



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD MONTERREY  
INGENIERÍA Y FÍSICA BIOMÉDICAS

Efecto de la compactación de micropartículas magnéticas en la eficiencia de una trampa magnética microfluídica.

**Tesis que presenta**

Pablo Enrique Guevara Pantoja

**para obtener el grado de**

Maestro en ciencias

**en**

Ingeniería y física biomédicas

**Asesor de tesis:**

Dr. Gabriel Arturo Caballero Robledo

## Agradecimientos.

Agradezco ampliamente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, ya que sin su programa de apoyos económicos, no hubiera sido posible terminar este trabajo de tesis para maestría.

# Índice general

<b>1 Introducción</b>	
1.1 Microfluídica.....	5
1.2 Inmunoensayos.....	5
1.3 Inmunoensayos en microfluídica.....	6
1.4 Nanopartículas magnéticas.....	7
1.5 Nanopartículas magnéticas como inmunosoporte.....	7
1.6 Captura de nanopartículas magnéticas.....	10
1.7 Materia granular.....	13
1.8 Variación de la densidad en materia granular.....	13
<b>2 Objetivo.....</b>	<b>17</b>
2.1 Objetivos particulares.....	17
2.2 Hipótesis.....	17
<b>3 Metodología.....</b>	<b>18</b>
3.1 Síntesis de nanopartículas.....	18
3.1.1 Metodología de síntesis de nanopartículas.....	18
3.1.2 Funcionalización de nanopartículas.....	19
3.1.3 Metodología para la funcionalización de las nanopartículas.....	20
3.1.4 Caracterización de nanopartículas.....	20
3.2 Fabricación del canal microfluídico.....	21
3.2.1 El PMMA como material de fabricación.....	21
3.2.2 Técnica de fabricación por micromaquinado.....	21
3.2.3 Metodología de fabricación.....	25
3.2.4 Sellado del canal microfluídico compuesto por PMMA.....	28
3.2.5 Metodología para el sellado.....	30

3.3 Metodología de los experimentos de captura y liberación de nanopartículas magnéticas fluorescentes.....	30
3.3.1 Arreglo experimental para el control de la compactación.....	31
3.3.1.1 Arreglo para la visualización y medición de la compactación de la trampa de micropartículas.....	38
3.3.1.2 Desarrollo de los experimentos de control de la tasa de compactación.....	43
3.3.1.3 Resultados de los experimentos de control de la tasa de compactación.....	44
3.3.1.4 Discusión.....	45
3.3.2 Experimentos de captura y liberación de nanopartículas fluorescentes en función de la compactación.....	46
3.3.2.1 Metodología de los experimentos.....	49
3.3.2.2 Análisis de los videos obtenidos de los Experimentos.....	50
3.3.2.3 Resultados de los experimentos de liberación de nanopartículas magnéticas fluorescentes .....	54
3.3.2.4 Discusión.....	55
<b>4 Conclusiones.....</b>	<b>57</b>
<b>5 Bibliografía.....</b>	<b>59</b>

## Resumen

Es de interés desarrollar un dispositivo que capture nanopartículas de forma controlada y reproducible para aplicaciones en inmunoensayos. En este trabajo se estudió la capacidad de captura de nanopartículas magnéticas de una trampa magnética compuesta por micropartículas ferromagnéticas con diferentes densidades de empaquetamiento. Se reporta un protocolo para el control fino de la compactación de micropartículas de hierro en un microcanal, donde también se describe la metodología para la construcción del microdispositivo. Se sintetizaron nanopartículas del tipo núcleo coraza (MCSNPs, Magnetic Core Shell Nano Particles) con propiedades fluorescentes (fluoresceína) de 50nm de diámetro. En los experimentos con la trampa magnética, se evaluó la capacidad de captura y liberación de MCSNPs con diferentes compactaciones. Los resultados de estos experimentos mostraron que las trampas menos compactas capturan cuatro veces más MCSNPs, que las trampas más compactas.

## Abstract

It is of interest to develop a device that captures nanoparticles in a controlled and reproducible manner for applications in immunoassays. In this work, the capacity to capture magnetic nanoparticles in a magnetic trap composed of ferromagnetic microparticles at different packing densities was studied. A protocol for the fine control of the compaction of iron microparticles in a microchannel is reported, where the methodology for the construction of the microdevice is also described. Core shell type nanoparticles (MCSNPs, Magnetic Core Shell Nano Particles) were synthesized with fluorescent properties (fluorescein) of 50nm in diameter. In experiments with the magnetic trap, the ability to trap and release MCSNPs with different compaction were evaluated. The results of these experiments showed that less compact packings capture up to four times more MCSNPs than more compact packings.

# CAPÍTULO 1

## Introducción

### 1.1 Microfluídica

La microfluídica es un campo multidisciplinario que interseca ingeniería, física, química, nanotecnología y biotecnología. Tiene aplicación práctica en el diseño de sistemas en los que se emplean volúmenes de fluido muy pequeños. En los años 90 se introduce el concepto de Micro Total Analysis System o  $\mu$ TAS también llamado Lab-on-a-chip.

### 1.2 Inmunoensayos

El inmunoensayo es una técnica que aprovecha la alta sensibilidad y especificidad de las interacciones anticuerpo-antígeno para la detección de analitos relevantes[1]. Los inmunoensayos son usados para la cuantificación de proteínas y moléculas pequeñas en diferentes campos, tales como diagnóstico médico, proteómica, investigación farmacéutica e investigación biológica. Los inmunoensayos pueden ser clasificados en dos tipos: heterogéneos y homogéneos. En los inmunoensayos heterogéneos, anticuerpos son inmovilizados en un soporte sólido e interactúan con el antígeno cercano a esta superficie. En este caso los anticuerpos no unidos y otros reactivos son fáciles de remover. En el inmunoensayo homogéneo los anticuerpos y antígenos interactúan en solución. En este caso los anticuerpos unidos y los no unidos son discriminados por cambios químicos o físicos debidos a la unión [2]. Los inmunoensayos heterogéneos y homogéneos

pueden a su vez dividirse en modo competitivo y no competitivo. En el modo competitivo, el antígeno blanco (en la muestra) compite con antígenos marcados de origen externo por un número limitado de sitios de unión, así la señal generada es inversamente proporcional a la concentración del antígeno. Este modo es particularmente importante para pequeños antígenos con un número limitado de epítopes (sitios de unión). En el modo no competitivo los antígenos son capturados por un exceso de anticuerpos y después son detectados por la unión de un segundo anticuerpo marcado que se une al antígeno en un sitio de unión diferente, esto forma un inmunoensayo tipo sándwich en el cual la señal es proporcional a la concentración del antígeno. Este modo es solo compatible con analitos grandes ( $>1,000$  Da) que tienen más de un epítotope [3].

### 1.3 Inmunoensayos en microfluídica

Inmunoensayos del tipo heterogéneo son convencionalmente realizados en placas de 96 o más pocillos. Esta actividad es laboriosa y los tiempos de incubación pueden ser de varias horas debido a que el analito debe difundir a través de grandes distancias antes de encontrar la superficie con anticuerpos. Para mejorar el rendimiento de estos procesos, pueden ser usados sistemas robóticos para el manejo de estos fluidos, pero esta solución solo está disponible en grandes laboratorios y requieren mantenimiento muy específico. Una vía para superar problemas asociados con los inmunoensayos convencionales, es la miniaturización en sistemas microfluídicos. Hacer inmunoensayos en microfluídica ofrece al menos tres ventajas sobre el método convencional [3]: (1) Una relación superficie-volumen grande que incrementa la velocidad de reacción entre anticuerpos y antígenos. (2) Las dimensiones pequeñas reducen el consumo de reactivos costosos, y preciada muestra. (3) El manejo automatizado del fluido puede mejorar la reproducibilidad y el rendimiento. Estas ventajas pueden potencialmente reducir los costos y aumentar el rendimiento de los inmunoensayos convencionales.

Un método sencillo para realizar un inmunoensayo microfluídico consiste en llevarlo a cabo en la superficie de un microcanal [4-6]. A pesar de la reducción del tamaño a la escala micrométrica, la cinética de la reacción sigue estando limitada por difusión. Se han implementado diferentes estrategias para aumentar la eficiencia en la reacción, como confinamiento del flujo [7], mezclando [8] o pre-concentración electroforética [9]. Otros grupos han integrado microesferas en un microcanal para mejorar la relación superficie/volumen y así reducir los tiempos de difusión [10-13].

#### 1.4 Nanopartículas magnéticas.

El potencial de las nanopartículas magnéticas ha sido demostrado durante la última década. Las nanopartículas magnéticas son consideradas como una herramienta versátil y potente, a micro y macro escala. Tienen amplia aplicación en química y biología. Las nanopartículas magnéticas son comercialmente disponibles en muchos sitios y su superficie puede ser adaptada químicamente para realizar uniones de alta especificidad. La combinación de microfluídica y nanopartículas magnéticas da como resultado un campo de investigación multidisciplinario con un amplio rango de aplicaciones tales como: manipulación y separación celular, procesamiento de ADN, bioensayos y catálisis [14].

#### 1.5 Nanopartículas magnéticas como inmunosoporte.

Recientemente, nanopartículas y nanocables han sido usados como inmunosoporte para captura en inmunoensayos [15-16]. Hay algunos dispositivos comerciales basados en nanopartículas magnéticas, como por ejemplo, Philips desarrolló un sistema (Magnotech) donde la molécula blanco es capturada en nanopartículas magnéticas que después son concentradas en una superficie antes del paso de detección. En estos dispositivos la



detección es basada en dispersión de luz [17]. En el 2011 se reporta un dispositivo microfluídico sencillo y de fácil operación dedicado al diagnóstico de alergias mediante el conteo de inmunoglobina E en suero de sangre [18]. Este microchip combina las ventajas de los inmunoensayos homogéneos y heterogéneos, esto es, combina la difusión libre de especies y la fácil separación respectivamente. Para esto se integra a nanopartículas como nanoplataforma de captura, obteniendo así los beneficios de las propiedades magnéticas y coloidales de estas. Al realizar la inmuno reacción con las nanopartículas coloidales, se mejora 1000 veces la cinética de captura comparada con métodos convencionales. Además, es posible confinar y preconcentrar a las nanopartículas magnéticas mediante la implementación de una trampa magnética microfluídica, antes del paso de detección. El factor de preconcentración de nanopartículas es alrededor de 35000 [18], esto ayuda a tener alta sensibilidad sin realizar pasos de amplificación durante el paso de detección.

