo. De esta manera lograron colocar zonas de detección de moléculas en el centro de las cámaras circulares. A estas válvulas se les llama *botones*, y observaron que dependiendo del diámetro del botón y la presión que le aplicaban, el diámetro de la zona que se bloqueaba en el portaobjetos cambiaba, la Figura 1.15e muestra una gráfica de la presión aplicada contra el diámetro de la zona del vidrio bloqueada.

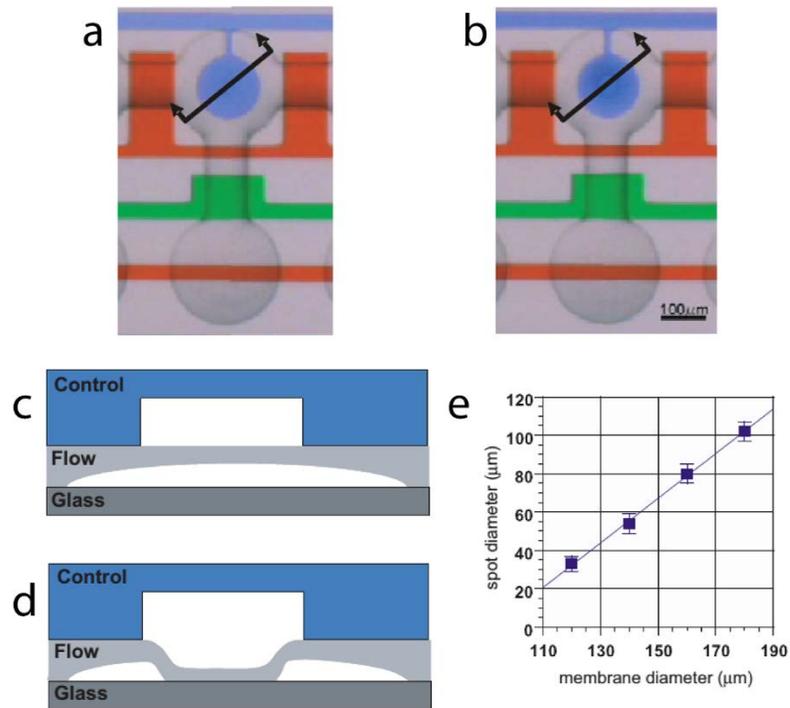


Fig. 1.15: *Funcionamiento de los botones en el dispositivo de S. Quake. En (a) y (b) se muestran dos cámaras controladas por 4 válvulas, donde la azul circular es el botón. El botón está alineado con la cámara que está debajo de él y su diámetro es menor. En (b) el botón está presurizado y justo en el centro se ve un aro que indica que la membrana está tocando el vidrio. En (c) y (d) se muestra un esquema del funcionamiento de los botones; en (c) el botón no está presurizado, en (d) está presurizado(a) y se ve que la membrana toca el vidrio y bloquea mecánicamente parte de él. (e) Gráfica del diámetro del botón contra el diámetro que bloquea en el vidrio (Figura tomada de la información suplementaria de [59]).*

Este mecanismo lo describen más a fondo en una publicación del grupo de S. Maerkl. Lo que hicieron fue utilizar el mismo mecanismo de los botones pero esta vez sin cámaras circulares en la capa de flujo, sino un canal microfluídico de 300 y uno de 400 μm. En la capa de control, los botones tienen diámetros de 100 a 300 μm y utilizaron presiones de 30 a 170 kPa (de ≈4 a 25 psi) para caracterizar la mínima presión para bloquear un área en el vidrio [60]. Aplicaron presión a los botones de distintos diámetros sobre los dos canales y midieron el área que se bloqueaba en el vidrio cada

20 kPa. Según los resultados de la caracterización reportaron que la presión mínima para bloquear el vidrio sigue una curva exponencial; a diámetros menores del botón, la presión mínima requerida es más alta. En las imágenes 1.16 (a) a (c) se muestra el dispositivo y la gráfica que obtuvieron. Para probar que el diámetro de la zona bloqueada es controlable, atraparon tres diferentes moléculas en estas zonas como se muestra en las imágenes 1.16 (d) y (e).

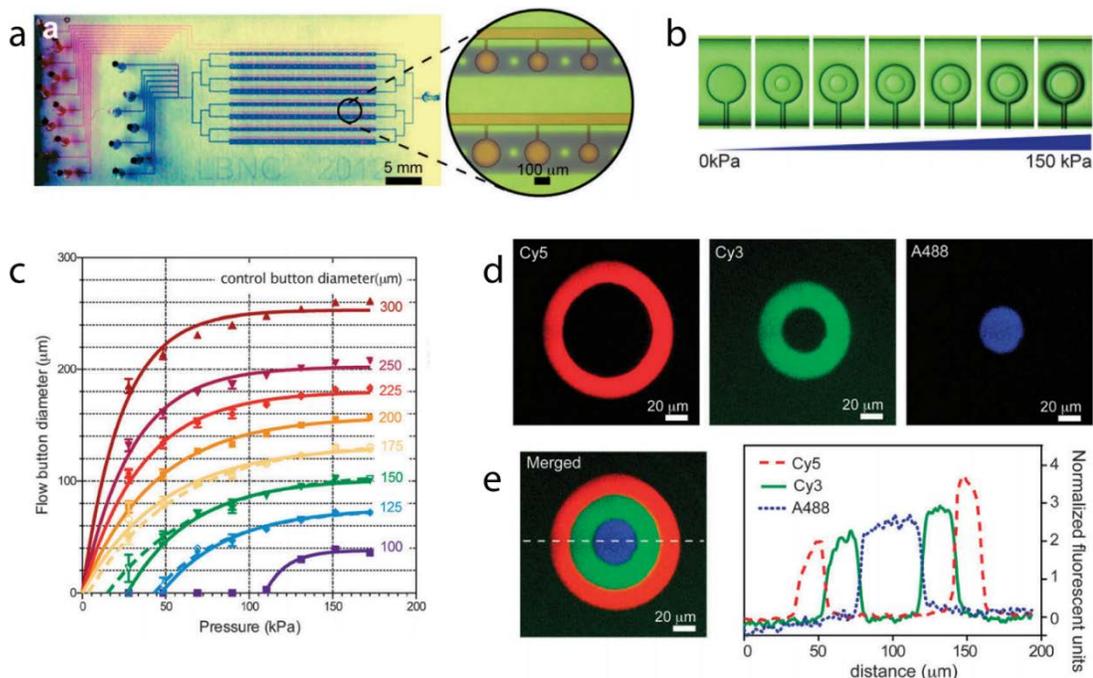


Fig. 1.16: Dispositivo microfluídico con botones para inmovilizar moléculas utilizando diferentes presiones. **(a)** Fotografía del dispositivo microfluídico. **(b)** Micrografía de los botones bajo diferentes presiones; el círculo en el centro es el área de la membrana que está en contacto con el vidrio. **(c)** Gráfica de la presión aplicada a los botones contra el diámetro del área que bloquean del vidrio. Cada línea de color indica un diámetro de botón distinto. **(d)** Micrografías de fluorescencia de las tres moléculas inmovilizadas en la superficie. **(e)** Micrografía de los tres canales juntos, mostrando que es posible controlar el área de contacto de la membrana con el vidrio a través de la modificación de la presión aplicada al botón. La grafica muestra el nivel de fluorescencia de los tres canales medido sobre la línea blanca punteada (Figura tomada de [60]).

Para atrapar las moléculas sobre el vidrio, primero hicieron el dispositivo de PDMS y lo adhirieron a un portaobjetos previamente funcionalizado. Presurizaron los botones a 170 kPa para bloquear las zonas en las que quieren adherir las moléculas e inyectaron una solución de albumina de suero bovino (BSA) al 1% y caseína al 1% en tampón de fosfatos (PBS) pH 7.4; lavaron con PBS y después despresurizaron el botón para fluir BSA biotinilado y se adhiriera a las zonas que cubrían los botones. Posteriormente presurizaron de nuevo pero esta vez a 62 kPa para que el botón bloqueara solo una zona de menor diámetro y fluyeron Fluor-650 conjugado con neutravidina (650-NA); la neutravidina tiene una alta afinidad a la biotina, por eso los tres fluorocromos que utilizan están conjugados con ella [61], [62]. Después, lavaron de nuevo con PBS, bajan la presión ahora a 27 kPa y fluyen 550-NA. Por último, lavan una vez más, quitan por completo la presión de los botones, fluyen 488-NA y lavan de nuevo [60]. En la Figura 1.16d se muestran las micrografías de fluorescencia que obtuvieron después de este experimento.

1.5 Planteamiento del problema

En las secciones anteriores se ha mencionado el uso de la microfluídica como un método para realizar inmunoensayos [42]. Como se mencionó, los sistemas reportados hasta la fecha tienen buenos resultados en los análisis, comparados con los sistemas macroscópicos utilizados convencionalmente [52], [53]. Son capaces de detectar antígenos con una sensibilidad similar y aportan alguna ventaja a los sistemas convencionales, ya sea menor tiempo del ensayo, menor uso de reactivos y muestras o un método de detección más sencillo. Aunque estos sistemas cuantifican el antígeno detectado en las muestras, la cuantificación se da a través de realizar las mismas diluciones para generar una curva estándar que en el sistema macroscópico, e inyectarlas a su sistema para comparar los resultados contra los valores obtenidos de las diluciones.

Para evitar hacer manualmente las diluciones para generar la curva estándar, puede ser integrado un sistema CGG como los ya reportados [56], [58]. De esta manera sólo sería necesario tener dos soluciones con una concentración conocida del antígeno de interés y a partir de ellas se generarían las diluciones necesarias para el análisis. Los antígenos pueden después ser atrapados en sitios específicos utilizando válvulas para crear zonas de detección [59], [60] y con estas crear la curva estándar requerida para la cuantificación del antígeno.

En el presente trabajo se propone integrar el sistema de generación de un gradiente de concentración con un perfil exponencial y el sistema para capturar moléculas mecánicamente para crear una curva estándar para un inmunoensayo que posteriormente pueda ser incorporado a un sistema de inmunoensayos, y con esto tener un sistema más completo, automatizado y que aproveche las ventajas de la microfluídica.

2. OBJETIVOS

2.1 General

Crear un dispositivo microfluídico en el cual se genere una curva estándar exponencial para un inmunoensayo de manera automática, inyectando sólo una solución con baja y una con alta concentración de una proteína de interés.

2.2 Específicos

1. Diseñar y fabricar un dispositivo microfluídico que genere un perfil de concentración exponencial con el fin de aprender la técnica de fabricación por litografía suave y caracterizar el flujo en el mismo.
2. Modificar el diseño anterior para que sea posible generar un gradiente de concentración con perfil exponencial con soluciones que contengan moléculas del tamaño de proteínas y agregar una capa de control para atrapar moléculas en los canales y utilizar la interacción antígeno-anticuerpo para generar una curva estándar.
3. Evaluar el funcionamiento del dispositivo a través de análisis de imágenes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño de los dispositivos

Los diseños de los dispositivos microfluídicos se hicieron en AutoCAD (versión 2014, Autodesk Inc.), se exportaron con extensión .DXF y se convirtieron a .GDS utilizando KLayout (versión 0.23.9) para que fueran compatibles con el software del *micro pattern generator*, equipo con el cual se graban las estructuras sobre la fotorresina.

Antes de hacer los diseños, se hicieron los cálculos necesarios para predecir el comportamiento del dispositivo microfluídico y tener una idea de lo que se debe esperar experimentalmente.

3.1.1 Cálculos teóricos de los dispositivos

3.1.1.1 Primer dispositivo CGG con perfil exponencial

El primer diseño que se realizó fue pensando en replicar el dispositivo microfluídico CGG con perfil exponencial reportado en [58]. El dispositivo está diseñado para que al inyectar dos soluciones con diferente concentración de isotiocianato de fluoresceína (FITC), se mezclen entre sí de manera controlada y se creen 17 soluciones con diferentes concentraciones que generen un gradiente de concentración con un perfil exponencial en el canal de salida. Como se mencionó en la sección 1.4.1, el dispositivo consiste en dos canales de entrada donde se inyectan las soluciones, que llegan a un canal ancho común para después dividirse en tres nuevos canales largos (serpientes), en los canales de los extremos se mantiene la concentración de las dos

soluciones inyectadas y en el central se mezcla una porción de ambas soluciones. Esto se repite tres veces más, generando un canal de 4 etapas con 4 canales anchos y un canal de salida en el cual se juntan los 17 últimos serpentines. En la Figura 3.1 se muestra el esquema que se utiliza para las etapas y canales del dispositivo.

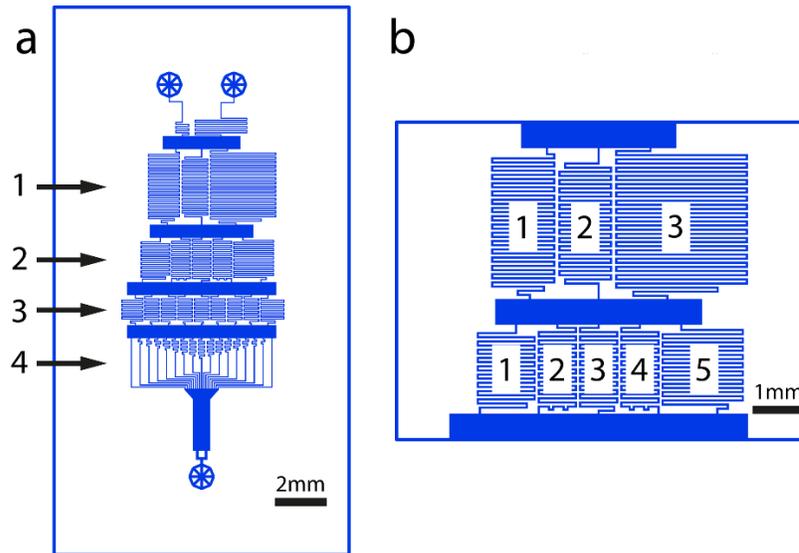


Fig. 3.1: Diagrama del dispositivo por etapas y canales. **(a)** Los números y las flechas indican la ubicación de cada etapa. **(b)** Los números indican el orden en el que se consideran los serpentines en las distintas etapas.

Para diseñarlo se propone mantener el conjunto de concentraciones ya reportado,

$$c_{4,n} = [1, \sqrt{2}, 2, 2\sqrt{2}, 4, \dots, 128, 128\sqrt{2}, 256]$$

Si se revisan las concentraciones de los canales desde el último hasta el primero ([256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1]) se observa que la concentración disminuye a la mitad en cada serpentín; este conjunto de “diluciones” es el que se utiliza en algunos inmunoensayos para generar la curva estándar, en donde se tiene una comparación para calcular la concentración del antígeno de dos órdenes de magnitud a partir de la concentración más alta que se utilice.

Antes de calcular los parámetros de todo el dispositivo se propone utilizar una longitud de 32 mm para el segundo serpentín ($n = 2$) de la primera etapa ($k = 1$) del

dispositivo ($\langle k, n \rangle = \langle 1, 2 \rangle$). Para calcular el flujo volumétrico es necesario proponer el área transversal de los serpentines, por lo que se decidió utilizar un ancho w de $40 \mu\text{m}$ y una altura h de $50 \mu\text{m}$. Se eligieron estas dimensiones para que la difusión en los serpentines fuera rápida y el flujo volumétrico se mantuviera en el orden de $\mu\text{L min}^{-1}$, ya que el método para inyectar las soluciones. Al conocer el coeficiente de difusión D de FITC ($D = 500 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) se puede calcular el tiempo que le tomará a las soluciones mezclarse una vez que estén dentro de los serpentines,

$$t_D = \frac{w^2}{D} = \frac{(40 \mu\text{m})^2}{500 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}} = 3.2 \text{ s}$$

Como se conoce la longitud l del canal $\langle 1, 2 \rangle$ y su sección transversal A ($A = wh$) se puede calcular la velocidad y el flujo que habrá en el mismo serpentín,

$$\bar{v}_{1,2} = \frac{L_{1,2}}{t_D} = 10 \text{ mm s}^{-1}$$

$$Q_{1,2} = \bar{v}_{1,2}A = (12.4 \text{ mm s}^{-1})(2 \times 10^{-3} \text{ mm}^2) = 0.02 \text{ mm}^3 \text{ s}^{-1}$$

Utilizando las relaciones que se muestran en la Figura 1.13c y 1.13d, se puede conocer la longitud y flujo volumétrico que habrá en todos los serpentines del dispositivo. Se creó un script en MATLAB (versión R2014a, Mathworks) para calcular las longitudes y flujo volumétrico de los serpentines. También se calcularon la resistencia hidráulica total y por serpentín, flujo volumétrico total, diferencia de presión total y por serpentín, número de Reynolds y número de Péclet de los canales utilizando las ecuaciones descritas en las secciones 1.1.1 y 1.1.2. El script de MATLAB se muestra en el Apéndice A.

Con el script se obtuvieron los valores que se muestran en la tabla 3.1 para este dispositivo microfluídico. El número de Reynolds se calculó para el dispositivo en general utilizando el flujo volumétrico promedio del dispositivo, así como para un serpentín de cada etapa. Para el número de Péclet se consideró el dispositivo completo y los canales anchos que hay en cada etapa, para asegurar que no haya difusión más allá de la que se desea.

El número de Reynolds indica si el régimen de flujo es laminar o turbulento; aunque el total es un valor cercano a 1, el valor en cada serpentín indica que el régimen en efecto es laminar en los lugares donde se está llevando a cabo la mezcla de las soluciones. Por otro lado, un número de Péclet tan alto significa que en el dispositivo los procesos se llevan a cabo mayoritariamente por difusión, el transporte lateral de moléculas por convección es despreciable. El número de Péclet es importante debido a que valores altos se puede considerar que en los canales anchos, donde el flujo de los serpentines se divide en dos o tres canales, no existe difusión de las moléculas más allá de éstos.