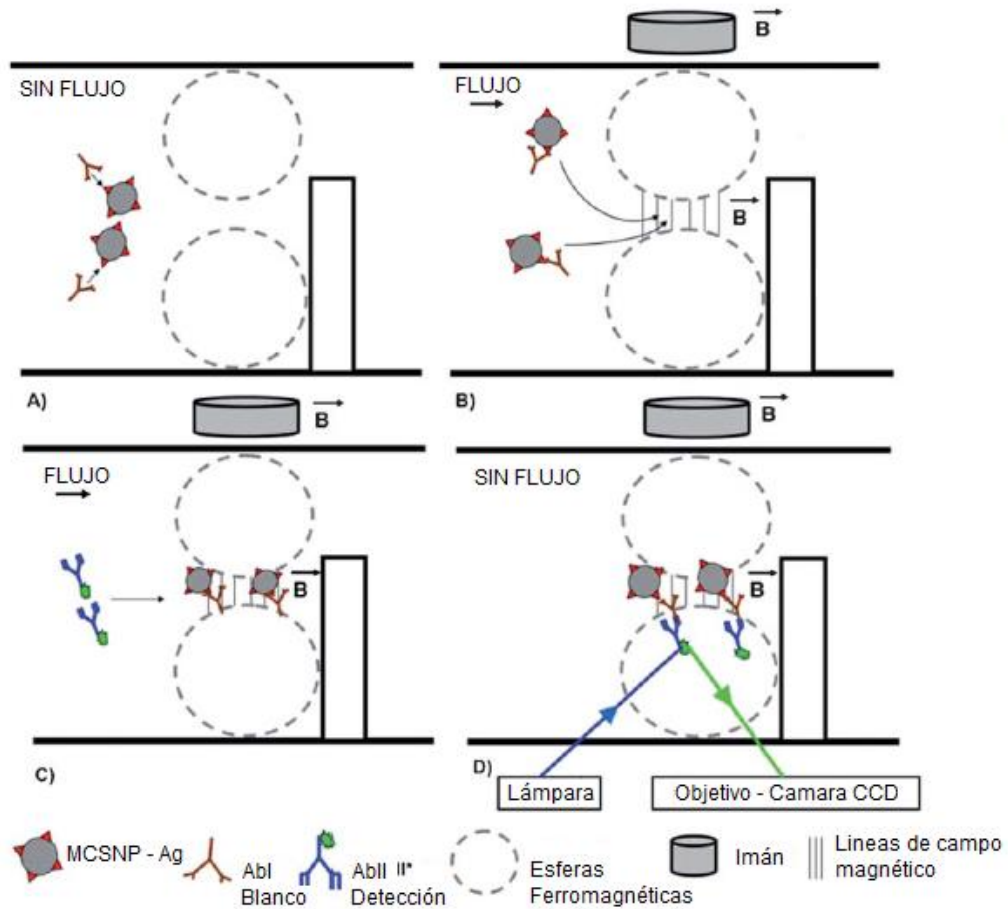


Fig. 1 Principio del inmunoensayo basado en nanopartículas (figura tomada de [18]).

En la figura 1 se muestra el principio de funcionamiento del inmunoensayo basado en nanopartículas, en un chip microfluídico. En (A) se realiza la captura del blanco Abl usando nanopartículas como inmunosoprote (MCSNP-Ag) en fase coloidal y sin flujo. Luego en (B) se aplica campo magnético mediante un imán permanente y flujo a  $30\mu\text{l/h}$ . Las nanopartículas magnéticas son capturadas y concentradas en la trampa magnética. En (C) se aplica el marcador fluorescente AbII a un flujo de  $30\mu\text{l/h}$  que interacciona con la molécula blanco preconcentrada Abl en fase heterogénea dentro de la trampa magnética. En el paso (D), AbII es excitada con luz y su señal fluorescente es captada mediante una cámara montada en un microscopio invertido.

Ventajas			
	ELISA	CHIP	Justificación
<b>Tiempo</b>	7.5 hrs	25 min	ELISA está limitada por difusión
<b>Sensibilidad</b>	30ng/ml	1ng/ml	CHIP MF con alta concentración de NP en trampa magnética
<b>Muestra</b>	200 $\mu$ l	5 $\mu$ l	Tamaño reducido del CHIP MF

Tabla 1. Ventajas de un inmunoensayo convencional vs nanopartículas como inmunosoporte [18].

### 1.6 Captura de nanopartículas magnéticas.

En el contexto de nanopartículas magnéticas como inmunosoporte, capturar nanopartículas es considerado un factor crucial. Las nanopartículas de núcleo magnético con tamaños de 30nm y una carga magnética del 10%, son usualmente muy pequeñas para ser capturadas usando solo imanes externos. Se han desarrollado diferentes estrategias para capturarlas, una estrategia consiste en integrar estructuras magnéticas dentro del microdispositivo, para incrementar localmente el campo magnético. Las estructuras magnéticas son formadas usualmente de materiales ferromagnéticos como el hierro [19], níquel [20] o permaloy [21]. Estos materiales generan un alto campo magnético cuando son expuestos a excitación magnética exterior, y exhiben un campo remanente bajo cuando el imán permanente o campo externo es removido.

En 2010 se reporta un trabajo en el cual se construye un sistema simple para capturar y liberar eficazmente nanopartículas [22].

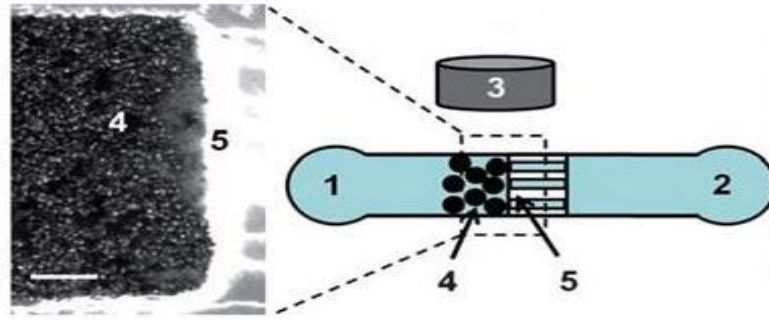


Fig. 2 Trampa magnética [22].

En la figura 2 se puede observar que el sistema se compone de una entrada (1), una salida (2), un lecho de micropartículas de metal (6-8  $\mu\text{m}$  de diámetro) empaquetadas dentro de un microcanal (4), el cual tiene una restricción física (5) que permite que este se forme. Estas partículas de alta permeabilidad magnética (hierro) son usadas para concentrar las líneas de campo provenientes de un imán permanente externo (3), las cuales forman pequeños dipolos que generan altos gradientes magnéticos locales. La trampa magnética creada ha sido caracterizada experimentalmente, por simulaciones numéricas e imágenes de fluorescencia. Las simulaciones numéricas se llevaron a cabo para mapear dos características: la densidad del campo magnético y la fuerza magnética sobre nanopartículas magnéticas. Ambas simulaciones mostraron que las nanopartículas son atrapadas preferentemente en los polos magnéticos de las micropartículas de hierro donde la fuerza magnética es tres órdenes de magnitud mayor que en un microcanal sin trampa magnética.

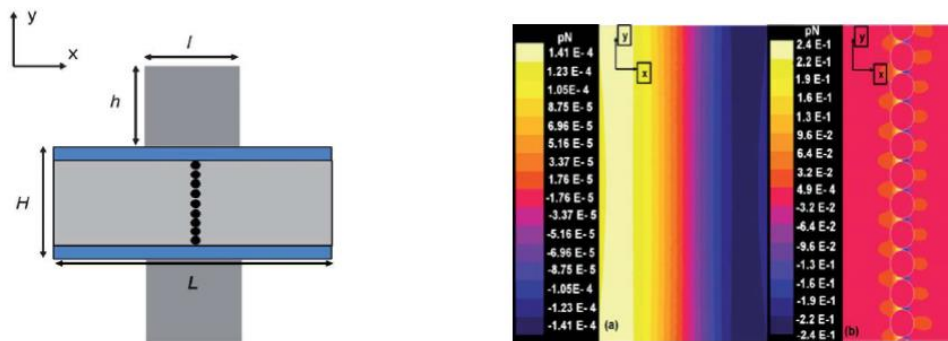


Fig. 3. Simulaciones numéricas de la trampa magnética [22].

En la figura 3(a) se muestra un esquema del sistema utilizado para las simulaciones numéricas. El sistema está compuesto por un microcanal (en gris claro), cerrado por sus lados (azul) y con dos imanes permanentes en posición perpendicular al canal (gris oscuro). Una columna de partículas de hierro es colocada entre los magnetos en dirección del eje  $y$ . En figura 3(b) se muestra una simulación donde se obtiene un mapeo de la fuerza magnética ( $F_{mag}$  en pN) en la componente  $x$  actuando en una nanopartícula de 30 nm. Se muestran dos situaciones: con y sin la columna de micropartículas. La dirección del vector  $F_{mag}$  en el eje  $x$  es indicado como positivo a la derecha y negativo a la izquierda. Se puede apreciar claramente que la mayor fuerza de atracción se encuentra en la unión de los pequeños dipolos creados por las micropartículas. La eficiencia de la trampa magnética fue experimentalmente determinada usando nanopartículas magnéticas fluorescentes (MCSNPs) a diferentes tasas de flujo. En la figura 4 se muestra un experimento de captura (a) y liberación (b) de nanopartículas (MCSNPs) en una cámara magnética de  $300 \times 200 \times 30 \mu\text{m}^3$  usando microscopia de fluorescencia. El flujo es constante a  $50 \mu\text{L/h}$  y la concentración de MCSNPs fue de  $6.2 \times 10^{13}$  MCSNPs/mL. Un pico en el gráfico de fluorescencia fue obtenido al retirar el imán y como consecuencia liberar las nanopartículas (c). Se observa que la captura de nanopartículas es muy rápida y eficaz.

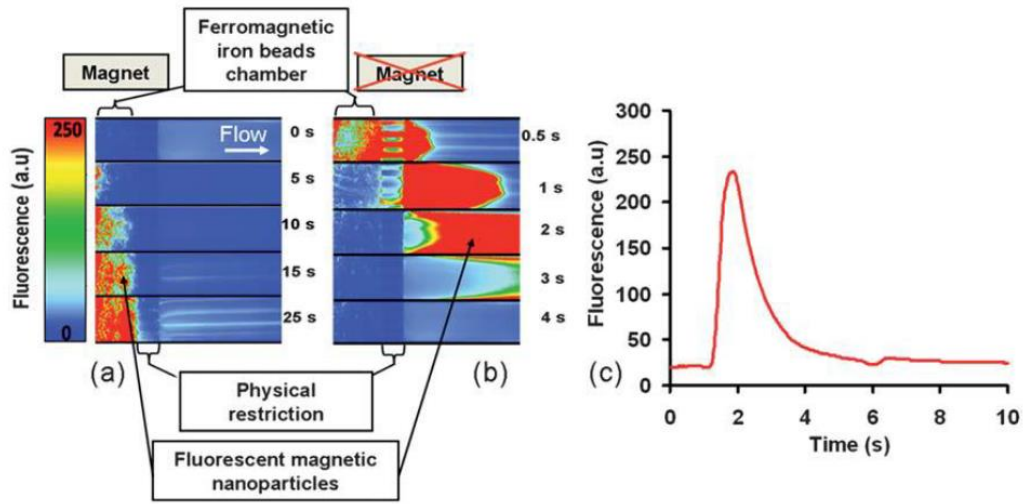


Fig. 4. Resultados experimentales de captura y liberación de MCSNPs [22].

### 1.7 Materia granular

Definición: La materia granular o materia granulada es aquella que está formada por un conjunto de partículas macroscópicas sólidas lo suficientemente grandes para que la principal fuerza de interacción entre ellas sea la de fricción. Colectivamente, este tipo de materia presenta propiedades que pueden semejar, dependiendo del tipo de fuerzas a las que esté sometida, a las del estado sólido, el estado líquido o un gas [23].

### 1.8 Variación de la densidad en materia granular.

Una de las características de la materia granular no-cohesiva es que puede ser compactada en un amplio rango de densidades [24]. Por ejemplo, un conglomerado estable de esferas mono-dispersas puede existir con una fracción de empaquetamiento  $\rho$  que va desde  $\rho=0.55$  hasta  $\rho=0.64$  para disposiciones desordenadas y  $\rho=0.74$  para un estado cristalino. El cambio en densidad del sistema es determinada por su estado inicial y por la manera en que es sacudida. Un arreglo experimental muy usual es agitar un contenedor

de partículas, el cual es colocado sobre un vibrador electromagnético que es controlado por medio de un amplificador y un generador de ondas. La compactación granular normalmente involucra la evolución desde un estado de compactación de baja densidad a uno con alta densidad pero se ha reportado que puede ser reversible [24].

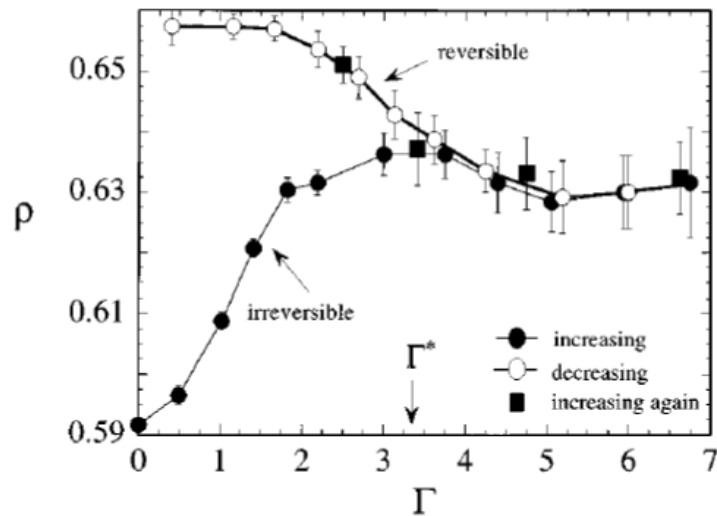


Fig. 5 Comportamiento de la densidad a diferente intensidad de vibración [24].

En el gráfico 5 podemos ver cómo varía la densidad de la materia granular al someterla a diferentes fuerzas de aceleración. Al inicio del experimento realizado por Nowak et al. [24], las esferas fueron dispuestas en una configuración de baja densidad. La intensidad de vibración fue parametrizada por  $\Gamma$ , la cual es la tasa de aceleración pico de un ciclo,  $A$ , sobre la gravedad,  $g$ .

$$\Gamma = A/g. \quad (1)$$

La intensidad de aceleración  $\Gamma$  fue lentamente incrementada y luego decrementada. A cada valor de  $\Gamma$  el sistema fue agitado  $10^5$  veces, después

se midió la densidad del sistema estático y  $\Gamma$  fue subsecuentemente incrementada un  $\Delta\Gamma = 0.5$ . Se puede observar que la rama superior tiene una alta densidad y es reversible a cambios en la intensidad de vibración  $\Gamma$ .

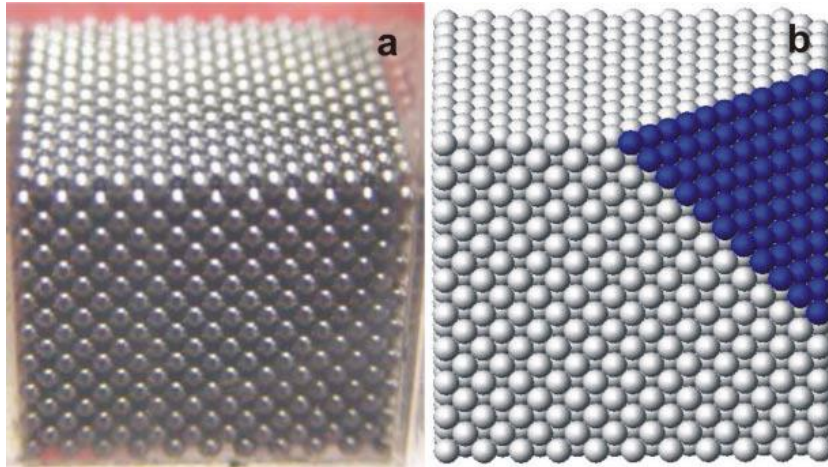


Fig. 6. (a) Estructura fcc obtenida por protocolo de cristalización usando balines de  $d=1.6\text{mm}$  en un contenedor cuadrado de  $24\text{mm}$ . (b) La misma estructura dibujada por computadora [25].

En la Figura 6 podemos ver imágenes del trabajo de Carvente y Ruiz [25] en el que además de controlar la compactación, logran ordenar de forma estructurada el aglomerado de partículas. Se reportan densidades de  $\rho=0.74$  la cual es la máxima para esferas del mismo tamaño. En la figura 7 se muestra el protocolo empleado para lograr el estado estructurado o cristalino en el cual podemos ver que a diferencia del trabajo de Nowark et al. [24] mostrado anteriormente, se maneja a  $\Gamma$  como un parámetro fijo. Para lograr esto se varía la amplitud y frecuencia de las vibraciones en forma inversa como función del tiempo [26].



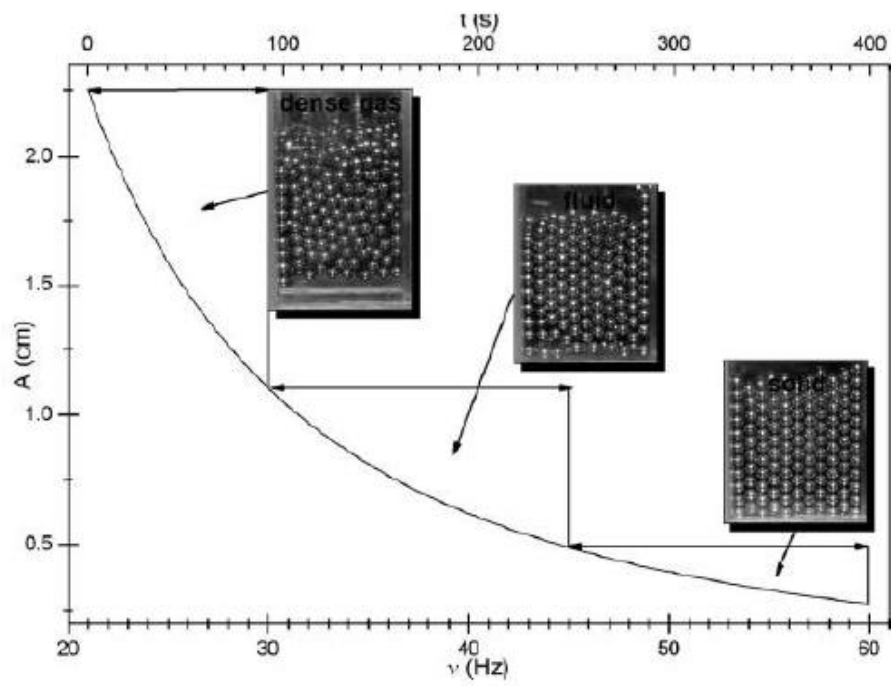


Fig. 7 Protocolo para la cristalización [26].

# CAPÍTULO 2

## Objetivo

Determinar protocolos de agitación que permitan la variación de la compactación de un conjunto de micropartículas dentro de una cámara microfluídica que de control para evaluar la eficiencia de un dispositivo de captura de nanopartículas magnéticas.

### 2.1 Objetivos particulares

- Obtener control de la compactación de partículas de hierro dentro del agua a escalas micrométricas
- Evaluar la capacidad de captura de nanopartículas magnéticas en función de la compactación de la trampa magnética.

### 2.2 Hipótesis

Es posible que el funcionamiento de dispositivos de diagnóstico basados en aglomerados granulares dentro de microcanales como el desarrollado por B. Teste et al. [22] dependa sensiblemente de las características del empaquetamiento granular, por lo que resulta relevante aplicar los conocimientos que se tiene sobre el comportamiento de sistemas granulares macroscópicos a este tipo de sistemas. De aquí surge la siguiente hipótesis:

La capacidad de captura de nanopartículas magnéticas de una trampa magnética microfluídica depende fuertemente del grado de compactación del arreglo poroso de micropartículas.

# CAPÍTULO 3

## Metodología

### 3.1 Síntesis de nanopartículas

Para poder realizar los experimentos de captura y liberación de nanopartículas magnéticas se procedió a sintetizarlas desde cero debido a la dificultad de encontrar nanopartículas comerciales con las características requeridas. Las propiedades que deben tener las nanopartículas son: estar compuestas por magnetita por su alta susceptibilidad magnética; ser coloidales; estar funcionalizadas con un recubrimiento con propiedades fluorescentes; y tener tamaño de entre 20 y 50 nanómetros.

El método empleado para la síntesis de las nanopartículas es el descrito por Massart [27]. En resumen, el método de síntesis es por co-precipitación de iones de  $Fe^{+2}$  y  $Fe^{+3}$  bajo condiciones alcalinas. Las nanopartículas son tratadas con ácido cítrico para hacerlas coloidales y estables en el agua. Por último las nanopartículas son recubiertas por sílice y FITC (fluoresceína-5-isotiocianato) mediante un proceso sol-gel.