Tabla 3.1: *Valores obtenidos al hacer los cálculos de los parámetros para el dispositivo de una capa. Los valores no mostrados se consideran despreciables/no relevantes para el estudio.*

Canal	Resistencia hidráulica (psi s/um ³)	Flujo volumétrico (ul/min)	Diferencia de presión (psi)	Numero de Reynolds	Número de Péclet
Total	3.942x10 ⁻⁸	2.542	1.670	0.847	1.695x10 ³
Canal 1,2	5.242x10 ⁻⁸	1.200	1.048	0.400	----
Canal 2,3	2.621x10 ⁻⁸	0.600	0.262	0.200	----
Canal 3,5	1.310x10 ⁻⁸	0.300	0.065	0.100	----
Canal 4,9	6.552x10 ⁻⁹	0.150	0.016	0.050	----
Ancho 1	2.345x10 ⁻¹²	---	---	---	1.400x10 ³
Ancho 2	1.754x10 ⁻¹²	---	---	---	2.000x10 ³
Ancho 3	1.211x10 ⁻¹²	---	---	---	0.556x10 ³
Ancho 4	1.211x10 ⁻¹²	---	---	---	0.147x10 ³
Entrada izq.	8.190x10 ⁻⁹	2.04	0.278	---	----
Entrada der.	3.309x10 ⁻⁸	0.504	0.278	---	----

En la tabla 3.1 se observa que la resistencia hidráulica de los canales anchos es entre tres y cuatro órdenes de magnitud más baja que los serpentines, por lo que se

considera que su aportación en el flujo y la caída de presión es despreciable. El flujo volumétrico total es la suma del flujo volumétrico que se inyecta en ambas entradas, y la diferencia de presión es aquella que habrá entre las entradas y la salida del dispositivo microfluídico. Los dos valores antes mencionados están relacionados por la ley de Hagen-Poiseuille (ecuación 1.11), ambos disminuyen proporcionalmente.

3.1.1.2 Diseño de dos capas con una zona de detección

Para el segundo diseño se utilizaron dos capas, una capa de flujo y una de control, para poder agregar una zona para inmovilizar moléculas y en éstas realizar la detección para generar la curva estándar.

En los serpentines debe fluir el antígeno que se desea cuantificar en las muestras biológicas, por lo que se decidió utilizar EGFP (enhanced green fluorescent protein), una proteína fluorescente más grande que FITC, como antígeno y poder detectarlo a través de microscopía de fluorescencia. Esta decisión se basó en que las moléculas de FITC son muy pequeñas comparadas con los antígenos que normalmente se buscan en un inmunoensayo, y el coeficiente de difusión depende del tamaño de la molécula. Por ejemplo, FITC es una molécula con una masa molecular de 0.389 kDa [63] mientras que los tres antígenos que se mencionan en la sección 1.3, TNF- α 26, enterotoxina B estafilocócica y HE4 tienen una masa molecular de 26, 28 y 25 kDa, respectivamente [64]–[66]. EGFP tiene una masa molecular de 32.7 kDa y aunque sea más grande que las mencionadas anteriormente, un dispositivo microfluídico en el que el tiempo de residencia de las soluciones en los serpentines sea el suficiente para que las moléculas de EGFP difundan a lo ancho del mismo, garantiza que su funcionamiento sea adecuado para moléculas más pequeñas si se utilizan los flujos volumétricos adecuados. A diferencia de las demás proteínas, EGFP es una molécula fluorescente y el método de detección es distinto, pero si el dispositivo que se propone funciona como se espera con fluorescencia, cambiar el método de detección no afectaría la sensibilidad del sistema.

Por simplicidad, el método que se eligió para controlar el dispositivo microfluídico es a través de aplicar una presión constante en las entradas; la fuente de presión es un compresor de aire y la presión está controlada por un regulador de presión con un rango de 2-25 psi según el fabricante (aunque al medir experimentalmente el rango obtenido fue de 1-38 psi). Considerando el rango de presión que se puede regular y calculando con el script de MATLAB para obtener las dimensiones del dispositivo, se decidió utilizar una longitud en el canal <1,2> de 112 mm, y una altura y ancho de los serpentines de 30 μm . El coeficiente de difusión de EGFP es $D = 87 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ [67], por lo que el tiempo de difusión de esta molécula a lo largo de 30 μm es,

$$t_D = \frac{w^2}{D} = \frac{(30 \mu\text{m})^2}{87 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}} = 10.345 \text{ s}$$

Con estos parámetros, la diferencia de presión entre entradas y salida es de 8.873 psi. Los cálculos de este dispositivo se muestran en la tabla 3.2.

Tabla 3.2: Valores obtenidos para el dispositivo microfluídico fabricado con dos capas.

Canal	Resistencia hidráulica (psi s/ μm^3)	Flujo volumétrico (ul/min)	Diferencia de presión (psi)	Numero de Reynolds	Número de Péclet
Total	4.293×10^{-7}	1.240	8.873	0.689	7.920×10^3
Canal 1,2	6.504×10^{-7}	0.585	6.338	0.325	----
Canal 2,3	3.252×10^{-7}	0.292	1.584	0.162	----
Canal 3,5	1.626×10^{-7}	0.146	0.396	0.081	----
Canal 4,9	8.130×10^{-8}	0.073	0.099	0.041	----
Ancho 1	1.081×10^{-11}	---	---	---	8.711×10^3
Ancho 2	8.096×10^{-11}	---	---	---	1.244×10^4
Ancho 3	5.594×10^{-11}	---	---	---	3.457×10^3
Ancho 4	5.594×10^{-11}	---	---	---	0.915×10^3
Entrada izq.	2.758×10^{-8}	0.994	0.456	---	----
Entrada der.	1.114×10^{-8}	0.245	0.456	---	----

Aparte de que este dispositivo microfluídico tiene dos capas de polidimetilsiloxano (PDMS), se utilizó tanto resina negativa como positiva para la capa de flujo, para mantener canales cuadrados en todos los serpentines y canales del dispositivo y únicamente redondear los canales donde se requiera colocar una válvula.

Por último, es necesario mencionar que el dispositivo sigue funcionando en el régimen de flujo laminar y la difusión domina sobre la convección, como en el caso anterior.

3.1.2 Diseño y características de los dispositivos

Los dispositivos microfluídicos se diseñaron en base a los cálculos mencionados anteriormente. El diseño del dispositivo de una capa se muestra en la Figura 3.2.

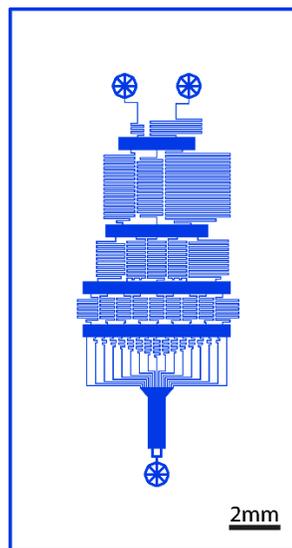


Figura 3.2: *Diseño del dispositivo microfluídico CGG similar al publicado por A. Groisman. Los canales de la izquierda son las entradas y el de la derecha es la salida. Los 17 canales de la última etapa convergen a un canal ancho.*

Para el diseño del dispositivo de dos capas, aparte de válvulas, se agregaron dos estructuras nuevas que nos ayudarán a utilizar el dispositivo para generar la curva estándar. La primera es un canal horizontal que atraviesa los 17 serpentines de la

última etapa del dispositivo; en cada intersección de este canal con un serpentín se colocó encima una válvula circular de 80 μm de diámetro que funcionarán como botón y debajo de éstos inmovilizar moléculas. El canal horizontal permitirá fluir soluciones para funcionalizar las zonas debajo de los botones y utilizarlas como puntos de detección, donde se inmovilizarán anticuerpos y después se capturarán antígenos que fluyan por los serpentines. Aparte de los botones, se colocaron dos válvulas alrededor del canal horizontal y los serpentines que permiten controlar el flujo en esta zona; una válvula ocluye el flujo de los serpentines hacia el canal de salida y la otra ocluye el canal horizontal para que los serpentines funcionen normalmente. En la Figura 3.3, los canales azules representan los canales de flujo que tendrán sección transversal cuadrada y los verdes los que serán redondeados.

La segunda estructura que se agregó es un arreglo de válvulas que se conoce como multiplexor [30], [68]. El canal horizontal que atraviesa los serpentines es alimentado por nueve canales distintos; en cada uno de ellos se inyectara una solución distinta para hacer la funcionalización de la superficie. Para evitar el uso de nueve válvulas, una para cada canal, puede hacerse un arreglo de seis válvulas (como se muestra en la Figura 3.3d) que permita controlar el flujo en los nueve canales. Para explicar el mecanismo enumeraremos los canales del uno al nueve (C1 – C9) y las válvulas del uno al seis (V1 – V6). Como se observa en la Figura 3.2 (d), V1, V2 y V3 ocluyen tres canales cada una de manera alternada, V1 ocluye C3, C6 y C9, V2 ocluye C2, C5 y C8, y V3 ocluye C1, C4 y C7; además, V4, V5 y V6 ocluyen canales consecutivos, V4 los canales C1 a C3, V5 C4 a C6, y V6 C7 a C9. Con este arreglo, cuando se requiere permitir el flujo a través de un canal es necesario despresurizar dos válvulas. Por ejemplo, si en un estado inicial todas las válvulas están presurizadas y se quiere que haya flujo a través de C4, es necesario desactivar (o despresurizar) V3 y V5. Aunque V3 controla también a C1 y C7, estos canales siguen ocluidos ya que V4 y V6 siguen activas.

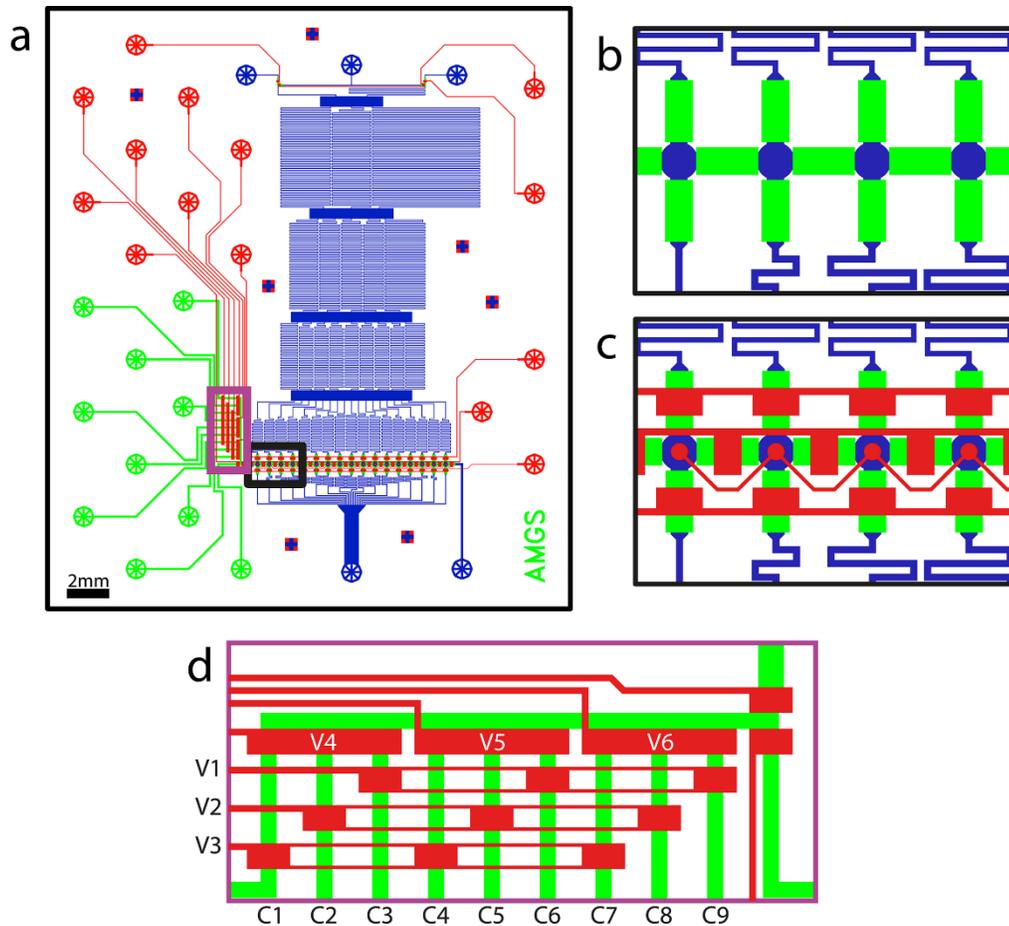


Fig. 3.3: *Diseño del dispositivo microfluídico CGG de dos capas, en el que la capa de flujo se hizo con fotorresina negativa y positiva. (a) Diseño completo del dispositivo que muestra los canales de flujo hechos con fotorresina negativa en azul, con positiva en verde y en rojo los de la capa de control. El recuadro negro es la zona ampliada mostrada en (b) y (c) y el morado la zona en (d). (b) Sección de las intersecciones en las que se muestra que la fotorresina positiva complementa los canales hechos con la fotorresina negativa. (c) Misma zona que se muestra en (b) pero con los canales y válvulas (recuadros rojos) de la capa de control encima de las estructuras como quedarán una vez que se fabriquen los dispositivos en PDMS. (d) Esquema del multiplexor incorporado para controlar el flujo de los nueve canales que pueden alimentar al canal horizontal. El arreglo de las válvulas (V) permite que sólo seis de ellas controlen nueve canales de flujo (C). El canal del extremo derecho es un canal de desechos.*

3.2 Fabricación de los dispositivos

Para la fabricación de los dispositivos microfluídicos se utilizaron técnicas de litografía suave de una sola capa y multicapa. Para los dispositivos multicapa, la única diferencia reside al fabricar los dispositivos de polidimetilsiloxano (PDMS), el molde maestro se hace de la misma manera. Todo el proceso de fabricación se hizo dentro de un cuarto limpio para evitar que polvo u otras partículas caigan sobre las estructuras durante el proceso.

3.2.1 Fabricación de moldes

Se crearon los moldes en obleas de silicio de 10 cm de diámetro (Desert Silicon Inc., Tempe, AZ, USA). Primero se trataron las obleas con plasma de oxígeno por 10 min en un *Plasma cleaner* (Zepto, Diener Electronic GmbH & Co. KG, Ebhausen, Germany) para remover moléculas de agua depositadas en la superficie. Al terminar se colocó en un spin coater (SCS 6800 Spin Coater Series, Specialty Coating Systems, Inc., Indianapolis, Indiana, USA). Para los moldes en los que se requiere una sección transversal cuadrada se utilizó fotorresina negativa (GM 1060, Gersteltec Sarl, Pully, Lausanne, Switzerland) y para los que se necesita redondear canales se utilizó resina positiva (AZ 9260, Microchemicals GmbH, Ulm, Baden-Wurtemberg, Germany). Cada fabricante sugiere un protocolo distinto para depositar capas de una altura deseada sobre la oblea de silicio utilizando el spin coater, por lo que primero se mencionaran los protocolos de manera general.

Para la fabricación de los moldes el primer paso es colocar una capa de fotorresina sobre la oblea de silicio. En el caso de los moldes de fotorresina negativa se utilizó una altura aproximadamente de 30 μm . El protocolo es el siguiente:

1. Se coloca una oblea de silicio sobre el spin coater y se vierten aproximadamente 4 mL de fotorresina negativa sobre la oblea de silicio.

2. En el spin coater, se hace girar la oblea a 800 revoluciones por minuto (rpm) durante 40 s con una rampa de 8 s (tiempo que tarda en llegar de las rpm iniciales a las finales); después, se lleva a 0 rpm con una rampa de 8 s.
3. Se retira del spin coater y se deja reposar una hora en una caja de Petri.
4. Se coloca la oblea sobre una plancha (PC-420D, Corning Inc., NY, USA) a 35 °C y se lleva hasta 95 °C aumentando 5 °C cada dos minutos. Al llegar a 65 °C se mantiene por 10 min y en 95 °C por 30 min. A este paso se le llama *precocido*.

Para la fotorresina positiva se utilizó también una capa de aproximadamente 30 µm. La viscosidad de esta fotorresina es baja comparada con la negativa y solo nos permite crear capas de hasta aproximadamente 12 µm, pero podemos lograr 24 µm si ponemos una capa sobre otra. Otra diferencia con esta fotorresina es que es hidrofóbica y al verterla sobre la oblea, después de tratarla con plasma de oxígeno, tiende a juntarse en el centro; para evitar lo anterior se utiliza un promotor de adhesión (Adhesion promoter, Gersteltec Sarl, Pully, Lausanne, Switzerland) que vuelve la superficie de la oblea hidrofóbica. El protocolo para esta fotorresina es el siguiente:

1. Se coloca la oblea de silicio sobre el spin coater y se vierten encima aproximadamente 2 mL de promotor de adhesión.
2. Se gira la oblea a 3000 rpm durante 20 s con una rampa de 3 s.
3. Se retira del spin coater y se coloca sobre la plancha a 120 °C por 5 min.
4. Se lleva al spin coater de nuevo y se vierten aproximadamente 4 mL de fotorresina positiva sobre la oblea.
5. Se gira la oblea a 500 rpm durante 5 s con una rampa de 5 s, seguido de 1500 rpm por 40 s con una rampa de 1.5 y por último, a 0 rpm con una rampa de 15 s.
6. Para el precocido se coloca de nuevo la oblea de silicio sobre la plancha a 95 °C por 1 min y después se aumenta la temperatura a 115 °C por 3 min.
7. Para colocar la segunda capa se repiten los pasos 4-6 con la única diferencia de mantener en la plancha por 6 min a 115 °C.

8. Por último, se deja en una caja de Petri por lo menos 1 hora para que la fotorresina se rehidrate.

Aunque los moldes de flujo y control se hicieron principalmente con la altura mencionada, en la tabla 3.3 se reportan diferentes rutinas del spin coater para depositar capas de distintas alturas, obtenidas experimentalmente. Además, el primer dispositivo fabricado se hizo con otro tipo de fotorresina negativa, se utilizó SU-8 (SU-8 2050, Microchemicals GmbH, Ulm, Baden-Wurtemberg, Germany) que está fabricada para depositar capas más altas, y el protocolo que se siguió es similar al descrito anteriormente para la fotorresina negativa GM 1060, pero cambiando los parámetros de exposición (se muestran en la tabla 3.3).