#### 3.1.1 Metodología de síntesis de nanopartículas:

En un matraz de tres bocas de 500ml se agregan 380ml de agua milliQ y se sellan sus bocas. Después se le somete al vacío por 20 min para desgasificar y eliminar el oxígeno disuelto en el agua. Se agrega 5.22g de sal de  $FeCl_3$  (Iron (III) chloride hexahydrate 99% sigma-aldrich cat:31232) y 2.08g de sal de  $FeCl_2$  (Iron (II) chloride tetrahydrate 99% sigma-aldrich cat:44939) y se agitan en parrilla magnética a temperatura ambiente durante 5 min bajo atmósfera de nitrógeno. Con ayuda de una jeringa se inyecta lo más rápido posible 20ml de

hidróxido de amonio ( $\text{NH}_3$  28-30% sigma-aldrich cat:320145) y se deja agitando en parrilla magnética a temperatura ambiente durante 5 min. Se agregan 40ml 2M de ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$  99% sigma-aldrich cat:C0759) y se agita en parrilla magnética a temperatura ambiente durante 5 min. Con ayuda de un imán de neodimio se precipitan las nanopartículas y se remueve el sobrenadante que debe de tener una apariencia clara. Se agrega la misma cantidad de agua milliQ retirada en el paso anterior y se precipita magnéticamente de nuevo la mezcla para retirar el sobrenadante. Se recupera el agua y se sonica 20min con punta ultrasónica al 70% (Qsonica, Q500). Posteriormente se deja precipitar a las partículas grandes por gravedad 24 horas y se recupera sobrenadante con nanopartículas.

### 3.1.2 Funcionalización de nanopartículas

Una vez sintetizadas las nanopartículas es de nuestro interés poder darle propiedades de fluorescencia para así poder detectarlas en nuestros experimentos. El método empleado para esto se basa en la hidrólisis y condensación de tetraethyl orthosilicate (TEOS) mediante un proceso sol-gel [28]. Este método permite recubrir las nanopartículas con una mono capa muy uniforme de sílice. El espesor de esa capa puede ser controlada entre 2nm hasta 100nm simplemente cambiando la concentración del precursor (TEOS). Tintas fluorescentes pueden ser incorporadas dentro de esta capa a través de acoplamiento covalente entre estas tintas orgánicas y el precursor. Se ha demostrado que un recubrimiento de material inerte tal como la sílice en nanopartículas de óxido de hierro puede ayudar a prevenir su agregación y mejora su estabilidad química [29]. Otra ventaja de un recubrimiento de sílice es que la superficie es a menudo terminada por un grupo silanol, que puede reaccionar con varios agentes de acoplamiento para unir covalentemente ligandos específicos a estas nanopartículas magnéticas [30]. Tal capacidad abre la posibilidad al diseño y síntesis de acarreadores magnéticos que

pueden ser usados para distribuir ligandos específicos a órganos blanco vía reconocimiento antígeno-anticuerpo.

### 3.1.3 Metodología para la funcionalización de las nanopartículas.

Una vez sintetizadas las nanopartículas, tal como fue descrito en párrafos anteriores, es necesario hacerlas fluorescentes aplicando lo siguiente:

A 20ml de etanol absoluto (sigma-aldrich 99.5% cat:459844) se le agregan 3ml de agua milliQ y 0.5ml de Hidróxido de amonio ( $\text{NH}_3$  28-30% sigma-aldrich cat:320145). Se agita en parrilla magnética durante 5 min a temperatura ambiente y se agrega 40 $\mu\text{l}$  de TEOS (Tetraethyl orthosilicate 99% sigma-aldrich cat:86578), 20 $\mu\text{l}$  de complejo FITC-APTES (Fluorescein isothiocyanate- 3-Aminopropyltriethoxysilane) y 1ml de nanopartículas. Se deja agitando en parrilla magnética a temperatura ambiente durante una hora bajo protección contra luz.

Para preparar el complejo FITC-APTES se mezclan 72 $\mu\text{l}$  de APTES (Aminopropyltriethoxysilane 98% sigma-aldrich cat:A3648) y 5.25 mg de FITC (Fluorescein isothiocyanate isomer I cat:F7250) en 1ml de etanol absoluto (sigma-aldrich 99.5% cat:459844) previamente desgasificado, se agita en parrilla magnética a temperatura ambiente durante 12 horas bajo atmósfera de nitrógeno y protección contra la luz.

### 3.1.4 Caracterización de nanopartículas

Se tomó una muestra de nanopartículas y se envió al CIMAV para su caracterización por dispersión dinámica de luz. Los tamaños varían entre 30nm y 100nm con una media de 57nm. El tamaño es bueno para los experimentos a realizar porque son comparables con las de Teste et al. [22].

## 3.2 Fabricación del canal microfluídico

### 3.2.1 El PMMA como material de fabricación

En la mayoría de los últimos reportes en los que se fabrican chips microfluídicos, estos son creados a partir de sustratos de silicona o vidrio mediante técnicas de fotolitografía [31]. Sin embargo, estas aplicaciones son limitadas por su costoso, peligroso y complejo proceso de fabricación, además de las limitaciones en las geometrías de las estructuras microfluídicas. Por esta última desventaja mencionada anteriormente, es que se decidió la fabricación del canal microfluídico a partir de un polímero (PMMA), pero hay otras ventajas como el bajo costo, es más fácil de manipular, tiene atractivas propiedades mecánicas y químicas, es biocompatible y es muy rápido crear prototipos [32,33].

### 3.2.2 Técnica de fabricación por micromaquinado.

La técnica empleada para fabricar los canales microfluídicos, es por medio de micro maquinado. Esta técnica es del tipo sustractivo, esto significa que, las estructuras a microescala se construyen a partir de una placa lisa de PMMA (polimetilmetacrilato, acrílico común). La maquina remueve material con ayuda de una broca muy fina que se manipula con mucha precisión. La máquina CNC empleada fue una ROLAND MDX-40A. En la figura 8 se muestran algunas características de la fresadora CNC.



### Fresadora para Escritorio MDX-40A

- ▶ Máquina CNC de escritorio para prototipado rápido
- ▶ 4-ejes, fresado desatendido
- ▶ Maneja una amplia variedad de materiales
- ▶ Genera una superficie un acabado liso
- ▶ Compatible con el Código G
- ▶ Máxima área de trabajo: 305 mm [12 plg] (eje X) por 305 mm [12 plg] (eje Y) por 104 mm [4,1 plg] (eje Z) sin eje rotatorio

Fig. 8 Fresadora Roland MDX-40A.

La materia prima para la fabricación de los chips son hojas de acrílico de un espesor de 1.5mm (PMMA, polimetilmetacrilato).

Las brocas utilizadas en la fresadora para realizar el desbaste de material son del tipo endmill de 200 $\mu$ m de diámetro. En la figura 9 se muestra la forma de la punta de la broca.

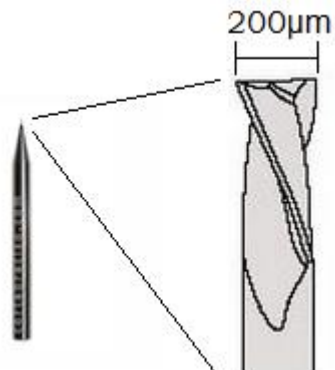


Fig. 9. Forma de la broca.

La estructura deseada en la parte central del canal, es esquematiza en la figura 10. Es necesaria una restricción física que impida el paso de las micropartículas. Esta restricción debe dejar una luz de  $5\mu\text{m}$  de separación, ya que, las partículas manejadas son de un tamaño de  $6-8\mu\text{m}$  y no deben fluir por ahí. Es de especial interés la precisión de la restricción; una restricción defectuosa por solo  $\pm 2$  micras hará que las micropartículas se escapen, o en caso contrario, que se tape el flujo del líquido empleado. En ambos casos el chip quedará inservible.

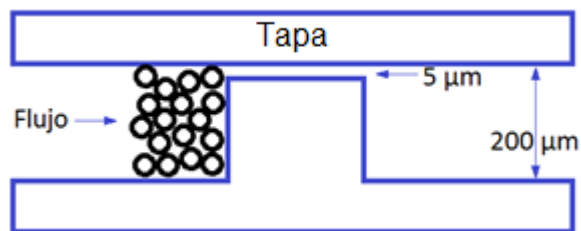


Fig. 10 Estructura central del microcanal.

La máquina fresadora CNC funciona a base de motores paso-paso, que por medio de mecanismos mueven la broca con mucha precisión, pero un paso del motor que mueve la broca en el eje Z, equivale a  $10\mu\text{m}$  de recorrido en este eje. Esto impide poder maquinar la restricción de  $5\mu\text{m}$ . La solución de este problema fue colocar un microposicionador para manipular el eje Z con más precisión. El dispositivo empleado para el microposicionamiento en Z es un *compact lab Jack* de thorlabs modelo LJ750. En la figura 11 podemos ver el dispositivo y sus características. Este dispositivo se fijó a la plataforma de trabajo de la máquina CNC con ayuda de silicón fundido.





- Alta estabilidad
- Rango de ajuste vertical de 1''
- 90 kg de capacidad de carga estático o activo
- Actuador graduado a 10 $\mu$ m
- La plataforma superior puede ser rotada 360°

Fig. 11 Microposicionador en eje Z LJ750.

El software empleado para dibujar las estructuras del microdispositivo es el incluido con la maquina CNC, en la figura 12 se muestra una captura de pantalla del software Dr. Engrave.

Una vez dominado el software, se dibujó el canal microfluídico mostrado en la figura 12.

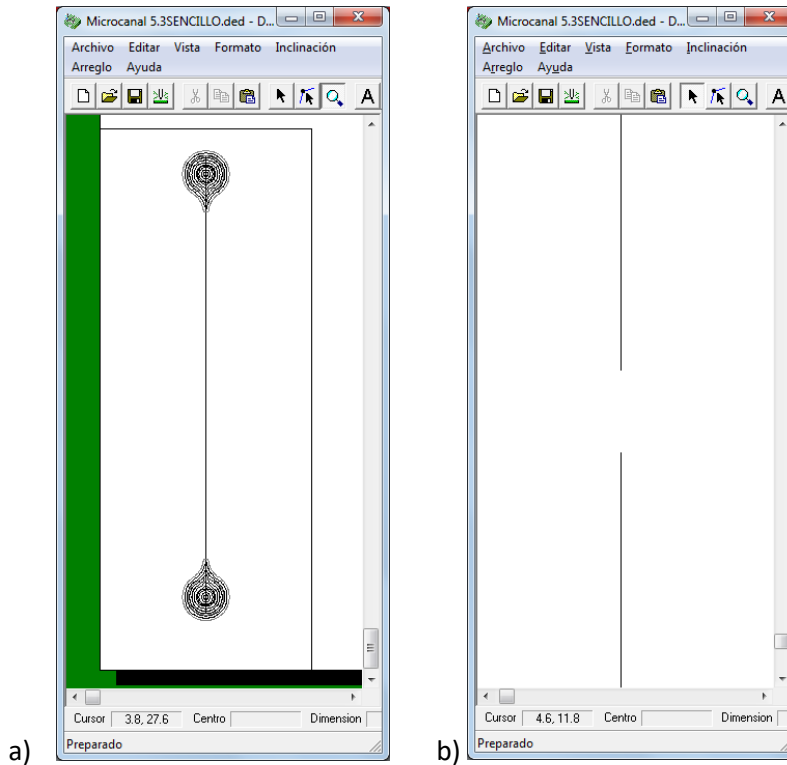


Fig. 12 a) Dibujo del canal en el software Dr. Engrave. b) Acercamiento en la parte central del canal.