Tabla 3.3: Rutinas del spin coater para distintas alturas de capas de fotorresina. La columna “Tiempo” hace referencia al tiempo que dura la oblea girando a las rpm seleccionadas; “Rampa final” es el tiempo que tarda en llegar a 0 rpm después de completar el tiempo seleccionado.

Fotorresina	Altura (μm)	Rpm	Rampa (s)	Tiempo (s)	Rampa final (s)	Capas
Negativa (GM 1060)	10	1500	15	40	15	1
	20	1000	10	40	10	1
	30	800	8	40	8	1
Negativa (SU-8 2050)	50	2500	8.3	40	12.5	1
Positiva (AZ 9260)	10	1500	15	40	15	1
	20	1500	15	40	15	2
	30	1000	10	40	15	2

El siguiente paso es la exposición a luz UV. Para esto se utilizó un *micro pattern generator* (μPG 101, Heidelberg Instruments Inc., CA, USA) que emplea un láser de 70 mW con una longitud de onda de 377 nm (radiación UVA), con una resolución de 0.9 μm. El μPG está conectado a una computadora con su propio software, en éste se

carga el diseño del dispositivo con extensión .GDS (un tipo de archivo utilizado para diseño de circuitos integrados), se eligen los parámetros para cada tipo de fotorresina (tabla 3.4) y se inicia la exposición. El μ PG permite elegir el porcentaje de energía a utilizar de 5 a 100% del total, la velocidad y las veces que el láser traza sobre el mismo lugar. Todas las opciones modifican la dosis de radiación que se le da a la fotorresina, así como el tiempo total de la exposición. En la tabla 3.4 el número de repeticiones se refiere a las veces que se repite el proceso de exposición utilizando los mismos parámetros.

Tabla 3.4: *Parámetros de exposición del μ PG 101 utilizados según la fotorresina y la altura deseada.*

Fotorresina	Altura (μ m)	Energía (%)	Factor de velocidad	Repeticiones
Negativa (GM 1060)	30	100	1	1
Negativa (SU-8 2050)	50	100	1	1
Positiva	20	65	1	3

Posterior a la exposición, la fotorresina negativa es sometida al *postcoccido*, que consiste en colocar la oblea sobre la plancha a 35 °C y llevarla hasta 95 °C aumentando 5 °C cada dos minutos, manteniéndola por 10 min al llegar a 65 °C y 30 min en 95 °C.

El siguiente paso es revelar los moldes. Para la fotorresina negativa se utiliza PGMEA (Propylene glycol monomethyl ether acetate, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) como agente revelador. Se sumerge la oblea en PGMEA por 5 a 10 min hasta que la fotorresina no expuesta se disuelva y las estructuras polimerizadas se distinguen claramente. Se enjuaga con alcohol isopropílico (IPA) (Isopropyl alcohol, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) para detener la reacción y se inspecciona con un estereomicroscopio (Stemi DV4, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Turingia, Germany) para asegurarse de que no queden restos de fotorresina no expuesta. Para la fotorresina positiva se utiliza el revelador AZ[®] 400K (Clariant Corporation AZ

Electronic Materials, Somerville, NJ, USA) disuelto en agua destilada en relación 1:4. Se sumerge la oblea aproximadamente 10 min observando de igual manera que las estructuras sean fácilmente reconocibles y la fotorresina expuesta se disuelva en el revelador. Se retira la oblea del revelador, se enjuaga con agua destilada y se inspecciona con el estereomicroscopio para comprobar que se haya revelado adecuadamente.

Para redondear los canales del molde de fotorresina positiva, a lo que se le llama *reflujo*, la oblea se mete al horno (UF55, Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Germany) a 135 °C por dos horas. La temperatura de transición de fase de la fotorresina positiva es aproximadamente 115 °C, por lo que en el reflujo se fluidiza y esto provoca que las esquinas superiores de los canales se redondeen [69].

Para terminar, los moldes se ponen en el horno para realizar el cocido final o *hard bake*, el cual es un proceso que los fabricantes de las fotorresinas recomiendan para aumentar la resistencia mecánica y química de las estructuras. En el caso de la fotorresina negativa se tienen otras dos ventajas, si en el proceso de revelado las estructuras tienen fracturas de hasta 5 μm , éstas pueden cerrarse, y si se nota que algunas estructuras se despegaron de la oblea de silicio ayuda a que vuelvan a adherirse [70], [71]. Para ambas fotorresinas el *hard bake* consiste en poner el molde en el horno a 135 °C por 2 hrs.

Ya que los moldes están terminados, el último paso antes de usarlos para hacer los dispositivos de PDMS es colocarlos dentro de un contenedor cerrado por 30 min en el que se aplican aproximadamente 300 μL de clorotrimetilsilano (Chlorotrimethylsilane, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), el cual al evaporarse se adhiere a la superficie del molde y de facilita el desprendimiento del PDMS. Una vez que se retiran los moldes del contenedor, se colocan en una caja de Petri. La Figura 3.4 muestra fotografías de un molde de flujo y uno de control.

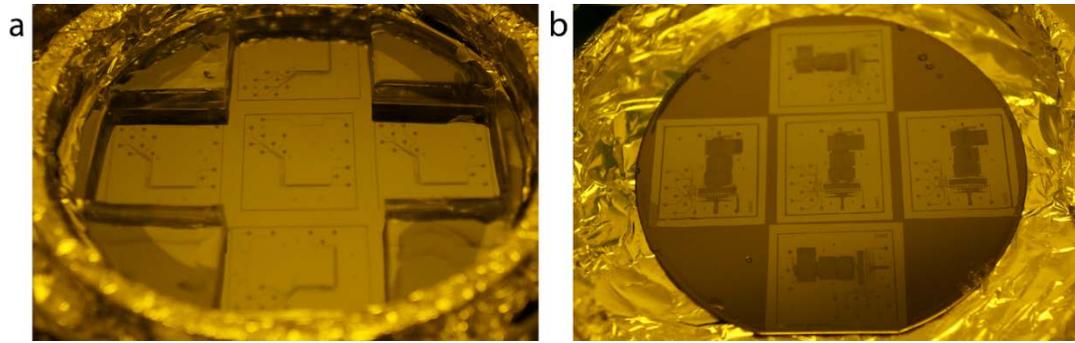


Fig. 3.4: *Fotografías de moldes fabricados por litografía suave; los moldes son la capa de control y flujo de un dispositivo microfluídico. (a) Molde de control fabricado con fotorresina negativa; lo que está alrededor de las estructuras es PDMS polimerizado. (b) Molde de flujo hecho con fotorresina negativa y positiva.*

Ya que se establecieron los protocolos para utilizar los tipos de fotorresina, para el dispositivo microfluídico de una capa y para la capa de control del dispositivo de dos capas, se fabricaron moldes con fotorresina negativa. Para el molde de flujo del dispositivo de dos capas, se siguió primero el protocolo para colocar las estructuras de fotorresina negativa y sobre la misma oblea se colocó fotorresina positiva y se siguió su protocolo para grabar las estructuras. El paso crítico de este proceso es alinear adecuadamente el molde cuando se van a exponer las estructuras de fotorresina positiva para que queden en contacto con las de fotorresina negativa. Sin embargo, con el uso del software con el que se controla el μ PG y la cámara incorporada en el mismo, se puede lograr esto con facilidad.

3.2.2 Fabricación de dispositivos de PDMS

Después de obtener los moldes se fabricaran los dispositivos microfluídicos en PDMS. Dependiendo de si el dispositivo es de una o dos capas, se utiliza un método distinto para fabricarlo.

3.2.2.1 Dispositivos microfluídicos de una capa

Este método es el más corto y sencillo. El PDMS se obtuvo como un kit que consiste en un pre-polímero y su agente curador (Sylgard® 184 silicone elastomer kit, Dow Corning Corporation, Midland, MI, USA); se mezclan ambas partes en relación 10:1 (diez partes de pre-polímero y una de agente curador) en peso y se vierten en la caja de Petri que contiene el molde con las estructuras de fotorresina negativa. En este caso, se mezclaron 50 g de pre-polímero y 5 g de agente curador en una mezcladora centrífuga planetaria (AR-100, Thinky USA Inc., Laguna Hills, CA, USA) para evitar la formación de burbujas al mezclar y se vertieron en una caja de Petri de 12 mm de diámetro, dando como resultado una capa de PDMS de aproximadamente 5 mm de alto.

La caja de Petri se coloca en una cámara de vacío por 10 min para asegurarse de que no queden burbujas de aire atrapadas entre las estructuras del molde y el PDMS, y después se mete en el horno a 80 °C por una hora para que el PDMS se polimerice. Posteriormente, se retira la caja de Petri del horno y con cuidado se despega el PDMS del molde, se cortan los dispositivos uno a uno con una navaja y se hacen perforaciones en las entradas y salidas con una prensa (MP10-UNV, SCHMIDT Technology Corporation, Cranberry Twp., PA, USA).

Ya que se tienen los dispositivos de PDMS, se colocan junto con un portaobjetos dentro del plasma cleaner por 1'30" para activar ambas superficies y promover la adhesión entre ellos. Transcurrido el tiempo, se sacan y se pone en contacto la superficie de PDMS que tiene los canales con el portaobjetos. No es necesario aplicar presión para que se adhieran las superficies, pero se debe tener cuidado en dejar que el PDMS caiga "por su peso" sobre el portaobjetos para evitar que queden burbujas de aire atrapadas entre ambas superficies.

3.2.2.2 Dispositivos microfluídicos de dos capas

Para los dispositivos microfluídicos de dos capas, se necesitan los moldes de flujo y de control y se coloca cada uno en una caja de Petri. Primero, se hace una mezcla de PDMS con relación 5:1 para la capa de control, se vierte en la caja de petri y se pone en la cámara de vacío. Mientras está ahí, se hace una mezcla de PDMS en relación 20:1 para la capa de flujo. El molde de flujo se coloca sobre el spin coater, se vierte encima el PDMS y se hace girar a 2000 rpm por 20 s para crear una capa de PDMS de aproximadamente 50 μm de altura. Se pone el molde de flujo de nuevo en la caja de Petri, se saca la caja de Petri con el molde de control de la cámara de vacío y ambas cajas se meten al horno a 80 °C por 30 min.

Al sacar los moldes del horno, el PDMS de ambos moldes está lo suficientemente duro para cortarlo pero no completamente polimerizado, lo que permite la creación de enlaces entre ambas capas consiguiendo así la adhesión de las mismas. Sólo se despega el PDMS del molde de control, se cortan uno por uno los dispositivos y se perforan las entradas de las válvulas. Ahora, se toma cada dispositivo cortado y se coloca sobre su parte respectiva en el molde de flujo, alineándolos con las marcas de alineación bajo el microscopio. Una vez alineados los dispositivos, se mete la caja de Petri con el molde de flujo, que ahora tiene ambas capas de PDMS, al horno a 80 °C por una hora y media para que termine de polimerizarse el PDMS y se adhieran ambas capas.

Después de sacar del horno el molde, con un bisturí o una navaja se marcan los contornos de los dispositivos y despegan con cuidado; se hacen las perforaciones y se adhieren a un portaobjetos con el mismo proceso que los dispositivos de una capa. La Figura 3.5 muestra un dispositivo microfluídico de dos capas adherido a un portaobjetos.

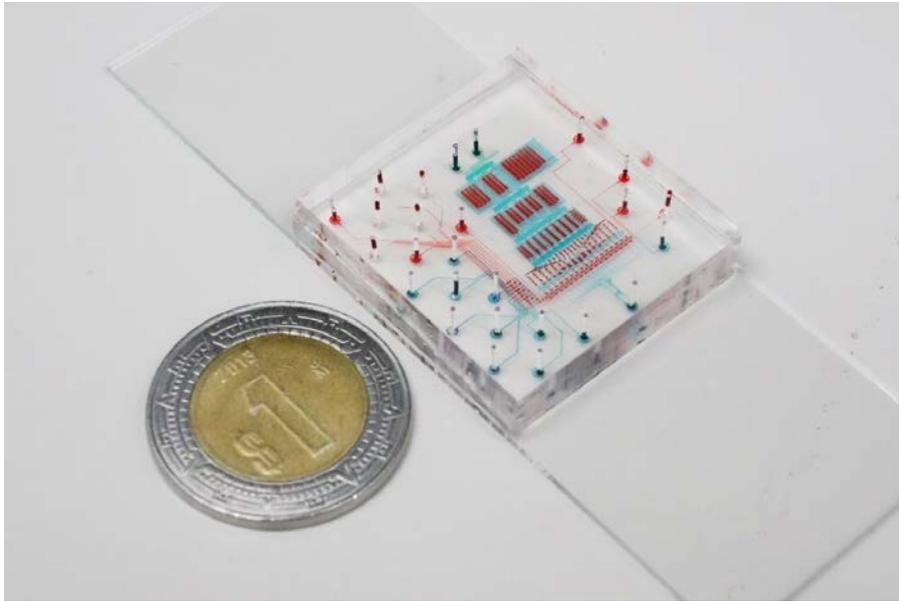


Figura 3.5: *Fotografía de un dispositivo microfluídico de dos capas unido a un portaobjetos. Se fluyó colorante azul en los canales de flujo y rojo en los de control. Al lado del dispositivo se muestra una moneda de \$1 MXN como escala.*

3.3 Control de los dispositivos

Para controlar el flujo en los canales de los dispositivos se utilizaron dos métodos distintos. El primero es controlando el flujo volumétrico que se inyecta a las entradas de los dispositivos con una bomba de jeringas (SP2001 Syringe Pump, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA), en las cuales el flujo más bajo está en el orden de $\mu\text{L hr}^{-1}$. El segundo es usando un compresor de aire (Sprayit SP94002, Thesus de México S.A. de C.V., México) para aplicar una presión constante en las entradas.

Las válvulas de la capa de control son controladas a través de válvulas solenoide (MH1 miniature valves, Festo, Tlalneplantla, Estado de México, México) externas controladas por computadora a través de una interfaz gráfica creada en LabVIEW (2015 Student Edition, National Instruments). Esta interfaz controla una tarjeta Arduino (Arduino Mega 2560, Arduino) enviándole una señal a través del puerto USB, que el Arduino convierte en una señal eléctrica que transmite a las válvulas solenoide para activarlas o desactivarlas. Como las válvulas solenoide se alimentan con 24 VDC y la tarjeta Arduino entrega solo 5 VDC, se fabricó una tarjeta de circuito impreso (PCB, por sus siglas en inglés) que recibe las señales de la tarjeta Arduino y ésta envía el voltaje y corriente que se necesita para activar las válvulas. En la Figura 3.6 se muestra el sistema para el control de las válvulas y la interfaz de LabVIEW, la caja que contiene a las válvulas se fabricó con una impresora 3D (Replicator 2, Makerbot).

Para alimentar las válvulas solenoide se conectan al compresor de aire y se ajusta la presión a través de un regulador de presión (Tipo 10 (2-25 psi), Bellofram Corporation, Newell, WV, USA) y un manómetro (0-100 psi, Metron, D.F. México). Cuando se necesita usar más de 8 válvulas para los dispositivos microfluídicos, se utilizan dos sistemas de válvulas solenoide como el de la Figura 3.6b. Para los dispositivos fabricados en este proyecto, la presión necesaria para ocluir las válvulas de la capa de control es de 25 – 30 psi.

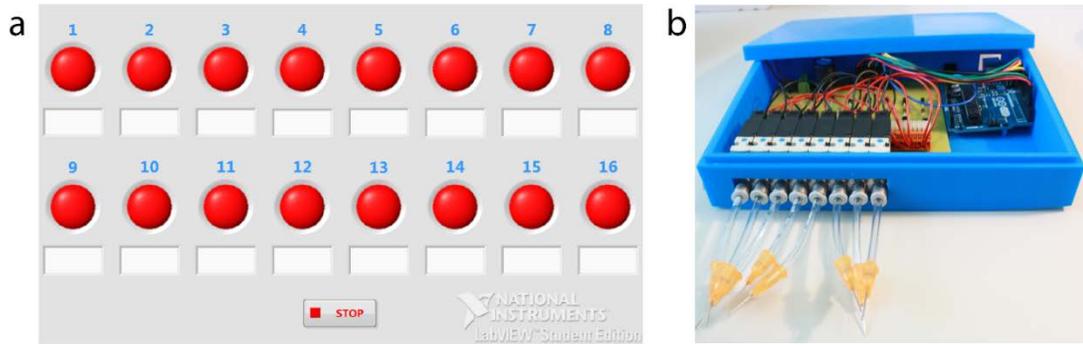


Fig. 3.6: Sistema de control de válvulas. **(a)** Interfaz de LabVIEW para controlar 16 válvulas solenoides. **(b)** Caja con las tarjetas y válvulas solenoides. La tarjeta azul es la tarjeta Arduino que se conecta por medio de un cable USB a la computadora y al PCB (tarjeta verde) por los cables de colores; el PCB se alimenta con una fuente de voltaje de 24 VDC y se conecta a las válvulas solenoides. De las válvulas solenoides salen mangueras para conectarse al dispositivo microfluídico. En el costado izquierdo de las válvulas solenoides (no se aprecia en la imagen) hay una entrada para conectar la manguera proveniente del compresor.

3.4 Métodos previos a la realización de los experimentos

Antes de describir los experimentos, se describen los protocolos a realizar previos al comienzo de éstos.