En la figura 12 (b) se puede observar como está dibujado el canal microfluídico. Nótese que en la parte central hay una discontinuidad en el canal que corresponde a la restricción física que maquinaremos de forma manual por motivos descritos anteriormente.

### 3.2.3 Metodología de fabricación

Los pasos detallados para la fabricación de un chip microfluídico se enumeran a continuación.

1. Se corta de la hoja grande de acrílico un cuadrado de 10cm x 10cm y se fija en la plataforma de trabajo de la fresadora con ayuda de cinta masking tape.

2. Una vez que la fresadora está encendida y conectada, se procede a colocar una broca endmill de 0.8mm, después se ajustan los ejes X, Y y Z a su respectivo punto cero. El cero corresponde a la punta de la broca situada en la parte inferior izquierda (vista desde arriba) del cuadro de acrílico fijado en el paso anterior, y en la superficie. En la figura 13 podemos ver la disposición de los ejes X, Y, y Z. El eje X y Z se calibran de forma manual, mientras que, para el eje Z se utiliza un sensor de contacto que evita complicaciones y posible ruptura de brocas.

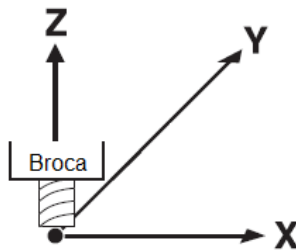


Fig. 13 Ejes de la fresadora.

3. Se abre el programa Dr. Engrave y el archivo correspondiente al corte de pequeños rectángulos de 9mm x 23mm de medida.

4. Una vez obtenidos los rectángulos se limpia la plataforma de trabajo y se fija el microposicionador de eje Z descrito anteriormente.

5. Se calibra el microposicionador de eje Z a cero. Se fija un rectángulo de los cortados con anterioridad a la plataforma del microposicionador. Se coloca la broca endmill de 200 $\mu$ m. Se calibran nuevamente los ejes X, Y y Z de la maquina al punto cero correspondiente al rectángulo fijado en este mismo párrafo.

6. Con la broca situada en el punto cero se procede por medio del panel de control virtual a encender el motor de la broca y hacerla girar a una velocidad

de 11000 rpm, luego bajar la broca sobre el eje Z una distancia de 200 $\mu$ , apagar el motor de la broca y no mover. Estos pasos anteriores provocaran que la broca penetre en el material sobre el que estamos trabajando y se quede ahí.

7. Con ayuda de código G (lenguaje de programación para control numérico CNC), se hace un programa que realice en barrido sobre toda la superficie que permitirá rectificar y obtener un nuevo punto cero. Es necesario hacer esto, ya que usar el sensor de contacto, como normalmente se hace, no tiene la precisión suficiente.

8. En este punto se maquinará la restricción a 5 $\mu$ m. Continuando desde el punto anterior, sin mover el eje Z correspondiente a la superficie rectificada al nuevo punto cero, se procede a colocar la broca en la posición central del rectángulo aún fijo (se posiciona manualmente manipulando solo X y Y). Con ayuda del microposicionador se eleva la plataforma en 5 $\mu$ . De manera manual en el panel de control virtual de la maquina se enciende el motor de la broca y se la recorre 350 $\mu$ m en el eje Y. Con estos pasos obtenemos solo la restricción con una altura de 5 $\mu$ m.

9. Como último paso se maquina el resto del canal que tendrá una profundidad de 200 $\mu$ m. Este proceso es automatizado, se realiza con el software Dr. Engrave y su dibujo correspondiente visto en la figura 12. En la figura 14 se aprecia el aspecto final del chip maquinado.

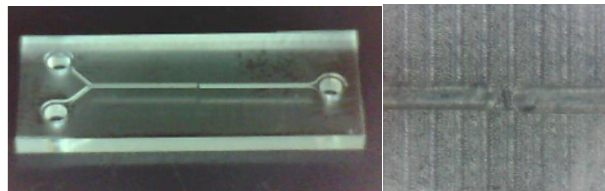


Fig. 14 Maquinado del chip microfluídico

### 3.2.4 Sellado del canal microfluídico compuesto por PMMA.

Los microcanales, los cuales están abiertos después de su fabricación, tienen que ser cerrados sin modificar sus propiedades físicas o alterar sus dimensiones. Es de nuestro interés aplicar una técnica de sellado que no deforme demasiado el microcanal, que además, soporte la presión que se generará dentro de este, ya que habrá una restricción y un medio poroso que se opondrán al flujo. Se han desarrollado varias técnicas para el sellado de chips de PMMA [34]. A continuación se mencionan las técnicas encontradas y probadas para sellar el microcanal construido en este trabajo:

- a) Termo sellado [34]: El canal de PMMA es encerrado con su respectiva tapa del mismo material, luego es calentado por arriba de su temperatura de transición vítrea ( $105^{\circ}\text{C}$  para el PMMA) en un horno de convección aplicando presión positiva entre ambas placas mediante una prensa o pinzas. La desventaja de este método, es que variaciones pequeñas en la temperatura o presión de la prensa causan deformación en el microcanal que producen baja reproducibilidad. Para este trabajo este método no dio buenos resultados, ya que el sellado es fuerte, pero el microcanal se deforma demasiado y dada la precisión requerida en la parte central del micro dispositivo no fue posible continuar con su uso.
- b) Termo sellado con agua [34]: El método es similar al anterior, la diferencia está en que el sellado se efectúa en agua hirviendo en vez del horno de convección. Este método aprovecha la propiedad del agua de mantenerse a una temperatura constante de  $100^{\circ}\text{C}$  al estar hirviendo. Esta temperatura está por debajo de la temperatura de transición vítrea del PMMA por lo que es poca la deformación observada en los microcanales, las desventajas son que, la fuerza del sello es bastante débil y permanecen entre las placas muchas burbujas.
- c) Sellado con ayuda de vacío [34]: El canal de PMMA es encerrado con su respectiva tapa del mismo material, luego es calentado a  $100^{\circ}\text{C}$ , (debajo de la temperatura de transición vítrea para el PMMA  $105^{\circ}\text{C}$ ) en

un horno de convección y al vacío, aplicando presión positiva entre ambas placas mediante una prensa o pinzas. Este método resultó mejor que los anteriores, ya que el microcanal no se deformó y se logró realizar algunos experimentos con los chips terminados. La desventaja encontrada de este método es que, a pesar de la baja deformación, la fuerza del sello no es lo suficientemente resistente y usualmente el micro dispositivo terminaba abriéndose en medio del experimento.

- d) Sellado asistido por solventes [35]: El solvente utilizado para este método está compuesto por 47.5% DMSO, 5% metanol y 47.5% de agua milliQ. Se agregan 5 gotas de solvente sobre la cara que se va a sellar, luego el canal de PMMA es encerrado con su respectiva tapa del mismo material y se calienta a 85° en un horno de convección aplicando presión positiva entre ambas placas mediante una prensa o pinzas. Como resultado de la baja temperatura empleada la deformación es mínima, el sellado es de mejor calidad (sin burbujas entre las placas), pero la fuerza del sello es similar a la del método anterior.

A causa de la naturaleza del medio poroso con el que está construida la trampa de nanopartículas en el microcanal, es necesario un sellado muy fuerte que resista la presión alcanzada, y que además no deforme el microcanal. De los métodos encontrados en la literatura, ninguno por sí solo, cumple con las necesidades. El método que se utilizó y que cumple con las especificaciones requeridas, es una combinación de los métodos descritos anteriormente pero añadiendo que una de las caras a sellar es previamente rectificadas, pasando de una superficie lisa a una rugosa. Esta rugosidad ayuda notablemente a la fuerza del sello sin tener que sobrepasar la temperatura de transición vítrea y por consiguiente sin deformar el microcanal.

### 3.2.5 Metodología para el sellado

Los pasos detallados para el sellado de un chip microfluídico son los siguientes: Una vez maquinado el microcanal y rectificadas una de las superficies a unir, se agregan 4 gotas de solvente compuesto por 47.5% DMSO (Dimethyl sulfoxide sigma-aldrich cat:d4540), 5% metanol (99.8%) y 47.5% de agua milliQ a una de las caras y se unen alineándolas manualmente. Se colocan las piezas dentro de una prensa fabricada con resortes bajo una presión de 200 g/cm<sup>2</sup>. Después se coloca todo dentro de 500ml de agua hirviendo y se deja durante 10 min. Se retira el dispositivo del agua y se deja enfriar a temperatura ambiente. Se retira el microdispositivo de la prensa y se examina visualmente con ayuda de un microscopio.

### 3.3 Metodología de los experimentos de captura y liberación de nanopartículas magnéticas fluorescentes.

En esta parte se describe como se realizaron los experimentos de captura y liberación de nanopartículas. En pocas palabras se desea cuantificar la cantidad de nanopartículas magnéticas que pueden ser atrapadas en una trampa magnética formada por micropartículas ferromagnéticas. Es de interés variar de forma controlada la compactación de las micropartículas ferromagnéticas, y así obtener el número de nanopartículas capturadas, contra diferentes tasas de compactación.

#### 3.3.1 Arreglo experimental para el control de la tasa de compactación.

Una vez que se tiene maquinado y sellado el canal microfluídico, es necesario montarlo en el arreglo experimental que permitirá, en esta parte del trabajo, variar de forma controlada la tasa de compactación.

La tasa de compactación es un número adimensional que relaciona el volumen de las partículas entre el volumen total aparente (el volumen aparente es el volumen de las partículas + el volumen de los espacios vacíos).

$$\rho = \frac{V_{\text{partículas}}}{V_{\text{aparente}}} \quad (2)$$

El modo de variar la tasa de compactación es por medio de vibraciones verticales de intensidad controlada. En la figura 15 se muestra el arreglo final del dispositivo agitador.