3.4.1 Funcionalización de portaobjetos

Para los experimentos en donde se atrapan moléculas en las zonas de detección, los dispositivos de PDMS se adhirieron a portaobjetos funcionalizados para que las proteínas se adhieran covalentemente a la superficie y evitar que se despeguen con el flujo aplicado. El protocolo es el siguiente [72]:

1. Tomar los portaobjetos y marcar una esquina de cada uno para saber cuál es el lado funcionalizado.
2. Introducir en el plasma cleaner y darles tratamiento de plasma de oxígeno por un minuto.
3. Sumergir los portaobjetos en una solución de 1:99 de 3-GPS (3-glycidoxypropyl-dimethoxymethylsilane, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) y tolueno (Toluene, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) por 20 min.
4. Enjuagar con tolueno fresco en otro contenedor para remover las moléculas de 3-GPS no adheridas a la superficie.
5. Secar cada portaobjetos con nitrógeno.
6. Colocar los portaobjetos en un contenedor seco y meterlo en el horno a 120 °C por 30 min.
7. Agregar tolueno al contenedor hasta cubrir los portaobjetos y colocarlo en un baño ultrasónico (Ultrasonic Cleaner AS2060B, Zhejiang, China) por 15 min.
8. Secar cada portaobjetos con una pistola de nitrógeno.
9. Colocar los portaobjetos en un contenedor seco, sellarlo y guardarlos en un ambiente libre de polvo.

Para adherir los dispositivos de PDMS a estos portaobjetos, únicamente se da tratamiento de plasma de oxígeno al PDMS, ya que los portaobjetos perderían la funcionalización.

3.4.2 Bloqueo de la superficie de los canales y expulsión de burbujas de aire

Debido al tratamiento de plasma o a la funcionalización de los portaobjetos, las proteínas que se utilizan en los experimentos pueden adherirse a la superficie de los canales microfluídicos. Antes de inyectar cualquier solución se bloquea la superficie de los canales de la capa de flujo, fluyendo una solución de albumina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 1% y caseína (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, Illinois, USA) 1% en PBS 1X (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Estas moléculas se adhieren a la superficie de los canales evitando que cualquier otra proteína pueda unirse [60].

Este paso se aprovecha también para sacar el aire que hay en los canales. Al inyectar las soluciones pueden quedar atrapadas burbujas de aire entre los canales debido a que el dispositivo consiste en una red de canales microfluídicos con diferente resistencia hidráulica; las soluciones tienen más de un camino para llegar a la salida y el flujo siempre sigue el camino por el cual es más sencillo fluir, resultando en burbujas de aire atrapadas en los canales con mayor resistencia.

Entonces, se inyecta la solución de BSA-caseína en el dispositivo y cuando la solución llega a la salida, ésta se cierra, lo que provocará que la presión dentro de los canales aumente con el paso del tiempo. El PDMS es un material permeable a moléculas pequeñas, por lo que el aire puede difundir a través de él. Esta propiedad del PDMS permite que al cerrar la salida del dispositivo, el aire salga a través de sus poros y al final todos los canales se llenen con la solución. Una vez que esto pasa se deja fluir la solución por 15 min y posteriormente se empieza el experimento. El único canal en el

que no se hace esto es en el canal de detección de los dispositivos de dos capas, más adelante se explica el proceso para bloquearlo.

3.4.3 Obtención y análisis de imágenes

Las imágenes de los experimentos se obtuvieron con un microscopio invertido Zeiss (Axio Observer A1, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Turingia, Germany) con una cámara monocromática de 14 bits (AxioCam 506 Mono, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Turingia, Germany), con la cual se tomaron imágenes en campo claro y con tres filtros distintos para las imágenes de fluorescencia: *38 HE* (489038-9901, Carl Zeiss) para obtener imágenes de las moléculas de EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein, BioVision Incorporated, Milpitas, CA, USA) y Neutravidina-488 (NA-488) (NeutrAvidin Protein, DyLight 488 conjugate, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, Illinois, USA), *50* (488050-9901, Carl Zeiss) para Neutravidina-650 (NA-650) (NeutrAvidin Protein, DyLight 650 conjugate, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, Illinois, USA) y *43* (1114-101, Carl Zeiss) para un anticuerpo anti-GFP marcado con ficoeritrina (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA). Todas las imágenes se tomaron con un objetivo de 10X.

Las imágenes obtenidas fueron analizadas con Fiji [73] y las gráficas creadas con Prism (versión 5.03, GraphPad Software Inc.).

3.5 Metodología de los experimentos

3.5.1 Generación del gradiente de concentración con FITC

El primer experimento consistió en utilizar el dispositivo microfluídico de una capa para generar el gradiente de concentración con perfil exponencial con una solución de tampón de fosfatos (PBS) y una de FITC.

El primer paso fue hacer una solución de FITC a una concentración 10 μM . Se disolvieron 39 μg de FITC (Fluorescein isothiocyanate isomer I, Sigma-Aldrich Co.) en 1 mL de DMSO (Dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich, Co.) para obtener una solución con una concentración 100 μM , y posteriormente se diluyeron en 9 mL de PBS 1X, para llegar a una concentración final de 10 μM . Se hicieron alícuotas de 1 mL y se almacenaron para uso posterior.

Para este experimento se utilizaron dos bombas de jeringas, debido a que es necesario inyectar un flujo volumétrico distinto en cada entrada. Se utilizaron dos jeringas de 1 mL, se llenaron con aproximadamente 300 μL de PBS 1X y solución de FITC y se conectaron con mangueras de 500 μm de diámetro (Tygon® AAD04103 Microbore Tubing, Saint-Gobain PPL Corp., Coahuila, México) a las entradas del dispositivo microfluídico. En la entrada de la izquierda (la entrada con menor longitud) se conectó la jeringa con la solución de PBS 1X y se programó una bomba para proporcionar un flujo volumétrico de 2 $\mu\text{L min}^{-1}$; en la entrada de la derecha se conectó la jeringa con la solución de FITC y la otra bomba se programó para proporcionar un flujo volumétrico de 0.5 $\mu\text{L min}^{-1}$. Se conectó una manguera de aproximadamente 5 cm a la salida del dispositivo para evitar que se forme una gota sobre el dispositivo e interfiera con la captura de imágenes.

Los flujos volumétricos utilizados son los que se necesitan para que el tiempo de residencia de las soluciones sea suficiente para garantizar una mezcla completa de las soluciones, según los cálculos de la sección 3.1.1.1. Una vez que se inyectan las

soluciones, se observa la formación del gradiente mientras las soluciones van recorriendo la red de canales; por esto, se esperaran aproximadamente 10 min para que el gradiente de concentración se forme y estabilice, y después se toman las imágenes del canal de salida con el microscopio invertido.

3.5.2 Experimentos en dispositivos microfluídicos de dos capas

Los experimentos con el dispositivo microfluídico de dos capas se realizaron inyectando las soluciones por las entradas a través de una diferencia de presión con un compresor, además, desde el mismo compresor se tomó una línea para alimentar las válvulas solenoides.

3.5.2.1 Generación del gradiente de concentración

El primer experimento que se realizó con este dispositivo fue generar el gradiente de concentración para comprobar que el perfil exponencial se mantuviera al fluir una solución de EGFP, y también con una de FITC para comprobar que funciona con moléculas más pequeñas. Para esto, se hicieron soluciones de EGFP a 600 nM en PBS 1X y se utilizaron las de 10 μ M de FITC que estaban almacenadas. Para cada experimento primero se bloquearon los canales con una solución de BSA-caseína y posteriormente se inyectó PBS 1X en la entrada de menor resistencia (izquierda) y la solución fluorescente en la de mayor resistencia (derecha).

Las soluciones se cargaron en mangueras de 500 μ m de diámetro y aproximadamente 40 cm de largo y se conectaron cada una a un regulador de presión utilizando los conectores adecuados. Se conectaron también mangueras a las válvulas y se activó la válvula que ocluye el paso de fluido al canal horizontal de detección, para que las soluciones sólo fluyan hacia la salida principal del dispositivo. Se montó el dispositivo en el microscopio invertido y se presurizaron las entradas. Para las soluciones de EGFP se utilizaron cinco presiones distintas en las entradas: 4, 7, 10, 13 y 16 psi; y para FITC 4, 10 y 16 psi, esperando que el gradiente sólo pueda formarse correctamente en las

primeras dos o tres presiones con EGFP y en todas ellas con FITC, según los cálculos teóricos. Con todas las presiones se esperaron 10 min después de iniciar el flujo para que se estabilizara el gradiente de concentración. Transcurrido este tiempo se tomaron las micrografías en campo claro y con el filtro de GFP.

3.5.2.2 Prueba de botones y zonas de detección

Los siguientes experimentos tienen como propósito probar que se puede hacer un inmunoensayo directo tipo sándwich en el dispositivo microfluídico, atrapando un antígeno a través de un anticuerpo adherido a una superficie y utilizar un segundo anticuerpo que emite una señal, en este caso fluorescencia, para cuantificar la concentración de antígeno.

Estos experimentos consistieron en funcionalizar el canal horizontal y atrapar moléculas en las zonas de detección. Inicialmente todas las soluciones, incluidas las moléculas que se atraparon, se inyectaron a través de los canales que son controlados por el multiplexor. El objetivo del experimento es probar que es posible atrapar moléculas y detectarlas a través del microscopio de fluorescencia. Los experimentos se realizaron en dispositivos microfluídicos de PMDS adheridos a portaobjetos funcionalizados.

El primer experimento consistió en atrapar moléculas de NA-488 como primera aproximación. Para esto se utilizaron las siguientes soluciones:

1. PBS 1X
2. BSA 1%, caseína 1% en PBS 1X
3. BSA biotinilado 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, Illinois, USA) en PBS 1X
4. Neutravidina-488 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS 1X

Estas cuatro soluciones se cargan en mangueras y se conectan en distintos canales del multiplexor. Se utilizó una presión de 1 psi para inyectarlas al dispositivo. El

procedimiento que se siguió en este experimento y en los posteriores con más soluciones es el siguiente:

1. Activar las válvulas que impiden el flujo en los serpentines para que el fluido siga a lo largo del canal horizontal hasta la salida.
2. Activar los botones para que ocluyan el área central de las intersecciones entre los serpentines y el canal horizontal, que serán nuestras zonas de detección.
3. Fluir la solución de BSA-caseína por 10 min para que estas moléculas se adhieran a todo el canal a excepción de las zonas de detección.
4. Lavar el canal fluyendo PBS 1X por 5 min.
5. Desactivar los botones para que liberen el área ocluida.
6. Fluir la solución de BSA-biotina por 10 min para que se adhiera a las zonas de detección que están libres de moléculas.
7. Lavar el canal fluyendo PBS 1X por 5 min.
8. Fluir la solución de NA-488 por 10 min para que se adhiera a las moléculas de biotina.
9. Lavar el canal fluyendo PBS 1X por 5 min.

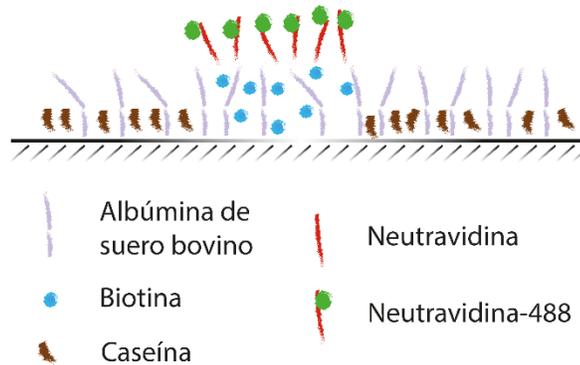


Fig. 3.7: Esquema de una de las zona de detección después de la funcionalización con Neutravidina y Neutravidina-488. La zona central con Neutravidina-488 representa la zona ocluida por los botones.

Después de seguir el protocolo anterior, las moléculas de NA-488 deberían estar unidas a la biotina sólo en las zonas de detección, y al tomar imágenes de

fluorescencia con el filtro de GFP debería observarse una intensidad uniforme en todas ellas.

Este experimento se realizó con dos capas de flujo distintas, una con botones de 80 μm de diámetro y otra con botones de 100 μm para observar las diferencias en el diámetro de las zonas de detección, así como presurizando los botones con 30 y 35 psi.

El siguiente experimento consistió en realizar el mismo proceso pero esta vez atrapando moléculas de EGFP en las zonas de detección. El protocolo que se siguió fue el mismo que en el experimento anterior con la diferencia de que se utilizó NA sin marcar y agregando pasos adicionales al protocolo. Las soluciones que se agregaron para este experimento son:

1. Neutravidina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS 1X
2. Anticuerpo anti-GFP biotinilado 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Clona 5F12.4, eBioscience, Inc., San Diego, CA, USA) en PBS 1X
3. EGFP 600 nM en PBS 1X
4. Anticuerpo anti-GFP conjugado con ficoeritrina 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS 1X

Se utilizaron los botones de 100 μm y una presión de 30 psi para activarlos, ya que se observó experimentalmente que daba mejores resultados (sección 4.3). Retomando el protocolo del experimento anterior, los pasos adicionales son:

1. Se siguen los pasos anteriores para obtener las zonas de detección funcionalizadas, pero esta vez con NA sin marcar.
2. Fluir la solución de anti-GFP biotinilado por 10 min para que se adhiera a la NA sin marcar.
3. Lavar el canal fluyendo PBS 1X por 5 min.
4. Fluir la solución de EGFP por 10 min.
5. Lavar el canal fluyendo PBS 1X por 5 min.
6. Fluir la solución de anti-GFP conjugado con ficoeritrina por 10 min.
7. Lavar el canal fluyendo PBS 1X por 5 min.

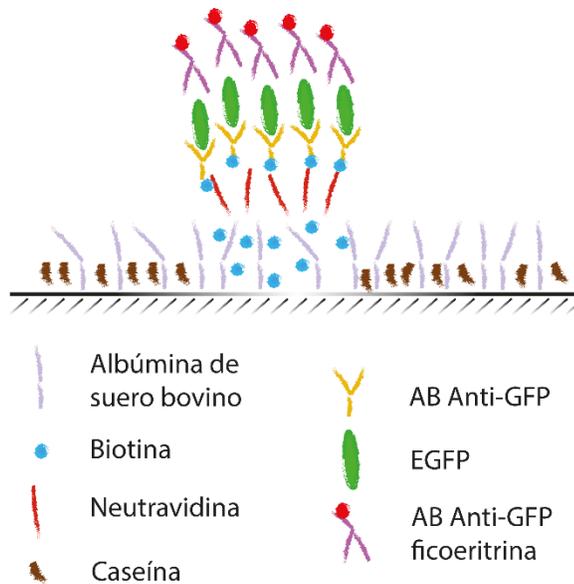


Fig. 3.7: Esquema de una de las zona de detección después de la funcionalización con el anticuerpo biotinilado y atrapar EGFP y anti-GFP conjugado con ficoeritrina. Al igual que en el caso anterior, la zona central con anticuerpo biotinilado representa la zona ocluida por los botones.

3.5.2.3 Prueba de generación de curva estándar

El último conjunto de experimentos consiste en unir los dos experimentos anteriores en uno solo, donde primero se atrapan anticuerpos en las zonas de detección, después el antígeno fluya por los serpentines generando 17 soluciones con concentraciones diferentes y estas soluciones lleguen a las zonas de detección para que los anticuerpos atrapen los antígenos proporcionalmente a la concentración que tiene cada serpentín. Para estos experimentos se utilizaron portaobjetos funcionalizados, los botones de 100 μm presurizados con 30 psi, y las siguientes soluciones cargadas en los canales del multiplexor:

1. PBS 1X
2. BSA 1%, caseína 1% en PBS 1X
3. BSA biotinilado 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS 1X
4. Neutravidina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS 1X
5. Anticuerpo anti-GFP biotinilado 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS 1X

6. Anticuerpo anti-GFP conjugado con ficoeritrina 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS 1X

Las soluciones anteriores se inyectaron a 1 psi. Por otra parte, en los dos canales de entrada se inyectaron PBS 1X en el canal de menor resistencia y una solución de EGFP 600 nM en el de mayor resistencia a 10 psi. El protocolo que se siguió es una conjunción de los anteriores, por lo que lo podemos resumir a lo siguiente:

1. Sin aplicar presión en las entradas para generar el gradiente, se fluyeron soluciones por el canal de detección hasta adherir anticuerpo anti-GFP biotinilado en las zonas de detección.
2. Presurizar los botones para proteger las zonas de detección.
3. Desactivar las válvulas que ocluyen los serpentines y activar las que ocluyen el canal horizontal.
4. Bloquear los serpentines y canales anchos del dispositivo fluyendo una solución de BSA-caseína por 10 min.
5. Presurizar las soluciones de PBS 1X y EGFP para que se forme el gradiente, esperar unos minutos a que se estabilice.
6. Tomar imágenes de todas las intersecciones para comprobar que el gradiente se ha formado adecuadamente.
7. Quitar la presión de los botones para que las moléculas de EGFP comiencen a adherirse a los anticuerpos; dejar fluir el gradiente por 10 min.
8. Quitar la presión de las soluciones que forman el gradiente, activar las válvulas que ocluyen los serpentines y desactivar las que ocluyen el canal horizontal.
9. Lavar el canal de detección con PBS 1X por 5 min.
10. Fluir la solución de anti-GFP ficoeritrina por 10 min.
11. Lavar de nuevo con PBS 1X por 5 min.

Al terminar de fluir las soluciones se toman imágenes de fluorescencia en las 17 zonas de detección con los filtros para GFP y ficoeritrina.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Generación del gradiente de concentración en dispositivo de una capa

En la Figura 4.1 se muestra una micrografía del dispositivo microfluídico fabricado en polidimetilsiloxano (PDMS) por fotolitografía suave comparado con su diseño en AutoCAD. Este dispositivo se utilizó para generar un gradiente de concentración con un perfil exponencial inyectando una solución de tampón de fosfatos (PBS) 1x en la entrada de la izquierda y una de isotiocianato de fluoresceína (FITC) en la derecha con un flujo volumétrico de 0.5 y 2 $\mu\text{L min}^{-1}$, respectivamente. Después de unos minutos se tomó una micrografía de fluorescencia en el primer canal ancho (Figura 4.1c) y se observó que la contribución por parte del canal de entrada con la solución de FITC (entrada de la derecha) es menor a la de la izquierda, esto debido al menor flujo volumétrico en el mismo, según se esperaba. En la misma Figura, justo al iniciar el serpentín se observa que la división entre las dos soluciones es bastante marcada, y va desapareciendo mientras las soluciones avanzan por el serpentín debido a que las moléculas difunden del lugar de mayor concentración al de menor. Lo anterior es un indicio de que el régimen de flujo en el dispositivo es laminar, coincidiendo con lo calculado teóricamente.

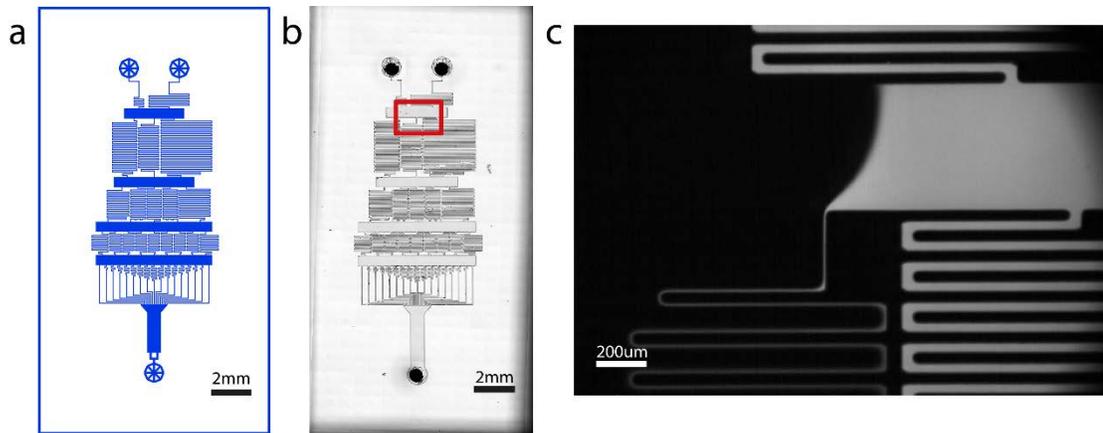


Fig. 4.1: *Dispositivo microfluídico CGG de una capa. (a) Diseño del dispositivo hecho en AutoCAD. (b) Micrografía del dispositivo de PDMS. (c) Micrografía de fluorescencia del primer canal ancho (recuadro rojo en b) al inyectar PBS y una solución de FITC en las entradas, donde se observa la contribución de los canales de entrada al serpentin central de la primera etapa y la difusión lateral de las moléculas de FITC en el mismo.*

Durante el mismo experimento se tomó una micrografía de fluorescencia en el canal de salida del dispositivo, donde se juntan los 17 serpentines de la última etapa, para medir la intensidad de fluorescencia y conocer el perfil del gradiente de concentración. En la Figura 4.2a se muestra la micrografía tomada y la línea punteada donde se realizó la medición que se grafica en 4.2b. La gráfica semilog muestra que el dispositivo funciona como se esperaba, el perfil del gradiente de concentración responde a una función exponencial y tiene un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9927, lo que nos dice que tiene un buen ajuste con el modelo.

Aunque el dispositivo no es muy distinto del reportado anteriormente, solo cambia el ancho y alto de los serpentines, este resultado nos lleva a pensar que al modificar las dimensiones de los serpentines, considerando que se utilice una molécula con un coeficiente de difusión menor, el nuevo dispositivo se ajuste al mismo perfil exponencial. Al observar la gráfica de la Figura 4.2 podría pensarse que a concentraciones bajas la desviación estándar es mayor, pero en realidad es un efecto

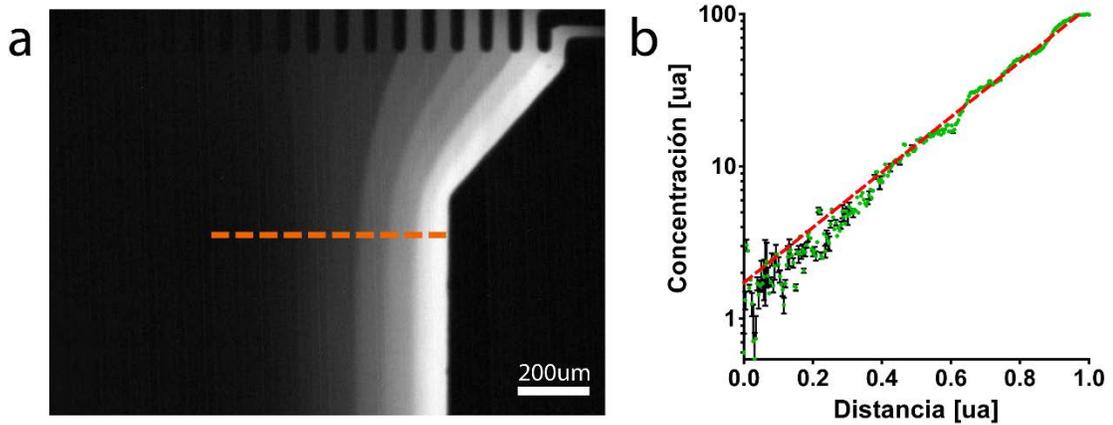


Fig. 4.2: *Gradiente de concentración a la salida del dispositivo de una capa. (a) Micrografía de fluorescencia del canal de salida del dispositivo. (b) Gráfica semilog obtenida de la medición de intensidad a lo largo de la línea punteada en (a). Los puntos en verde representan la concentración en cada pixel con su desviación estándar en negro, y la línea punteada roja es el ajuste a la curva ($r^2=0.9927$, $y=e^{5.452x}$).*

de observar la gráfica en semilog. Aun así, se muestra la gráfica de esta manera debido a que es más sencillo apreciar si los datos experimentales se ajustan a los teóricos por medio de una recta. Con esto en mente, según el coeficiente de determinación, los datos son muy alentadores y podemos pensar que un diseño de canales con distintas dimensiones calculado de la misma manera que éste, nos dará buenos resultados.

4.2 Generación del gradiente de concentración en el dispositivo microfluídico de dos capas

Después de obtener los resultados del dispositivo de una capa, se fabricó el dispositivo al cual se le agregó una capa de control y se modificó para funcionar con la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP, por sus siglas en inglés) y agregar zonas de detección en las cuales las moléculas sean atrapadas. El diseño del dispositivo, así como la micrografía del mismo en PDMS se muestran en la Figura 4.3a y 4.3b, respectivamente. En la Figura 4.3c se muestran cinco de las 17 zonas de detección del dispositivo, y se observa la diferencia entre los canales con área transversal cuadrada y redondeados (o semicirculares). Los canales redondeados son más oscuros debido a que dispersan la luz por su curvatura a lo ancho, mientras que los cuadrados solo la dispersan en la orilla, pareciendo más claros en la micrografía. También se observan los canales de la capa de control y las válvulas encima de los canales redondeados, así como los botones sobre las zonas de detección. La Figura 4.3d nos permite observar la sección transversal de un canal semicircular con una válvula encima, así como la membrana de PDMS que hay entre ambos, siendo ésta la que se deforma para ocluir el canal. La altura y ancho del canal redondeado, así como el grosor de la membrana en la parte más alta del canal semicircular son de 100.09, 28.94 y 22.09 μm , respectivamente, valores cercanos a los esperados (100, 30 y 20 μm) según el proceso de fabricación.

Ya que el dispositivo está diseñado para formar un gradiente de concentración con perfil exponencial con moléculas de EGFP, se generó el gradiente de concentración a diferentes presiones para comprobar que el dispositivo se comporte conforme a lo esperado teóricamente. Se formó el gradiente con soluciones de PBS 1X y EGFP en las entradas (izquierda y derecha, respectivamente) con cinco diferentes presiones, y con PBS 1X y FITC a tres presiones. La Figura 4.4a muestra los serpentines <4,1>, <4,9> y

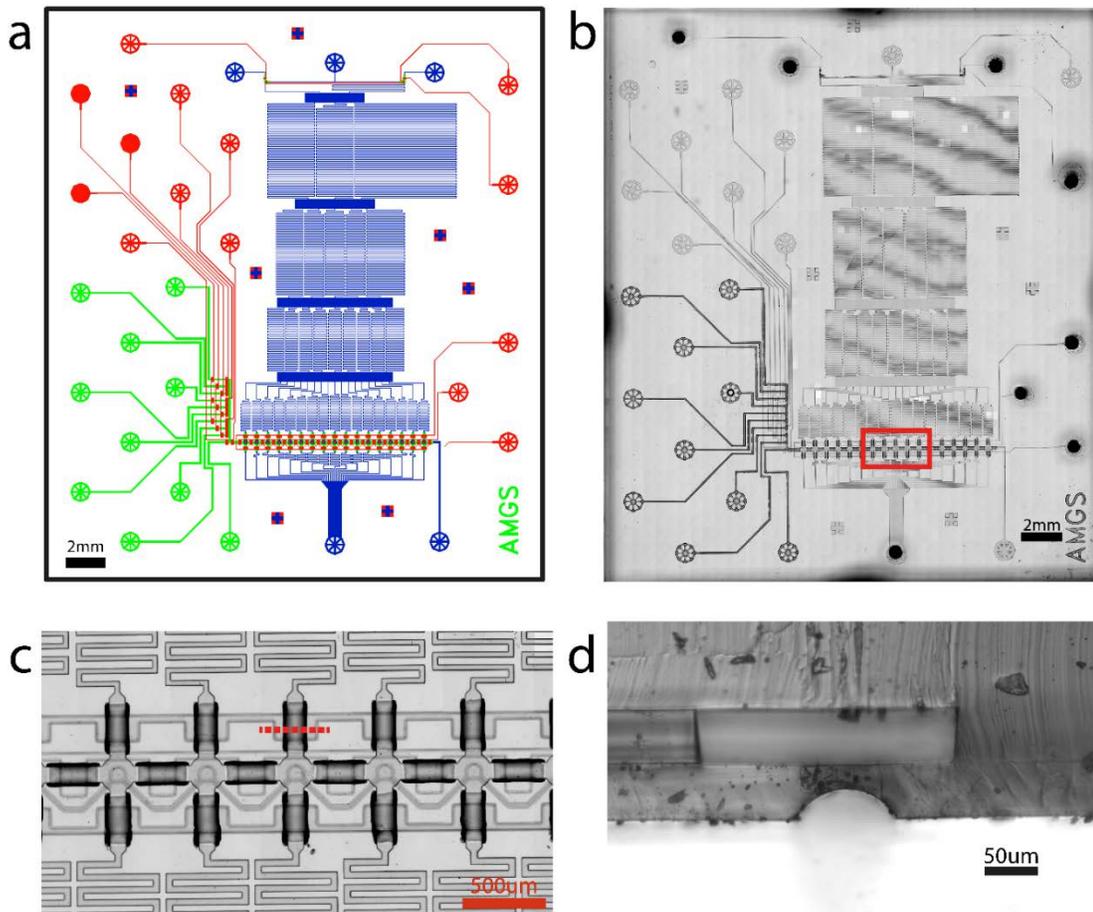


Fig. 4.3: *Dispositivo microfluídico CGG con zona de detección para capturar moléculas y crear una curva estándar. (a) Diseño del dispositivo en AutoCAD. (b) Micrografía del dispositivo de PDMS. (c) Porción del canal horizontal (recuadro rojo en (b)) donde se muestran cinco de las 17 zonas de detección del dispositivo. Los canales que forman los serpentines, así como el área bajo los botones, tienen canales con sección transversal cuadrada, mientras que los canales bajo las válvulas (canales más oscuros) son redondeados para poder ocluirlos. (d) Corte transversal del dispositivo de PDMS de dos capas sobre la línea punteada en (c); se muestra un canal de flujo redondeado (inferior) y una válvula encima de él. Al presurizar la válvula, ésta empuja la membrana debajo de ella ocluyendo el canal de flujo.*

<4,17> (primer, central y último serpentín de la cuarta etapa) y se observa la diferencia en intensidad que hay entre ellos. La Figura 4.4b muestra una gráfica semilog del gradiente de concentración formado con 4, 7, 10, 13 y 16 psi, mostrando

un buen ajuste del modelo a los datos obtenidos. Todas las curvas tienen un valor de r^2 por arriba de 0.99, y un error estándar de la regresión de 6.979, 6.917, 7.227, 6.906 y 5.826, respectivamente. Según los cálculos teóricos, el dispositivo debería de formar el perfil del gradiente de concentración correctamente al aplicar una presión de 8.87 psi; debajo de esta presión el gradiente puede formarse correctamente ya que el tiempo de residencia de las soluciones es mayor, permitiendo una difusión lateral completa en los serpentines, pero arriba de 8.87 psi el gradiente debería comenzar a ser diferente a lo esperado. Más adelante se retoma este punto.

Al inyectar PBS y FITC se utilizaron sólo tres presiones distintas (4, 10 y 16 psi) ya que se espera que con un coeficiente de difusión mayor, el perfil del gradiente de concentración se forme adecuadamente en este rango de presiones. Según cálculos realizados, el gradiente de concentración con FITC debería formarse hasta 50 psi. La Figura 4.4c muestra los resultados obtenidos del experimento. En este caso, r^2 sigue siendo un valor por arriba de 0.99 y el error estándar de la regresión es 6.979, 6.917 y 7.227. Al medir éste error obtenemos una desviación estándar de la regresión, con lo que se puede decir que es el error promedio en cada punto. Aún con esto, la mayor aportación a este error proviene de los canales con mayor intensidad.

Por otra parte, al incrementar la presión más allá de 16 psi el dispositivo de PDMS se despega del portaobjetos, por lo que no fue posible realizar mediciones para determinar hasta qué punto el perfil del gradiente de concentración deja de ser exponencial experimentalmente.

Retomando la gráfica de la Figura 4.4b y observando que el perfil exponencial se mantiene aún en presiones más altas que 8.87 psi, se tomaron micrografías de la última porción del serpentín <1,2> (el primer serpentín donde se mezclan las dos soluciones de las entradas) para observar si la mezcla se completaba dentro del serpentín. En la Figura 4.5 se muestran las micrografías de esta zona para 7 y 16 psi, así como una gráfica del valor de intensidad de fluorescencia medido a lo largo de la salida del serpentín. Los resultados en 4.5c indican que hasta 10 psi la mezcla es

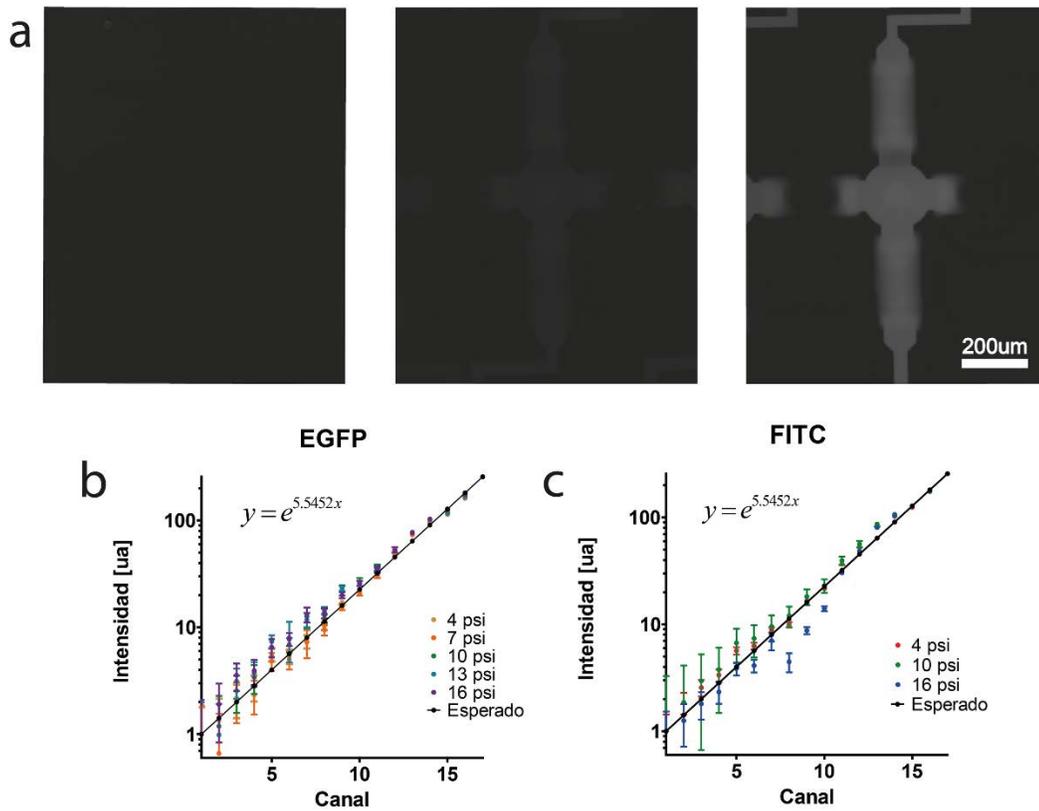


Fig. 4.4: Micrografías y gráficas de las zonas de detección al formar el gradiente de concentración inyectando PBS y EGFP, y PBS y FITC en las entradas. **(a)** Micrografías de fluorescencia para los serpentines <4,1>, <4,9> y <4,17>, de izquierda a derecha, al inyectar PBS y EGFP en las entradas a una presión de 7 psi; se observa que la intensidad de fluorescencia aumenta conforme avanza el número de serpentin. **(b)** Gráfica semilog que muestra el perfil del gradiente de concentración al medir la intensidad de fluorescencia y desviación estándar en las 17 zonas de detección para diferentes presiones al inyectar EGFP y PBS; se observa que el perfil es el esperado y similar en todo el rango de presiones, contrario a lo esperado según lo calculado teóricamente. **(c)** Gráfica semilog al inyectar PBS y FITC a tres presiones distintas; el perfil se mantiene similar aunque se aumente la presión en las entradas, resultado esperado para FITC al ser una molécula que difunde más rápido. Los valores de r^2 para cada recta en las gráficas, de menor a mayor presión son: para EGFP $r^2 = 0.9924, 0.9922, 0.9924, 0.9931, 0.9961$; para FITC $r^2 = 0.9951, 0.9934, 0.9927$ ($n = 2$ en todos los casos).