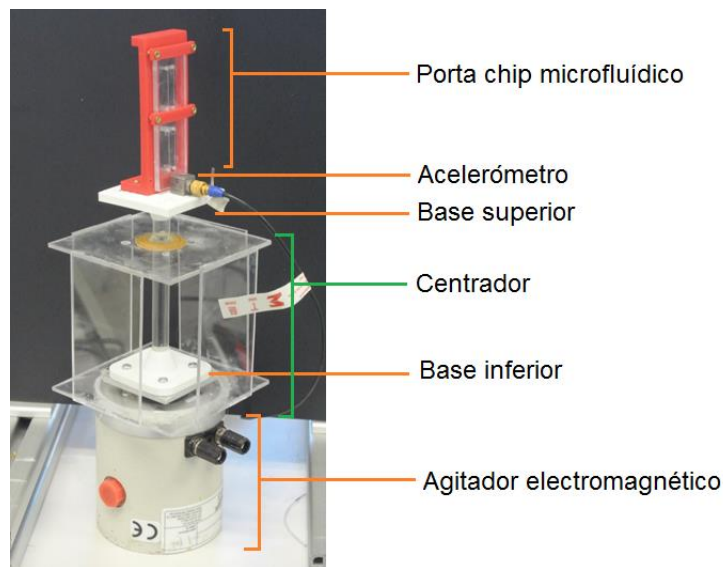


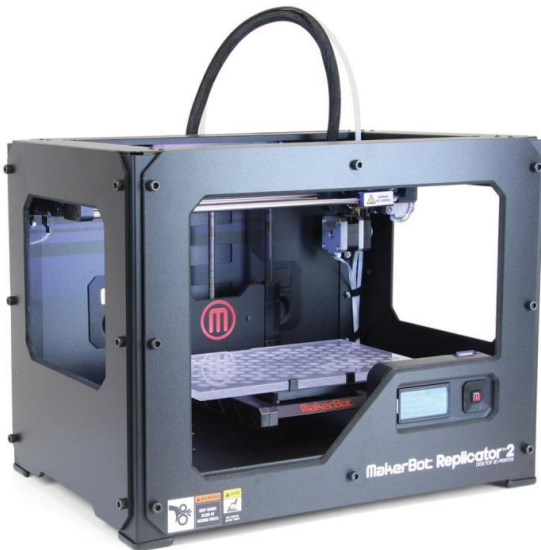
Fig. 15 Arreglo experimental final.

El dispositivo mostrado en la figura 15 es el obtenido después de algunas mejoras. Por ejemplo, se colocó un sistema para poner y quitar fácilmente los dispositivos microfluídicos (porta chips), se separó 15cm el porta chips del



vibrador por interferencias magnéticas de este y se instaló un centrador para evitar vibraciones horizontales.

Para fabricar las piezas necesarias se utilizó una impresora 3D del tipo aditivo, la cual fabrica piezas a partir del fundido de plástico. En la figura 16 se muestra la impresora 3D Makerbot Replicator2 y algunas de sus características.



Modelado por depositado fundido.

Área de trabajo: 28.5L X 15.3W X 15.5H cm.

Resolución de las capas: 100 Micras

Precisión posicionado: XY: 11 $\mu$ m Z: 2.5 $\mu$ m

Diámetro del filamento: 1.75 mm

Diámetro de la boquilla: 0.4 mm

Fig. 16 Impresora 3D Makerbot Replicator2

Los diseños se realizaron en AutoCAD para luego ser impresos en plástico. En la figura 17 se muestran los diseños para las bases y para el porta chips.

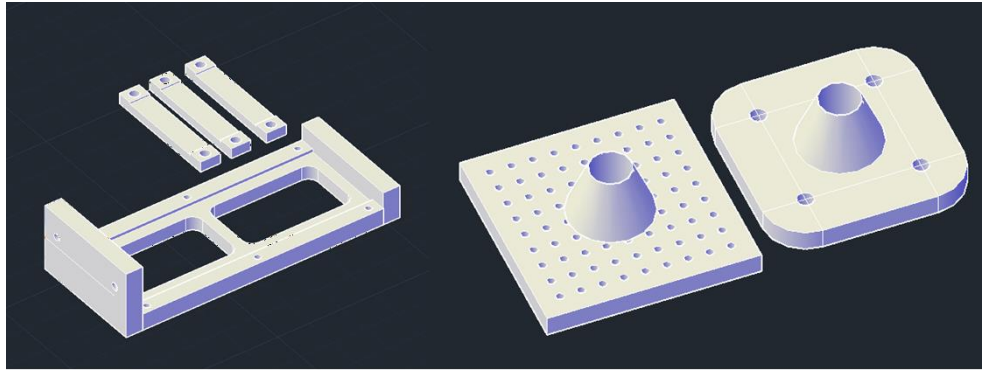


Fig.17 Diseños para la impresora 3D hechos en AutoCAD.

El vibrador electromagnético, que es de las partes más importantes de este arreglo experimental, debe ser alimentado con señales eléctricas de alta potencia y del tipo senoidales. Para esta tarea son necesarias dos etapas: una de generación de la señal y una de amplificación de la señal.

La generación de señales senoidales es de especial interés, ya que por medio de las características de esta, es que podremos controlar la tasa de compactación de la trampa de micropartículas. Para implementar lo anterior se adquirió una plataforma de prototipos y diseño de National Instruments. El sistema llamado NI ELVIS II (Fig. 18) es basado en el sistema gráfico de diseño de software de LabVIEW. El NI ELVIS II incluye 12 instrumentos de laboratorio más usados incluyendo osciloscopio, DMM, generador de funciones, fuente de alimentación variable, analizador de señal dinámica (DSA), analizador de bode, analizador de corriente-voltaje de 2 cables y 3 cables, generador de forma de onda arbitraria, lector/escritor digital y analizador de impedancia. Es de especial interés en este proyecto usar el osciloscopio para analizar las señales del acelerómetro y el generador de funciones para generar las señales senoidales.

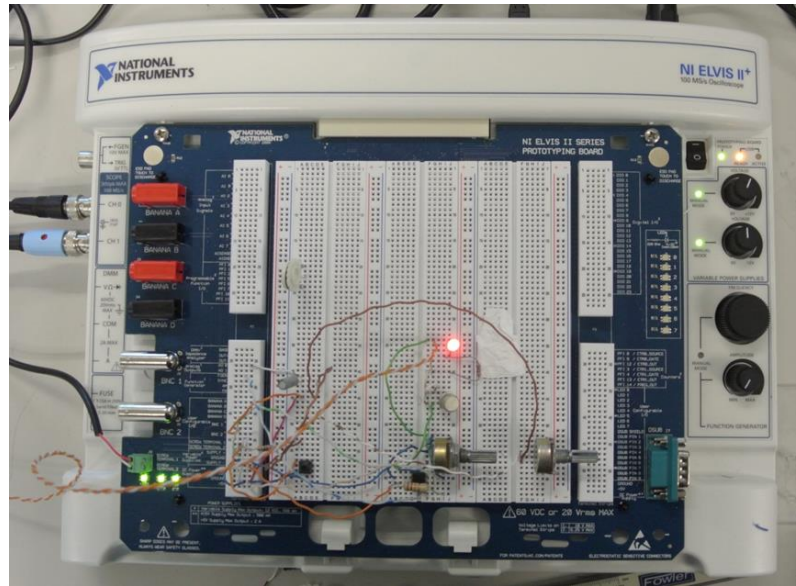


Fig. 18 Sistema NI ELVIS II.

Una de las ventajas de estos instrumentos de NI es que son virtuales y pueden ser programados y personalizados a las necesidades de la aplicación. Para realizar esto es necesario el LabVIEW, que es una herramienta de programación gráfica para el desarrollo de sistemas.

En la figura 19 se muestra la versión final del instrumento virtual y sus componentes desarrollados como parte de esta tesis.

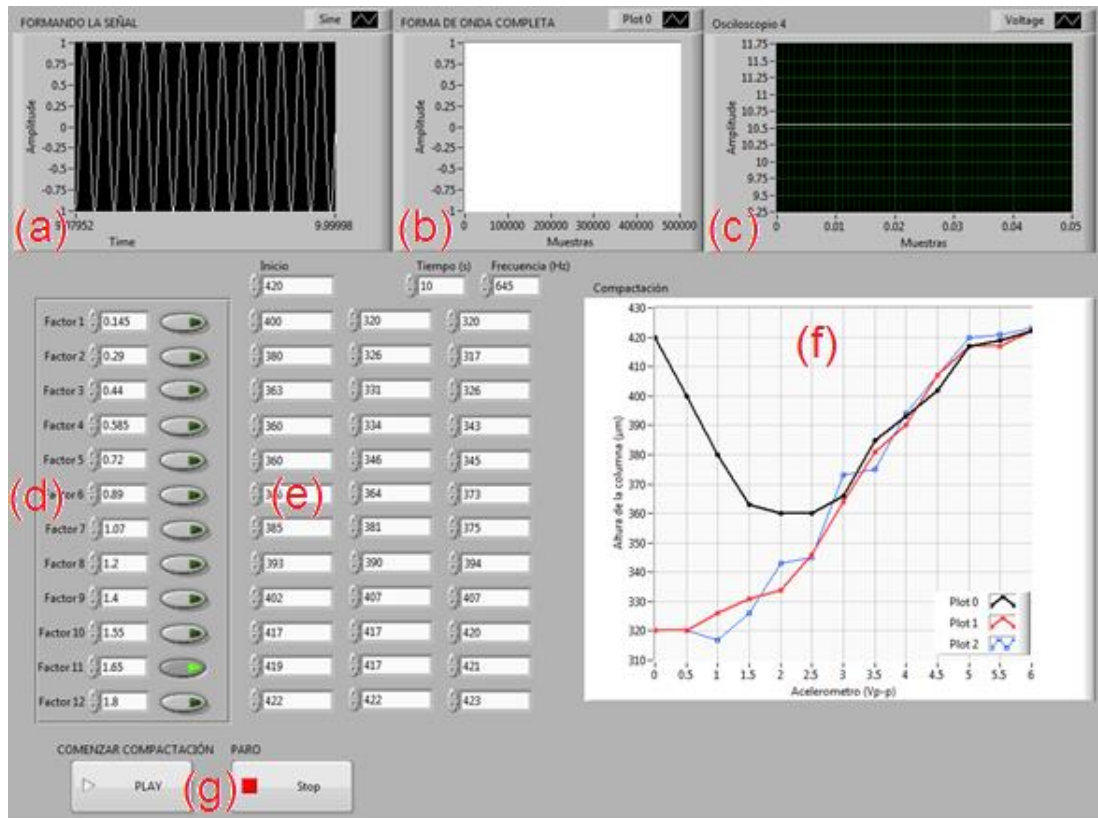


Fig. 19 Instrumento virtual programado con LabVIEW

A continuación se describen las partes del instrumento virtual mostradas en la figura 19 (a-g):

(a). En esta parte se observa la construcción dinámica de la señal una vez que es ejecutado el instrumento virtual con las características dadas por las casillas tiempo y frecuencia.