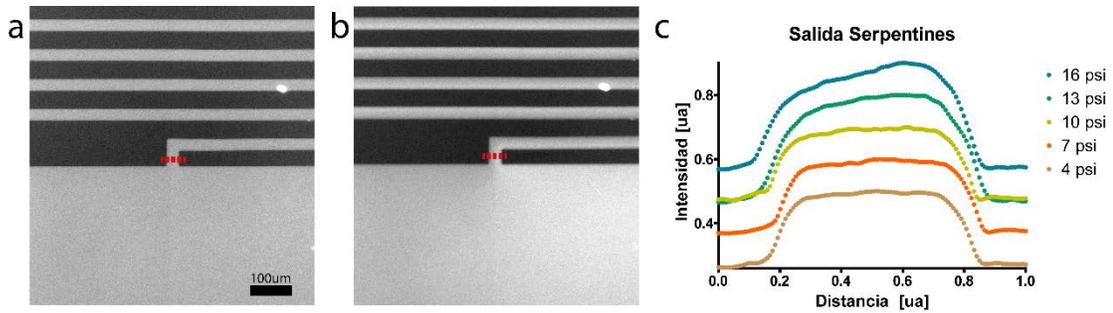


Fig. 4.5: *Micrografía de la última porción de un serpentin. Muestra la última porción del serpentin <1,2> cuando se inyecta EGFP y PBS a una presión de 7 y 16 psi, (a) y (b), respectivamente. Se midió la intensidad de fluorescencia a lo largo de la línea punteada para comprobar si las soluciones estaban mezcladas completamente, en (c) se muestran los resultados a cinco distintas presiones, y se observa que a presiones arriba de 10 psi la solución no es homogénea, ya que el tiempo de residencia de las soluciones en los serpentes es menor al necesario para lograr que las moléculas difundan completamente.*

homogénea al dejar el serpentin, caso contrario a 13 y 16 psi. A estas dos últimas presiones se observa en las gráficas que hay una pendiente positiva, indicando que las soluciones no se han mezclado por completo.

Con los resultados obtenidos de los experimentos realizados con EGFP se puede estar seguro de que el gradiente de concentración funciona adecuadamente y se conoce el rango en el cual se debe trabajar. Sabemos que a presiones mayores a 10 psi los resultados no son confiables, por lo tanto, para los experimentos consecuentes relacionados con la curva estándar se debe trabajar debajo de este límite de presión. El hecho de que el límite superior al cual se forme el gradiente sea 10 psi y no 8.87, puede ser debido a los cálculos teóricos. Según el autor en [8], al calcular el flujo volumétrico en canales rectangulares, se tiene un error de aproximadamente 13% cuando $w = h$ (que es nuestro caso), debido a que no se toman todos los términos en la serie de Fourier. Este error disminuye mientras mayor sea la diferencia entre w y h , pero debido a que la presión puede ser ajustada experimentalmente, no es necesario que se hagan modificaciones al diseño.

Los resultados obtenidos de los experimentos con FITC demuestran que en el dispositivo se puede formar un gradiente de concentración con moléculas que tengan un coeficiente de difusión mayor, que es equivalente a pensar que moléculas más pequeñas que EGFP pueden utilizarse en este sistema. También pueden utilizarse moléculas más grandes si se aplica una presión menor a 10 psi en las entradas, pero para cada caso deberían hacerse los cálculos correspondientes para conocer el rango de presión en el cual se debe trabajar.

4.3 Botones y zonas de detección

El siguiente experimento fue hacer una prueba de las zonas de detección inmobilizando moléculas y midiendo el área en la que esto sucede debajo de cada uno de los botones. Todas las soluciones se inyectaron a través de los canales controlados por el multiplexor. En estos experimentos se probaron botones de 80 y 100 μm (se fabricaron dos capas de control distintas), en el primer caso presurizándolos con 30 y 35 psi, y en el segundo con 30 psi. La molécula que se inmobilizó fue neutravidina 488 (NA-488) y se midieron tanto el diámetro de las zonas de detección como la intensidad de fluorescencia.

En la Figura 4.6a se observa una micrografía de la zona de detección con moléculas inmobilizadas en tres de los 17 serpentines de la última etapa. En las Figuras 4.6b y 4.6c pueden verse las gráficas para el diámetro y la intensidad de fluorescencia de las zonas de detección. Según las gráficas, el diámetro de las zonas de detección no es homogéneo, y aunque se utilizaron botones de dos diámetros distintos el área de detección no mejora considerablemente. En cuanto a la intensidad de fluorescencia, las zonas de detección de un mismo experimento muestran valores de intensidad muy distintos, aunque el aumentar el diámetro del botón ayudó un poco, la variación es aún grande. En la tabla 4.1 se enlistan las medias y desviaciones estándar de la intensidad de fluorescencia y diámetro de la zona de detección para las gráficas de la Figura 4.6. En ésta se pueden discernir las diferencias por experimento y la mejora que trajo aumentar el diámetro del botón, donde es notable que la desviación estándar en los botones de 100 μm es aproximadamente un 30% menor a las otras dos en ambos casos. Es necesario mencionar que la presión no puede aumentar más de 35 psi en las válvulas porque las capas del dispositivo pueden despegarse, por lo que se utilizó una presión de 30 psi en los botones de 100 μm .

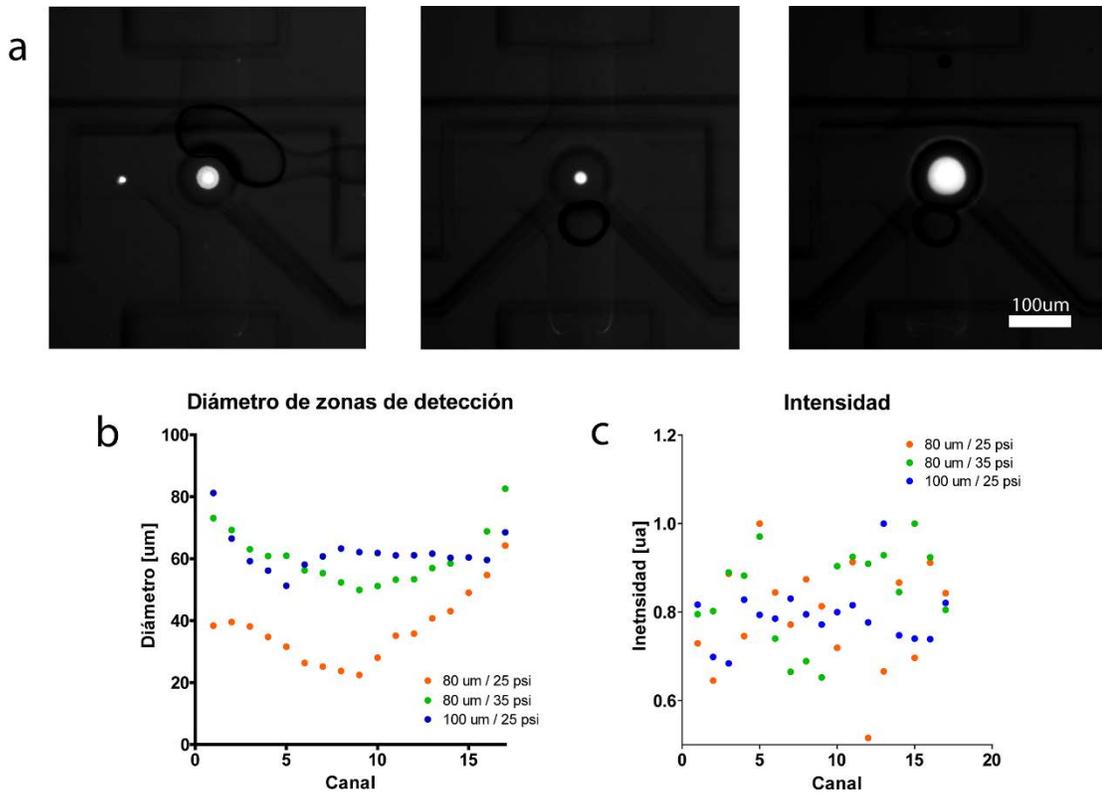


Fig. 4.6: Micrografías de la zona de detección y gráficas de los valores obtenidos. **(a)** Micrografías de fluorescencia del primer, central y último serpentín de la zona de detección. **(b)** Gráfica del diámetro de las zonas de detección en tres condiciones distintas; para los botones de 100 μm se utilizó una capa de flujo distinta. **(c)** Gráfica de la intensidad de fluorescencia en cada zona de detección en las tres condiciones de los experimentos; todas las micrografías se tomaron bajo los mismos parámetros.

Tabla 4.1: Media y desviación estándar (SD) de intensidad de fluorescencia y diámetro de las zonas de detección. Los valores de intensidad están normalizados a la intensidad más alta en cada experimento, a la cual se le asignó el valor de 1.

Diámetro [μm]	Presión aplicada [psi]	Área [μm]		Intensidad [ua]	
		Media	SD	Media	SD
80	30	37.109	10.899	0.791	0.117
	35	60.356	8.500	0.843	0.103
100	30	61.941	6.047	0.791	0.067

Por último, después de hacer pruebas con NA-488 y observar que es posible funcionalizar las zonas de detección e inmovilizar moléculas, se hizo una prueba de la misma manera para atrapar EGFP a través de adherir anticuerpos en las zonas de detección, y después un segundo anticuerpo anti-GFP pero esta vez conjugado con ficoeritrina, para simular un inmunoensayo directo tipo sándwich. Se utilizaron botones de 100 μm presurizados a 30 psi, debido a que presentan una menor variación en la intensidad de fluorescencia, así como en el diámetro de la zona de detección. Según las micrografías que se muestran en la Figura 4.7 y los resultados mostrados en la tabla 4.2, la intensidad para anti-GFP conjugado con ficoeritrina tiene una variación aproximada de 5% mayor que EGFP, pero solo 1% más en la desviación estándar comparada contra la media. La variación puede ser debida a que no se dio tiempo suficiente para que los anticuerpos se adhirieran al EGFP, y de ser así podría solucionarse fluyendo o incubando las soluciones por más tiempo.

Tabla 4.2: *Media y desviación estándar (SD) al medir la intensidad y fluorescencia en las zonas de detección al utilizar EGFP y anti-GFP conjugado con ficoeritrina. Todos los valores están normalizados a la intensidad más alta.*

Diámetro [μm]	Presión aplicada [psi]	Intensidad EGFP [ua]		Intensidad Ficoeritrina [ua]	
		Media	SD	Media	SD
100	30	0.935	0.053	0.888	0.063

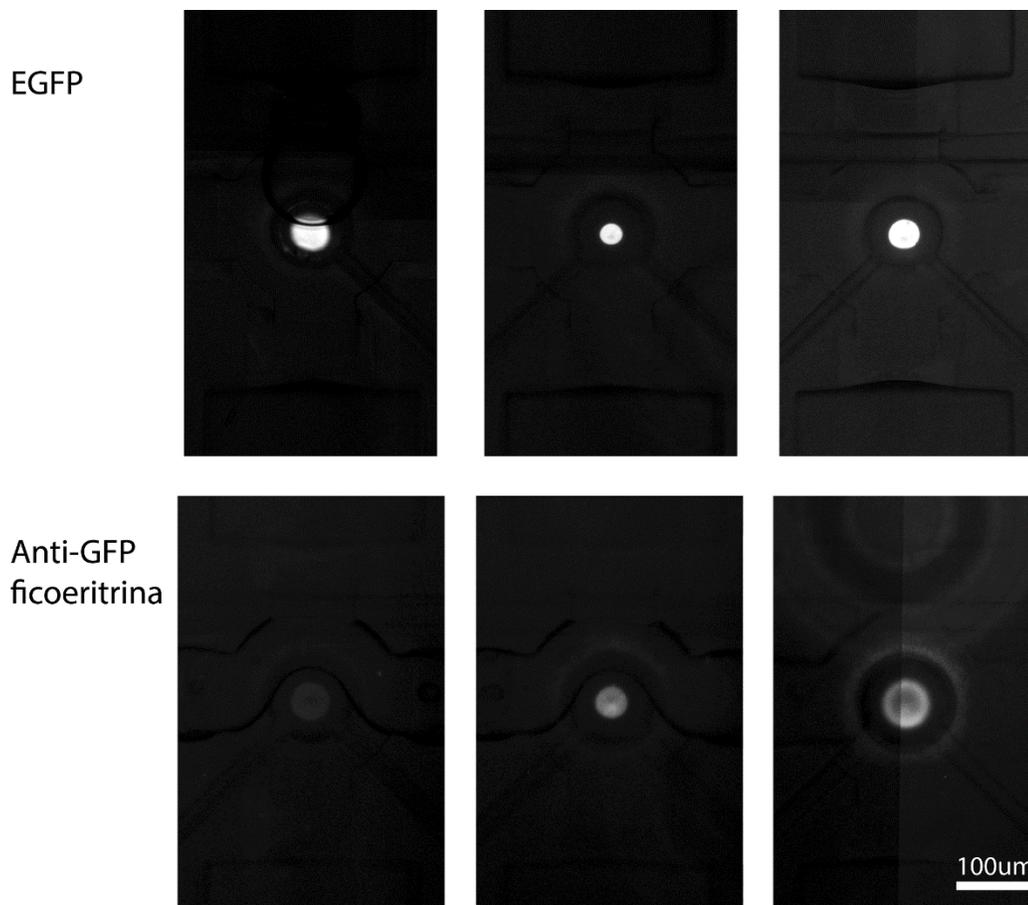


Fig. 4.7: *Micrografías de tres zonas de detección al funcionalizar el canal de detección y atrapar EGFP y anti-GFP conjugado con ficoeritrina; las tres zonas de detección que se muestran son las intersecciones con el primer, central y último serpentín. Las imágenes superiores corresponden a EGFP y las inferiores a anti-GFP ficoeritrina.*

En un panorama general, con respecto a la inmovilización de proteínas en la superficie de las zonas de detección (ya sea NA-488 o anticuerpos), los resultados muestran variaciones significativas dependiendo del diámetro de los botones que se use y la presión de activación de los mismos. Al aumentar el diámetro de 80 a 100 μm , la variación del diámetro de las zonas funcionalizadas bajó, pero también se nota un cambio en el diámetro de las zonas de detección. La media en los botones de 80 μm presurizados a 35 psi aproximadamente 60 μm , mientras que para los botones de 100 μm presurizados a 30 psi es de aprox. 61 μm . El alcanzar un diámetro similar con una presión menor es importante porque trabajar con altas presiones para estas

dimensiones de microcanales (arriba de 30 psi) puede provocar que las capas del dispositivo se despeguen. Además, este resultado nos lleva a pensar que utilizando un diámetro aún mayor en los botones podría darnos áreas de detección más grandes utilizando presiones de activación menores.

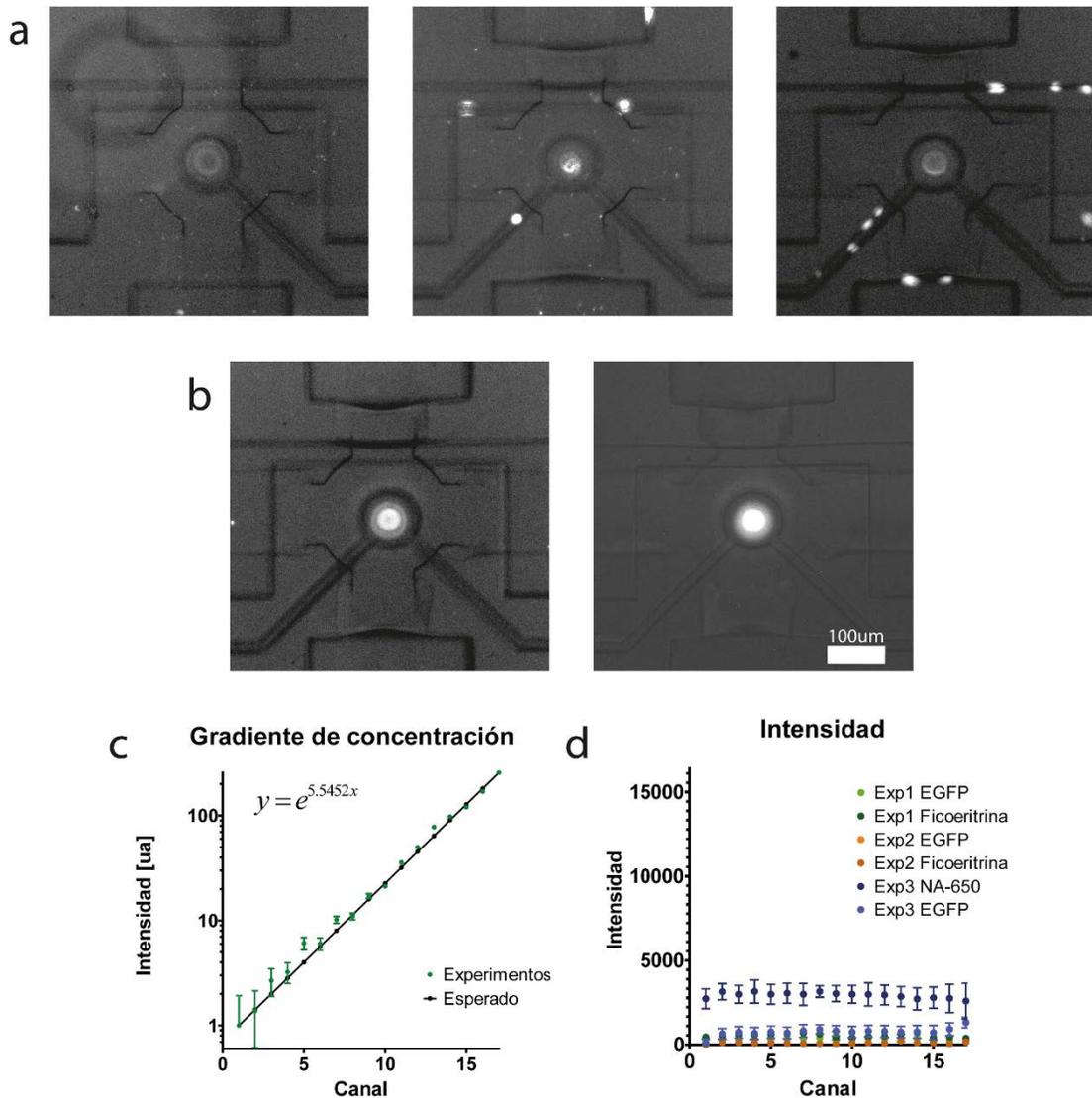
Por otra parte, cuando se probó la inmovilización de anticuerpos, a pesar de la diferencia en diámetro de las zonas de detección, la intensidad de fluorescencia de EGFP en estas zonas se mantuvo constante. Al adherir el anticuerpo marcado con ficoeritrina se observó que una de las zonas de detección tiene una intensidad menor al promedio (primera imagen de la fila inferior en la Figura 4.7). La razón de este cambio puede ser una diferencia de presión en este punto ya que se encuentra más cerca al canal de entrada. Pensamos que este no será un problema para futuros experimentos ya que cuando se intente atrapar moléculas que vengan de los serpentines, el flujo volumétrico y la presión será la misma en todos los serpentines.

4.4 Prueba de generación de una curva estándar

Después de las pruebas anteriores se hizo un experimento para probar la generación de la curva estándar en el dispositivo, se atraparon anticuerpos biotinilados en las zonas de detección y posteriormente se generó el gradiente de concentración para que las moléculas de EGFP se adhirieran a los anticuerpos, esperando que al fluir una concentración distinta por cada serpentín se adhiriera un número proporcional de moléculas en cada zona de detección, y con esto generar una curva estándar.

Antes de generar el gradiente se aseguró que los botones estuvieran ocluyendo las zonas de detección para evitar que las moléculas de EGFP se adhirieran cuando el flujo en el dispositivo aún se estaba estabilizando. Una vez estable, se generó el gradiente y se dejaron fluir las soluciones por 20 min tomando fotografías cada 3 min para ver los cambios en la fluorescencia. El experimento se repitió tres veces con las mismas condiciones, excepto que en el tercer experimento se adhirió neutravidina-650 (NA-650) que está conjugada con un fluorocromo que emite en una longitud de onda diferente al EGFP, y no se adhirieron los anticuerpos conjugados con ficoeritrina. En la Figura 4.8 se observan las gráficas de los resultados obtenidos.

El gradiente de concentración se formó correctamente en los tres experimentos (Figura 4.8c), teniendo una $r^2 = 0.9953$ y un error estándar de la regresión de 5.663. Aun así, hubo diferentes resultados para cada experimento al momento de atrapar las moléculas de EGFP en las zonas de detección. En los primeros dos experimentos, a pesar de que el protocolo que se siguió para funcionalizar las zonas de detección fue el mismo que en el experimento anterior, y que el gradiente de concentración se formó correctamente, no se observó que las moléculas de EGFP se adhirieran según lo esperado, y por lo tanto tampoco las de anti-GFP ficoeritrina. Solo se puede observar una línea de fluorescencia en los botones (Figura 4.8a) pero los valores de intensidad de fluorescencia son aproximadamente 100 veces más bajos que los de la



4.8: Resultados del experimento para generar una curva estándar. Las micrografías se trataron digitalmente para que se puedan observar las zonas fluorescentes. **(a)** Micrografías para EGFP de la primera, central y última zona de detección del primer experimento, donde se observa que las moléculas de EGFP no se adhieren como se espera. **(b)** Micrografías para EGFP a la izquierda y NA-650 a la derecha para el tercer experimento. **(c)** Gráfica del perfil del gradiente de concentración para el promedio y desviación estándar los tres experimentos medidos en los botones. **(d)** Gráfica de intensidad de fluorescencia medida en los botones.

Figura 4.7a. Lo anterior puede deberse a que las moléculas se despegaban después de un tiempo debido al flujo en los canales, o que la funcionalización no se realizó correctamente. Por lo anterior, para el tercer experimento se cambió la solución de neutravidina (NA) por una de NA-650 para asegurar que las zonas de detección estuvieran funcionalizadas con anticuerpos antes de generar el gradiente de concentración con EGFP.

En la Figura 4.8b se muestran las micrografías de la última zona de detección para EGFP y anti-GFP ficoeritrina; al igual que en 4.8a, aunque parece que la intensidad de fluorescencia en la zona de detección es alta, los valores son muy bajos (Figura 4.8d). Las moléculas de NA-650 parecen haberse adherido uniformemente en las zonas de detección, lo que indica que la funcionalización es adecuada. Las moléculas de EGFP se adhieren en una proporción muy baja y por igual en la mayoría de las zonas de detección, contrario a lo esperado, aunque no se puede concluir algo con los resultados.

Los experimentos para la generación de la curva estándar no funcionaron como se esperaba. La formación del gradiente de concentración no resultó un problema ya que en los tres experimentos reportados se mantiene el perfil exponencial y se tiene un buen ajuste. Al parecer el problema reside en la inmovilización de los antígenos (EGFP). Aun cuando se tomó como control la NA-650 para comprobar que hubiera moléculas inmovilizadas en las zonas de detección, la intensidad de fluorescencia de las moléculas de EGFP era muy baja comparada con los experimentos donde no se utilizó el gradiente de concentración.

Las causas de que la captura de antígenos no funcione pueden ser varias. Puede deberse a que los anticuerpos estén desprendiéndose debido al flujo proveniente de los serpentines y por eso la señal sea tan débil. Otra causa probable es que el sistema necesite ser incubado o que las soluciones fluyan por más tiempo para que se complete la reacción. Este último punto no parece ser el problema porque se logra atrapar antígenos cuando no se usa el gradiente de concentración, pero no se puede

descartar completamente. Una causa más podría ser que las concentraciones de la solución no sean las adecuadas, pero tampoco es completamente posible porque de estar utilizando una alta concentración se saturarían todas las zonas de detección, y si fuera el caso contrario, no veríamos fluorescencia en absoluto. Considerando lo anterior, es necesario seguir estudiando el sistema para resolver los problemas que se encontraron.

4.5 Dispositivo microfluídico para pruebas futuras

Los últimos resultados nos llevan a pensar que para lograr un sistema funcional es necesario modificar de nuevo el diseño del dispositivo microfluídico. Con lo que se ha observado de los experimentos realizados, tener más control sobre el tamaño de las zonas de detección es importante si se desea que este dispositivo funcione en inmunoensayos que no se basen en fluorescencia. Además, si el área de detección es más grande se podrían utilizar diferentes presiones para activar los botones y de esta manera asegurarnos de que cambios de presión en los canales de flujo no provoquen que los botones se levanten y se pierdan las zonas funcionalizadas.

También es necesario agregar canales en los que se puedan inyectar muestras para comprobar que la curva estándar funcione una vez que se logre generar. Pensando en estas variables, se hicieron algunas modificaciones significativas al dispositivo microfluídico de dos capas. El canal de detección está fabricado con fotorresina positiva con una altura de aproximadamente $10\ \mu\text{m}$ y los botones tienen un diámetro de $150\ \mu\text{m}$, con esto se necesita menos presión para bloquear las zonas de detección. Se agregaron cinco canales para muestras y/o utilizarlos como control que están conectados al canal de funcionalización y tienen sus propios botones. De esta manera, es posible funcionalizar todas las zonas de detección utilizando la misma cantidad de soluciones que antes. Cada canal para muestras tiene cinco botones, para que cada ensayo se realice cinco veces. Por último, para que el flujo volumétrico no se viera afectado considerablemente, se mantuvieron las mismas dimensiones en los serpentines y los canales anchos. El dispositivo en PDMS se muestra en la Figura 4.9a.

Se hicieron pruebas para activar los botones utilizando diferentes presiones. Al realizar esto, nos dimos cuenta que desde bajas presiones (comparadas con las usadas anteriormente) lográbamos zonas de detección con diámetros uniformes. Los resultados se muestran en la Tabla 4.3.

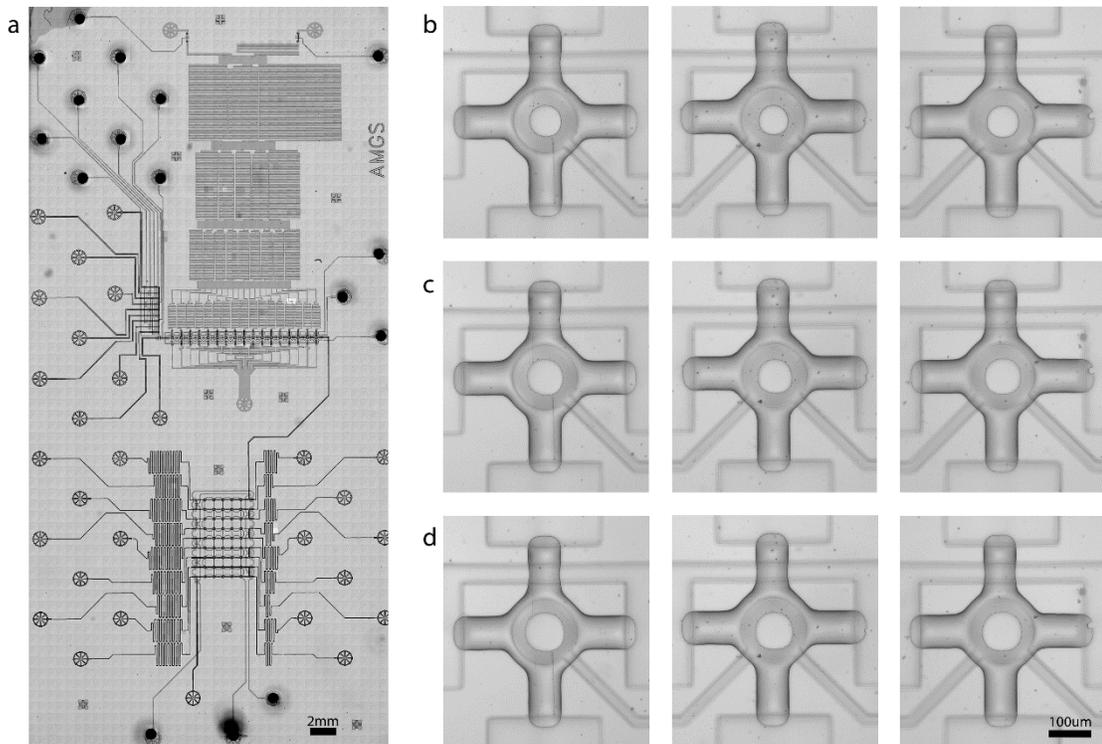


Fig. 4.9: *Dispositivo microfluídico con botones de un mayor diámetro y canales para muestras. (a) Micrografía del dispositivo completo. La mitad inferior del dispositivo son cinco canales para inyectar muestras para probar la curva estándar. En (b), (c) y (d) se muestran los botones presurizados con 10, 13 y 15 psi, respectivamente, en el primer, noveno y diecisieteavo serpentín de la última etapa.*

Tabla 4.3: *Diámetro de las zonas de detección aplicando distintas presiones.*

Presión (psi)	Diámetro (μm)	
	Media	Desviación estándar
10	73.29	1.65
13	84.13	1.35
15	92.38	1.24

Se hicieron pruebas para activar los botones utilizando diferentes presiones. Al realizar esto, nos dimos cuenta que desde muy bajas presiones (comparadas con las

usadas anteriormente) lográbamos que se formaran zonas de detección uniformes. Los resultados se muestran en la Tabla 4.3.

Si se comparan los resultados de la Tabla 4.3 con los de la Tabla 4.1, se observa una evidente mejora en la uniformidad del diámetro de las zonas de detección. Aunque los resultados no son directamente comparables, ya que en estos se toman fotografías sólo en campo claro aplicando presión y en los otros es después de inmovilizar moléculas, creemos que los resultados no tendrán mucha variación una vez que se llegue a la inmovilización de proteínas con este nuevo dispositivo porque.

Con este nuevo dispositivo sólo se probó la fabricación y la activación de los botones sin proteínas, pero gracias a los resultados obtenidos previamente podemos pensar que este dispositivo nos permitirá tener un mejor control en la parte de inmovilización de proteínas y captura de los antígenos, que son los puntos clave para que el objetivo propuesto se cumpla.

5. CONCLUSIONES

Según los experimentos de generación del gradiente de concentración, podemos concluir que los sistemas fabricados funcionan adecuadamente, aun cuando se probaron dos dispositivos distintos con dos moléculas distintas, los cálculos teóricos se ajustaron con lo experimental en todos los casos. Se observó que el dispositivo fabricado para proteínas grandes funciona también con moléculas más pequeñas, lo que hace robusta esta parte del sistema. Se puede suponer que el gradiente de concentración mantendrá el perfil deseado siempre que se utilicen moléculas más pequeñas, o se utilice una presión en las entradas más baja para moléculas más grandes.

Luego de los diferentes experimentos para probar la zona de detección, existieron resultados esperados y no esperados. El diámetro de los botones influye en el área de las zonas de detección y la presión necesaria para activarlos, un diámetro mayor nos confiere un mayor control y uniformidad de las áreas de detección. Se logró inmovilizar anticuerpos y atrapar antígenos con ellos al inyectarlos sin hacer uso del gradiente de concentración, hasta lograr hacer un análogo a un inmunoensayo tipo sándwich.

Al tratar de unir ambas partes del dispositivo, los experimentos no arrojaron los resultados buscados, el protocolo propuesto con el sistema fabricado no funciona adecuadamente. Aunque los resultados finales aunque apuntan a que cambios mínimos en el sistema pueden lograr que los experimentos den los resultados esperados, no se puede concluir con certeza que el sistema funcione según el objetivo general planteado. Para obtener una conclusión final es necesario continuar los experimentos con un sistema en el que se empleen las mejoras que se sugieren en los resultados, probablemente con el último sistema propuesto.

6. PERSPECTIVAS

Para finalizar los estudios aquí realizados ya se mencionó que es necesario probar un nuevo sistema que integre las soluciones propuestas. Creemos que los problemas serán solucionados con el sistema propuesto, por lo que realizando un bajo número de experimentos debería concluir este proyecto.

Por otra parte, una vez que el dispositivo funcione adecuadamente, se pueden incorporar nuevas estructuras, como mezcladores pasivos que generan turbulencia en los microcanales [74], y así ahorrar espacio en el dispositivo. También podrían crearse gradientes de concentración con un perfil lineal y agregar las zonas de detección para los inmunoensayos que requieren una curva estándar lineal y no exponencial.

Las ventajas de la microfluídica son tales que un sistema diseñado para un propósito podría funcionar para otros distintos. Por ejemplo, este sistema podría también ser utilizado para atrapar células en las zonas de detección y estimularlas con gradientes de concentración de diferentes proteínas y ver su respuesta. Por esta razón creemos que el dispositivo puede ser implementado y funcional una vez que se caracterice completamente.

Algo que no se mencionó a fondo es la fabricación de los dispositivos. El proceso que se utilizó para fabricar los últimos dispositivos es complejo pero de bastante utilidad para escalar los diseños. Con lo que se aprendió de la fabricación de dispositivos microfluídicos (que es parte del primer objetivo específico) no será más fácil comprender, modificar y adaptar los diseños para resolver problemas o proponer nuevas aplicaciones de los que ya tenemos.

REFERENCIAS

- [1] G. M. Whitesides, "The origins and the future of microfluidics.," *Nature*, vol. 442, no. 7101, pp. 368–373, Jul. 2006.
- [2] W. C. Tian and E. Finehout, *Microfluidics for Biological Applications*, 1st ed. Boston, MA: Springer US, 2009.
- [3] S. C. Terry, J. H. Jerman, and J. B. Angell, "A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer," *IEEE Transactions on Electron Devices*, vol. 26, no. 12, pp. 1880–1886, 1979.
- [4] P. Neuzi, S. Giselbrecht, K. Länge, T. J. Huang, and A. Manz, "Revisiting lab-on-a-chip technology for drug discovery," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 11, no. 8, pp. 620–632, Aug. 2012.
- [5] D. Erickson and D. Li, "Integrated microfluidic devices," *Anal. Chim. Acta*, vol. 507, no. 1, pp. 11–26, Apr. 2004.
- [6] H. Yin and D. Marshall, "Microfluidics for single cell analysis," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 23, no. 1, pp. 110–119, Feb. 2012.
- [7] G. A. Truskey, F. Yuan, D. F. Katz, *Transport phenomena in biological systems*, 1st ed. New Jersey: Prentice Hall, 2004.
- [8] H. Bruus, *Theoretical microfluidics*, 1st ed. New York: Oxford University Press, 2008.
- [9] S. Hardt and F. Schönfeld, *Microfluidic technologies for miniaturized analysis systems*, 1st ed. New York: Springer US, 2007.

- [10] G. Paumier, "Laminar and turbulent flows," 2008. [Online]. Available: http://catedu.es/matematicas_mundo/DEPORTES/deportes_Jabulani.htm. [Accessed: 25-Aug-2014].
- [11] J. Crank, *The mathematics of diffusion*, 2nd ed. London: Oxford University Press, 1975.
- [12] A. Folch, *Introduction to BioMEMS*, 1st ed. Florida: CRC Press, 2012.
- [13] R. B. Bird, W. E. Stewart, E. N. Lightfoot, *Transport phenomena*, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2002.
- [14] T. M. Squires and S. R. Quake, "Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale," *Rev. Mod. Phys.*, vol. 77, no. 3, pp. 977–1026, Oct. 2005.
- [15] J. Atencia and D. J. Beebe, "Controlled microfluidic interfaces," *Nature*, vol. 437, no. 7059, pp. 648–655, Sep. 2005.
- [16] J. de Jong, R. G. H. Lammertink, and M. Wessling, "Membranes and microfluidics: a review.," *Lab Chip*, vol. 6, no. 9, pp. 1125–1139, 2006.
- [17] J. C. McDonald, D. C. Duffy, J. R. Anderson, D. T. Chiu, H. Wu, O. J. Schueller, and G. M. Whitesides, "Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane).," *Electrophoresis*, vol. 21, no. 1, pp. 27–40, 2000.
- [18] J. a. Rogers and R. G. Nuzzo, "Recent progress in soft lithography," *Materials Today*, vol. 8, no. 2. Elsevier Ltd, pp. 50–56, 2005.
- [19] H. Schmid and B. Michel, "Siloxane Polymers for High-Resolution, High Accuracy Soft Lithography," *Macromolecules*, vol. 33, pp. 3042–3049, 2000.