(b). En este graficador se muestra la señal completa una vez que es terminada de construir. Se observa totalmente blanco porque la señal completa esta graficada en un espacio muy reducido.

(c). Esta sección muestra en tiempo real la señal del acelerómetro conectado al osciloscopio.

(d). En esta sección se pueden configurar doce factores de amplificación, o ganancia, que nos dará la posibilidad de tener doce posibles intensidades de vibración para los experimentos. Estos valores son calibrados previamente a partir de la intensidad de vibración registrada por el acelerómetro y es necesario ajustarlas de una en una para tener las intensidades deseadas. Una vez calibrados, se puede seleccionar una intensidad según corra el experimento, por medio del botón de selección.

(e). En estas tres columnas se introducen los valores obtenidos de las mediciones de alturas obtenidas a lo largo de un experimento.

(f). Aquí son graficados los datos introducidos en (e)

(g). se reproduce una iteración experimental con duración dada por la casilla tiempo e intensidad dada por el factor de intensidad seleccionado en (d)

Como había mencionado anteriormente es necesaria una etapa de potencia que amplifique la señal proveniente del generador de funciones. Para esta etapa fue necesaria la construcción de un amplificador de potencia que se adaptara a nuestras necesidades. Con esto en mente se decidió construir uno a partir de un circuito integrado LM12CLK de Texas Instruments. En la Figura 20 podemos ver el diagrama de aplicación y conexiones.



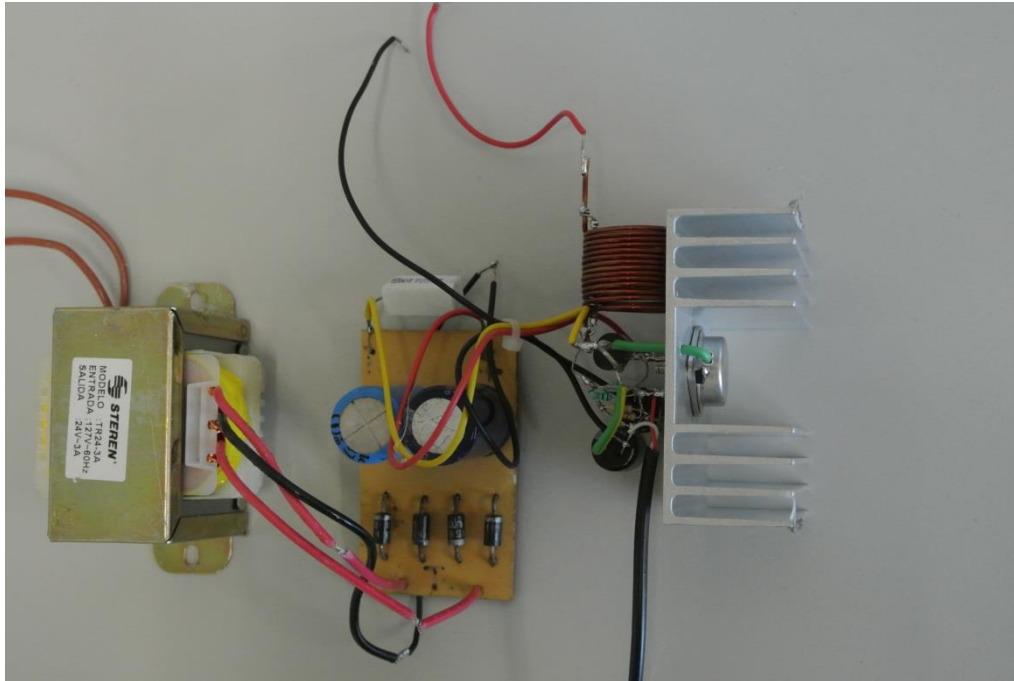


Fig. 21 Amplificador de instrumentación.

### 3.3.1.1 Arreglo para la visualización y medición de la tasa de compactación, de la trampa de micropartículas.

Dadas las dimensiones del canal microfluídico y de las micropartículas, es necesario un sistema de visualización microscópico. Es de interés que este sistema tenga propiedades de buena resolución y poder de aumento. En un primer intento se realizaron mediciones con un microscopio digital con conexión a la PC por USB. En la figura 22 podemos observar el arreglo que se implementó con este microscopio USB.

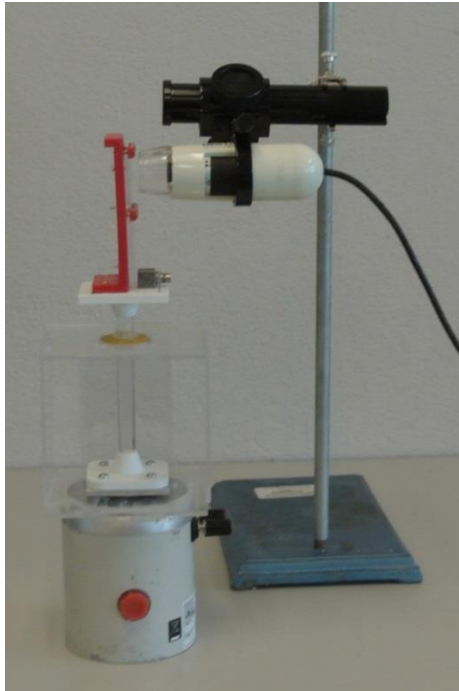


Fig. 22 Arreglo con microscopio USB.

El arreglo con el microscopio USB trabajó bien y hasta se realizaron algunos experimentos, pero se presentaron algunos problemas. El microscopio USB no tenía suficiente poder de aumento y no se podía apreciar el movimiento de las micropartículas, de modo que solo se veía una mancha que se expandía o compactaba. En la figura 23 observamos algunas imágenes tomadas con este sistema.



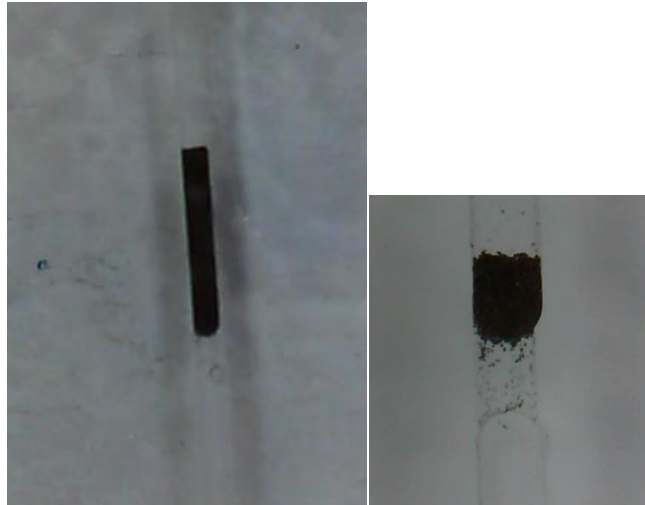


Fig. 23 Imágenes tomadas con microscopio USB.

Para obtener mejores imágenes, y por lo tanto mejores mediciones, fue necesario adaptar un microscopio óptico del tipo invertido. A causa de que el chip microfluídico tiene que mantenerse en posición vertical, fue necesario rotar el microscopio óptico  $90^\circ$ . Se construyó una base con perfiles de aluminio a medida y después se atornilló al microscopio. En la figura 24 podemos ver cómo quedó el microscopio vertical.

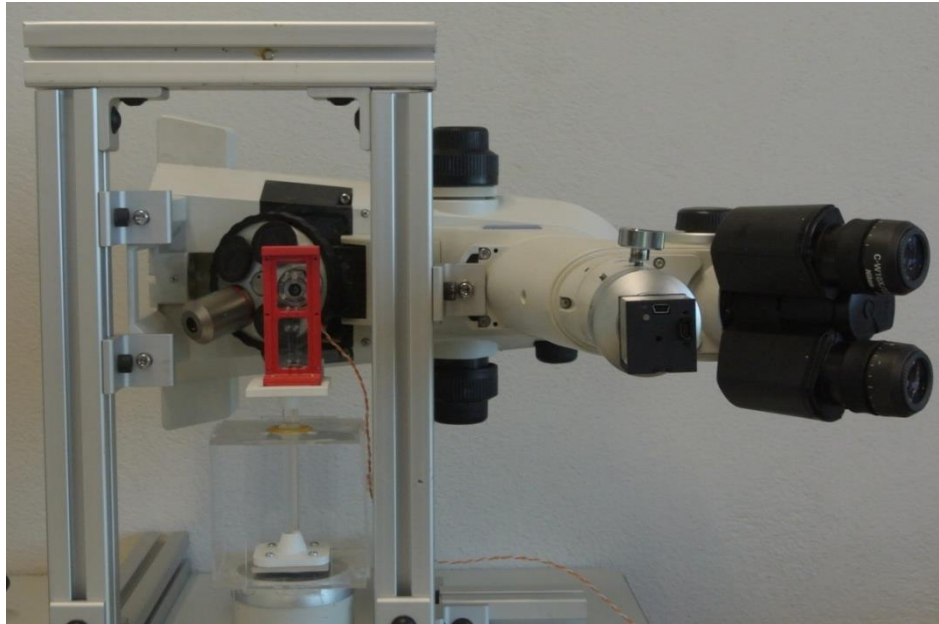


Fig. 24 Microscopio óptico vertical.

Para obtener las imágenes deseadas, se desinstaló la lámpara propia del microscopio y se implementó un sistema de iluminación por reflexión. Como fuente de luz se optó por LEDs blancos de 3mm de diámetro. En la figura 25 podemos ver como se instalaron los LEDs sobre uno de los objetivos del microscopio.