- [20] Z. Li, Y. Gu, L. Wangs, H. Ge, W. Wu, Q. Xia, C. Yuan, Y. Chen, B. Cui, and R. S. Williams, "Hybrid nanoimprint-soft lithography with sub-15 nm resolution," *Nano Lett.*, vol. 9, no. 6, pp. 2306–2310, 2009.
- [21] Y. Xia and G. M. Whitesides, "SOFT LITHOGRAPHY," *Annual Review of Materials Science*, vol. 28, no. 1. pp. 153–184, 1998.
- [22] D. Qin, Y. Xia, and G. M. Whitesides, "Soft lithography for micro- and nanoscale patterning," *Nat. Protoc.*, vol. 5, no. 3, pp. 491–502, Mar. 2010.
- [23] D. B. Hall, P. Underhill, and J. M. Torkelson, "Spin coating of thin and ultrathin polymer films," *Polym. Eng. Sci.*, vol. 38, no. 12, pp. 2039–2045, Dec. 1998.
- [24] a Del Campo and C. Greiner, "SU-8: a photoresist for high-aspect-ratio and 3D submicron lithography," *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 17, no. 6, pp. R81–R95, Jun. 2007.
- [25] D. C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. a Schueller, and G. M. Whitesides, "Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane)," *Anal. Chem.*, vol. 70, no. 23, pp. 4974–4984, Dec. 1998.
- [26] S. Bhattacharya, A. Datta, J. M. Berg, and S. Gangopadhyay, "Studies on surface wettability of poly(dimethyl) siloxane (PDMS) and glass under oxygen-plasma treatment and correlation with bond strength," *J. Microelectromechanical Syst.*, vol. 14, no. 3, pp. 590–597, Jun. 2005.
- [27] L. Xiong, P. Chen, and Q. Zhou, "Adhesion promotion between PDMS and glass by oxygen plasma pre-treatment," *J. Adhes. Sci. Technol.*, vol. 28, no. 11, pp. 1046–1054, Jun. 2014.

- [28] M. a Unger, H. P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer, and S. R. Quake, "Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography.," *Science*, vol. 288, no. 5463, pp. 113–116, 2000.
- [29] C. L. Hansen, M. O. A. Sommer, and S. R. Quake, "Systematic investigation of protein phase behavior with a microfluidic formulator," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 101, no. 40, pp. 14431–14436, Oct. 2004.
- [30] G. a Cooksey, C. G. Sip, and A. Folch, "A multi-purpose microfluidic perfusion system with combinatorial choice of inputs, mixtures, gradient patterns, and flow rates," *Lab Chip*, vol. 9, no. 3, pp. 417–426, 2009.
- [31] A. Zahra and G. De Cesare, "Formation of Round Channel for Microfluidic Applications," *Int. J. Electr. Comput. Electron. Commun. Eng.*, vol. 8, no. 7, pp. 1166–1170, 2014.
- [32] P. M. Fordyce, C. a. Diaz-Botia, J. L. DeRisi, and R. Gomez-Sjoberg, "Systematic characterization of feature dimensions and closing pressures for microfluidic valves produced via photoresist reflow," *Lab on a Chip*, vol. 12, no. 21. p. 4287, 2012.
- [33] Z. Wang, A. a Volinsky, and N. D. Gallant, "Crosslinking effect on polydimethylsiloxane elastic modulus measured by custom-built compression instrument," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 131, no. 22, p. n/a–n/a, Nov. 2014.
- [34] E. P. Kartalov, A. Scherer, S. R. Quake, C. R. Taylor, and W. F. Anderson, "Experimentally validated quantitative linear model for the device physics of elastomeric microfluidic valves," *J. Appl. Phys.*, vol. 101, no. 6, 2007.
- [35] A. Manz, N. Graber, and H. M. Widmer, "Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 1, no. 1–6, pp. 244–248, Jan. 1990.

- [36] P. S. Dittrich and A. Manz, "Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 5, no. 3, pp. 210–8, Mar. 2006.
- [37] E. A. Ottesen, J. W. Hong, S. R. Quake, and J. R. Leadbetter, "Microfluidic Digital PCR Enables Multigene Analysis of Individual Environmental Bacteria," *Science (80-.)*, vol. 314, no. 5804, pp. 1464–1467, Dec. 2006.
- [38] G. M. Walker, J. Sai, A. Richmond, M. Stremler, C. Y. Chung, and J. P. Wikswo, "Effects of flow and diffusion on chemotaxis studies in a microfabricated gradient generator.," *Lab Chip*, vol. 5, no. 6, pp. 611–618, 2005.
- [39] K. Kuribayashi, G. Tresset, P. Coquet, H. Fujita, and S. Takeuchi, "Electroformation of giant liposomes in microfluidic channels," in *Digest of Technical Papers - International Conference on Solid State Sensors and Actuators and Microsystems, TRANSDUCERS '05*, 2005, vol. 2, pp. 1159–1162.
- [40] J. Ryley and O. M. Pereira-Smith, "Microfluidics device for single cell gene expression analysis in *Saccharomyces cerevisiae*," *Yeast*, vol. 23, no. 14–15, pp. 1065–1073, Oct. 2006.
- [41] V. Lecault, A. K. White, A. Singhal, and C. L. Hansen, "Microfluidic single cell analysis: from promise to practice," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 16, no. 3–4, pp. 381–390, Aug. 2012.
- [42] K. N. Han, C. A. Li, and G. H. Seong, "Microfluidic chips for immunoassays.," *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto. Calif.)*, vol. 6, pp. 119–41, 2013.
- [43] J. R. Crowther, *ELISA. Theory and practice.*, vol. 42. 1995.
- [44] J. Rovenský and J. Payer, *Dictionary of Rheumatology*. 2009.
- [45] D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5th ed. W. H. Freeman, 2008.

- [46] A. S. Editor, *Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements II*, vol. 6. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008.
- [47] L. Dongyou, *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. Boston, MA: Springer US, 2013.
- [48] M. Debnath, G. B. K. S. Prasad, and P. S. Bisen, *Molecular Diagnostics: Promises and Possibilities*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010.
- [49] Y.-H. P. Hsieh, *Food Analysis*, vol. 184, no. 4696. Boston, MA: Springer US, 2010.
- [50] eBiosciences, "Product information & manual: Human TNF- α instant ELISA." [Online]. Available: http://ebioscience.instant.at/bm_products/MAN/223INSTCE.pdf. [Accessed: 01-Jan-2014].
- [51] ForteBio, "The Dip and Read™ ELISA Assay — Converted ELISA." [Online]. Available: <http://www.fortebio.com/octet-elisa.html>. [Accessed: 25-Aug-2014].
- [52] S. Sun, M. Yang, Y. Kostov, and A. Rasooly, "ELISA-LOC: lab-on-a-chip for enzyme-linked immunodetection.," *Lab Chip*, vol. 10, no. 16, pp. 2093–2100, Aug. 2010.
- [53] S. Wang, X. Zhao, I. Khimji, R. Akbas, W. Qiu, D. Edwards, D. W. Cramer, B. Ye, and U. Demirci, "Integration of cell phone imaging with microchip ELISA to detect ovarian cancer HE4 biomarker in urine at the point-of-care," *Lab on a Chip*, vol. 11, no. 20. p. 3411, 2011.

- [54] S. Kim, H. J. Kim, and N. L. Jeon, "Biological applications of microfluidic gradient devices.," *Integr. Biol. (Camb).*, vol. 2, no. 11–12, pp. 584–603, Nov. 2010.
- [55] E. Berthier and D. J. Beebe, "Gradient generation platforms: new directions for an established microfluidic technology.," *Lab Chip*, pp. 3241–3247, Jul. 2014.
- [56] S. K. W. Dertinger, D. T. Chiu, Noo Li Jeon, and G. M. Whitesides, "Generation of gradients having complex shapes using microfluidic networks," *Anal. Chem.*, vol. 73, no. 6, pp. 1240–1246, 2001.
- [57] N. L. Jeon, S. K. W. Dertinger, D. T. Chiu, I. S. Choi, A. D. Stroock, and G. M. Whitesides, "Generation of solution and surface gradients using microfluidic systems," *Langmuir*, vol. 16, no. 22, pp. 8311–8316, 2000.
- [58] K. Campbell and A. Groisman, "Generation of complex concentration profiles in microchannels in a logarithmically small number of steps.," *Lab Chip*, vol. 7, no. 2, pp. 264–272, 2007.
- [59] S. J. Maerkl and S. R. Quake, "A Systems Approach to Measuring the Binding Energy Landscapes of Transcription Factors," *Science (80-.)*, vol. 315, no. 5809, pp. 233–237, Jan. 2007.
- [60] J. L. Garcia-Cordero and S. J. Maerkl, "Multiplexed surface micropatterning of proteins with a pressure-modulated microfluidic button-membrane," *Chem. Commun.*, vol. 49, no. 13, pp. 1264–1266, 2013.
- [61] R. P. Haugland and W. W. You, "Coupling of Monoclonal Antibodies with Biotin," in *Monoclonal Antibody Protocols*, vol. 45, New Jersey: Humana Press, 1995, pp. 223–234.

- [62] P. Vermette, T. Gengenbach, U. Divisekera, P. a. Kambouris, H. J. Griesser, and L. Meagher, "Immobilization and surface characterization of NeutrAvidin biotin-binding protein on different hydrogel interlayers," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 259, no. 1, pp. 13–26, Mar. 2003.
- [63] S. Aldrich, "Fluorescein isothiocyanate isomer I Product Specification." [Online]. Available: http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COFAInfo/SigmaSAPQM/SPEC/F7/F7250/F7250-BULK_____SIGMA____.pdf. [Accessed: 28-Feb-2014].
- [64] F. Chen, "TNF (tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2))," *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.*, vol. 8, no. 3, pp. 236–238, Feb. 2011.
- [65] E. Cook, X. Wang, N. Robiou, and B. C. Fries, "Measurement of Staphylococcal Enterotoxin B in Serum and Culture Supernatant with a Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay," *Clin. Vaccine Immunol.*, vol. 14, no. 9, pp. 1094–1101, Sep. 2007.
- [66] I. Hellstrom, P. J. Heagerty, E. M. Swisher, P. Liu, J. Jaffar, K. Agnew, and K. E. Hellstrom, "Detection of the HE4 protein in urine as a biomarker for ovarian neoplasms.," *Cancer Lett.*, vol. 296, no. 1, pp. 43–8, Oct. 2010.
- [67] M. Arrio-Dupont, G. Foucault, M. Vacher, P. F. Devaux, and S. Cribier, "Translational Diffusion of Globular Proteins in the Cytoplasm of Cultured Muscle Cells," *Biophys. J.*, vol. 78, no. 2, pp. 901–907, Feb. 2000.
- [68] T. Thorsen, S. J. Maerkl, and S. R. Quake, "Microfluidic large-scale integration.," *Science*, vol. 298, no. 5593, pp. 580–584, Oct. 2002.
- [69] Microchem, "Reflow of Photoresist," 2013. [Online]. Available: http://www.microchemicals.com/technical_information/reflow_photoresist.pdf. [Accessed: 20-Feb-2015].

- [70] Microchem, "Hardbake of Photoresist Structures," *Application Notes*, 2013.
[Online]. Available:
http://www.microchemicals.com/technical_information/hardbake_photoresist.pdf. [Accessed: 20-Feb-2015].
- [71] G. Sarl, "GM 1060 Technical Datasheet," 2005. [Online]. Available:
www.gersteltec.ch/userfiles/1197841378.pdf. [Accessed: 18-Feb-2015].
- [72] Y. Nam, D. W. Branch, and B. C. Wheeler, "Epoxy-silane linking of biomolecules is simple and effective for patterning neuronal cultures," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 22, no. 5, pp. 589–597, Dec. 2006.
- [73] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, and A. Cardona, "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis," *Nat. Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 676–682, Jun. 2012.
- [74] A. D. Stroock, "Chaotic Mixer for Microchannels," *Science (80-.)*, vol. 295, no. 5555, pp. 647–651, Jan. 2002.

APÉNDICES

Apéndice A: Script de MATLAB

Se presenta el script de MATLAB utilizado para calcular los parámetros físicos de los dispositivos microfluídicos. Los valores que se muestran son los utilizados para calcular los parámetros en el primer diseño, el cual es un dispositivo microfluídico CGG con perfil exponencial para utilizarse con isotiocianato de fluoresceína FITC. Las líneas en verde son comentarios que no afectan al script.

```
clc;
%-----
%Cálculo de parámetros en dispositivos CGG con perfil exponencial
%-----
%Area transversal de los serpentines
w=40; %en um
h=50; %en um
A=w*h; %en um^2

%Se utiliza la siguiente relación para simplificar el cálculo de la
resistencia
alfa=h/w; %para todos los serpentines y entradas

%l es longitud en um
lpbs=5000; %l canal entrada pbs
lfitc=20200; %l canal entrada fitc
A1=500; %l primer canal ancho
wA1=3000; %w primer canal ancho
alfaA1=h/wA1; %alfa primer canal ancho

%l12 se refiere al canal 2 de la primer etapa, l propuesta
%las l de todos los serpentines pueden calcularse en base a la l de
la última etapa

l12=32000;
l4=l12/8;

l11=l4*10.5;
l12=l4*8;
```

```

l13=l4*22.2;
A2=A1;
wA2=4000;
alfaA2=h/wA2;

l21=l4*5.48;
l2=l4*4;
l25=l4*7.68;
A3=A1;
wA3=5780;
alfaA3=h/wA3;

l31=l4*2.52;
l3=l4*2;
l39=l4*2.82;
A4=A1;
wA4=wA3;
alfaA4=alfaA3;

%Canal de salida ancho, dos partes con distinto w
s1=400;
ws1=1000;
alfas1=h/ws1;
s2=2300;
ws2=680;
alfas2=h/ws2;

%=====
%Coeficiente de difusión de FITC en agua en um^2/s
Dfitc=500;
%Viscosidad del agua en Pa*s
n=1*10^-3;

%=====
%Resistencia
%Ec general Rh=(12*n*l*alfa/(h^4))*(1/(a-0.63*alfa))
%Resistencia en los serpentines en [Pa s/um^3]
Rl4=(12*n*l4*alfa/(h^4))*(1/(1-0.63*alfa));

Rl11=Rl4*10.5;
Rl12=Rl4*8;
Rl13=Rl4*22.2;
Rl1t=1/(1/Rl11 + 1/Rl12 + 1/Rl13);
%Rl1t es Rh total de los serpentines en paralelo

Rl21=Rl4*5.48;
Rl2=Rl4*4; %x3 canales
Rl25=Rl4*7.68;
Rl2t=1/(1/Rl21 + 3/Rl2 + 1/Rl25);

Rl31=Rl4*2.52;
Rl3=Rl4*2; %x7 canales
Rl39=Rl4*2.82;
Rl3t=1/(1/Rl31 + 7/Rl3 + 1/Rl39);

```

```

Rl4t=1/(17/Rl4);

%Resistencia de los canales de entrada, anchos, salida
Rlpbs=(12*n*lpbs*alfa/(h^4))*(1/(1-0.63*alfa));
Rlfitc=(12*n*lfitc*alfa/(h^4))*(1/(1-0.63*alfa));
Rint=1/(1/Rlpbs + 1/Rlfitc);

RA1=(12*n*A1*alfaA1/(h^4))*(1/(1-0.63*alfaA1));
RA2=(12*n*A2*alfaA2/(h^4))*(1/(1-0.63*alfaA2));
RA3=(12*n*A3*alfaA3/(h^4))*(1/(1-0.63*alfaA3));
RA4=(12*n*A4*alfaA4/(h^4))*(1/(1-0.63*alfaA4));
RAt=RA1 + RA2 + RA3 + RA4;

Rs1=(12*n*s1*alfas1/(h^4))*(1/(1-0.63*alfas1));
Rs2=(12*n*s2*alfas2/(h^4))*(1/(1-0.63*alfas2));
Rst=Rs1 + Rs2;

Rt=Rl1t + Rl2t + Rl3t + Rl4t + Rint + RAt + Rst;

%=====
% Flujo y presión
%Tiempo de difusión a través de w=40 um
t=(w^2)/(Dfitc); %en s

%Por lo tanto, la velocidad y flujos necesarios en el canal 1,2 para
que haya difusion completa son
v12=l12/t;
Q12=v12*A; %en um^3/s

%De aquí obtenemos la caída de presión en ese serpentín
p12=Q12*Rl12; %en Pa
%La caída de presión es la misma en todos los serpentines de una
etapa
p1=p12;

%Utilizamos las relaciones de flujo para obtener la caída de presión
en cada etapa
Qinfitc=3.36*Q12/8;
Qinpbs=13.6*Q12/8;
Q23=Q12/2;
Q35=Q12/4;
Q49=Q12/8;

pin=Qinfitc*Rlfitc;
p2=Q23*Rl2;
p3=Q35*Rl3;
p4=Q49*Rl4;

%Con esto podemos obtener la caída de presión entre las entradas y
el punto justo antes del canal de salida
pt=pin + p1 + p2 + p3 + p4;

%Obtenemos Qt en um^3/s
Qt=pt/Rt;

```

```

%=====
%Número de Reynolds
%Ec  $ro \cdot V0 \cdot L0 / n$ ;
%ro -> densidad del agua
ro=1000;           %kg/m^3
V0=Qt/A;          %um/s
L0=w;              %um
rol=ro/10^18;     %en kg/um^3
nl=n/10^6;        %en kg/um s

Ret=rol*V0*L0/nl
ReS12=rol*(Q12/A)*L0/nl
ReS23=rol*(Q23/A)*L0/nl
ReS35=rol*(Q35/A)*L0/nl
ReS49=rol*(Q49/A)*L0/nl

%=====
%Número de Péclet
%Ec  $Pe = V0 \cdot L0 / D$ 
Pet=V0*L0/Dfitc
PeA1=(Qinfitc/A)*(A1/3)/Dfitc
PeA2=(Q12/A)*(A2/5)/Dfitc
PeA3=(Q23/A)*(A3/9)/Dfitc
PeA4=(Q35/A)*(A4/17)/Dfitc

```