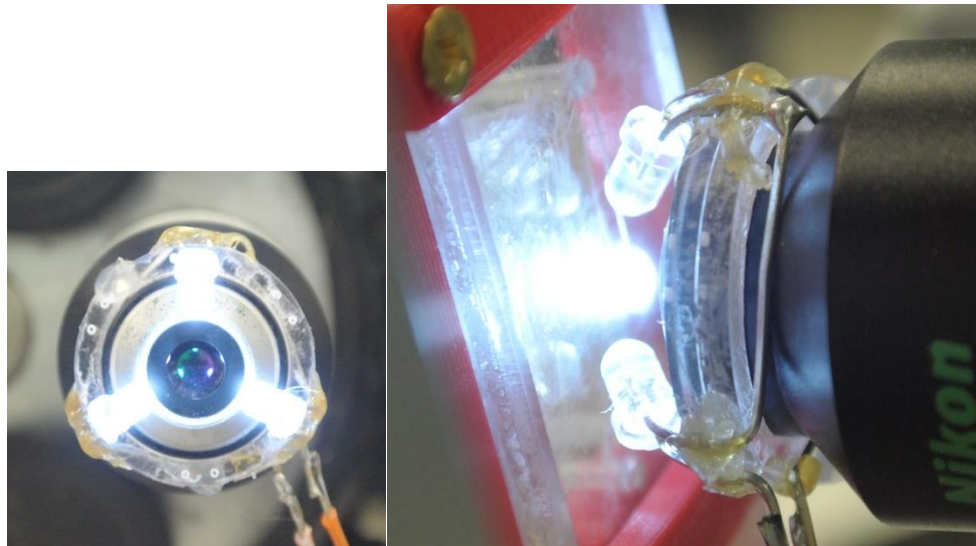


Fig. 25 LED como fuente de iluminación.

Se instaló una cámara marca IDS modelo UI-2230SE a colores de 1024x768 pixeles de resolución en el microscopio óptico con un objetivo de 20X y se obtuvieron las imágenes como la mostrada en la figura 26. Las imágenes, a comparación del sistema anterior, son de mejor calidad, resolución y aumento.

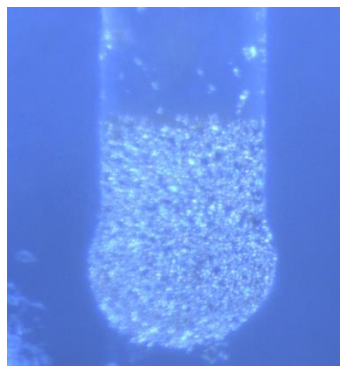


Fig. 26 Imágenes con microscopio vertical.

Una vez obtenidas las imágenes, se echó mano del software propio de la cámara digital para medir, en pixeles, la altura de la cama de micropartículas.

Observando el ancho del canal ( $200\mu\text{m}$ ) podemos obtener una relación pixeles-micras y de esta manera cambiar las mediciones a micrómetros.

### 3.3.1.2 Desarrollo de los experimentos de control de la tasa de compactación.

A continuación se detallan cada uno de los pasos realizados para obtener el control de la tasa de compactación en función de la intensidad de vibración.

Para obtener un punto del gráfico es necesario aplicar lo siguiente:

1. Llenado de fluido: El canal microfluídico se llena de agua milliQ. Se elimina cualquier burbuja de aire dentro del canal.
2. Se vierten las partículas dentro del canal: con ayuda de una jeringa, y usándola como minicuchara, se toman micropartículas y luego se colocan en el chip microfluídico. Es poco el control que se tiene sobre cuantas micropartículas hay dentro del canal, por esto, es importante usar el mismo chip para determinados experimentos.
3. Se mide  $h$  inicial: en este paso se mide la altura de la cama de micropartículas aglomeradas solo con ayuda de la gravedad. Al hacer un nuevo experimento, basta con voltear el chip  $180^\circ$  para remover las partículas y luego reasentarlas de nuevo con gravedad.
4. Se hace vibrar con frecuencia y amplitud controlada por 10 segundos: Para este paso se utiliza el instrumento virtual creado en LabVIEW. Se selecciona secuencialmente un factor de intensidad para cada experimento.
5. Se dejan pasar 10 s de reposo y se realiza medición de  $h$ ; es necesario este tiempo para que las micropartículas dejen de asentarse.
6. Se repite pasos 3, 4 y 5: para obtener cada punto del gráfico de tasa de compactación en función de la intensidad de vibración.

### 3.3.1.3 Resultados de los experimentos de control de la tasa de compactación.

Terminado un experimento se obtiene el grafico de la figura 27.

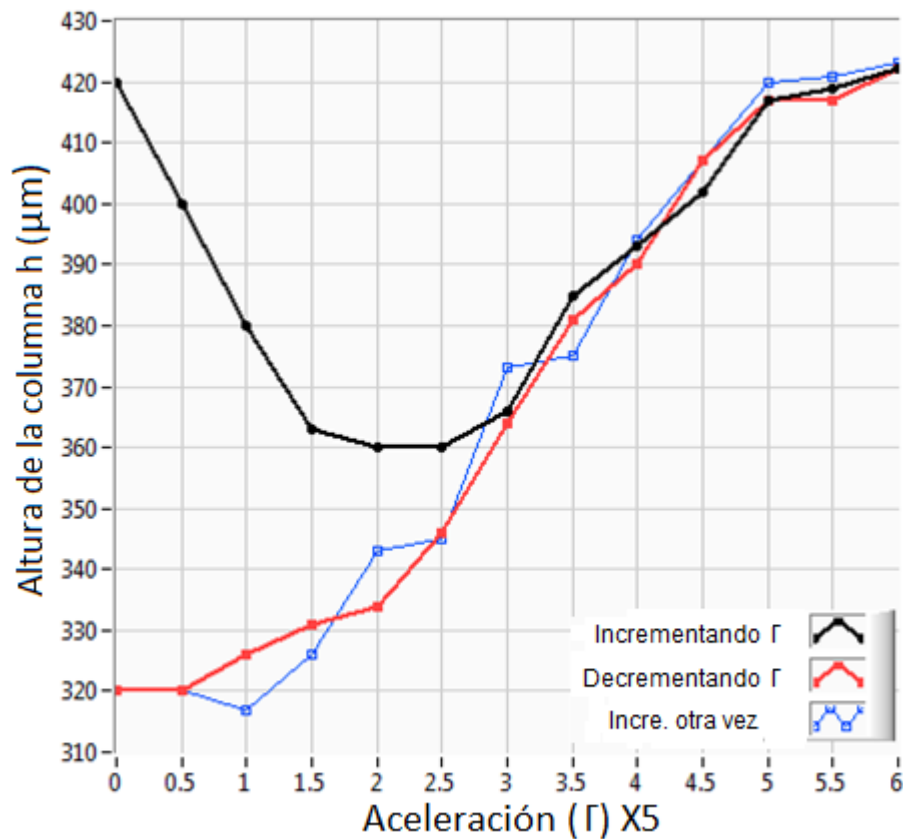


Fig. 27 Altura de la cama de micropartículas Vs Intensidad de vibración.

Para poder calcular la tasa de compactación es necesario saber dos parámetros: el volumen aparente y el volumen de las micropartículas. El primer parámetro es el que se está midiendo directamente, pero el segundo es de especial dificultad medirlo, ya que nuestro sistema es muy pequeño. No es posible, por lo pronto, graficar la tasa de compactación tal cual. Es por esto

que se representará la tasa de compactación como una relación de tasa de compactación entre compactación inicial ( $\rho/\rho_0$ ). Después de realizar el experimento anterior tres veces más y graficar la altura como  $\rho/\rho_0$  se obtiene el resultado representado en la figura 28.

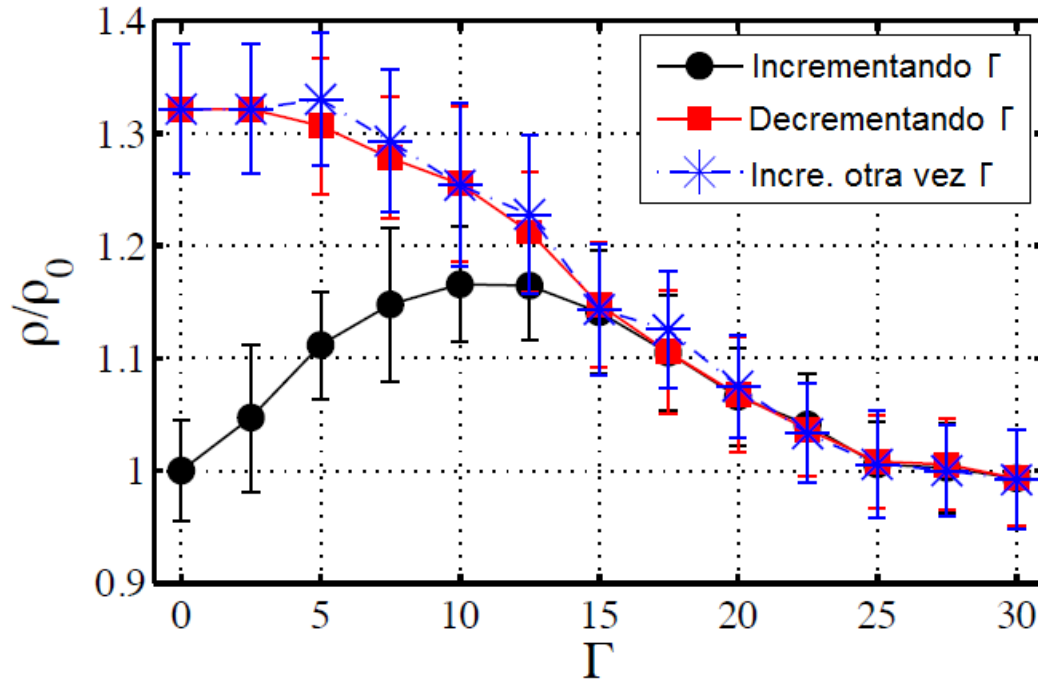


Fig. 28 Relación de compactación ( $\rho/\rho_0$ ) Vs Intensidad de compactación ( $\Gamma=A/g$ )

### 3.3.1.4 Discusión

En los experimentos de compactación, se trató a las micropartículas como materia granular macroscópica. La metodología del control de la compactación mostrado en este trabajo es similar a los ya reportados, pero con la gran diferencia de que este es a micro-escala y en un medio acuoso. El comportamiento encontrado, de la compactación contra la intensidad de vibración, es diferente a los reportados en la figura 5. Una de las diferencias es que en nuestro sistema se manejan intensidades de vibración de 0-30 ( $\Gamma$ ), mientras que en el sistema macroscópico se manejan de 0-7 ( $\Gamma$ ). Creemos que esta diferencia se debe al tamaño de las partículas. Otra diferencia es que, en

nuestro sistema la diferencia entre la compactación mínima y máxima, que se puede controlar (comportamiento reversible), es más amplia; mientras que en los sistemas macroscópicos y secos el control reversible es de un 2%, en nuestro sistema microscópico con agua es de un 33%. Es posible que el agua ayude a tener compactaciones menos densas debido a que la fuerza boyante contrarresta a la fuerza de gravedad, esto permite que las partículas caigan más suavemente, que sumado a la forma irregular de las partículas, permite ordenamientos muy expandidos.

Un punto interesante en este sistema es la frecuencia a la que son agitadas las micropartículas. En este trabajo se realizó un barrido de frecuencias y se observó que a 650 Hz hay una frecuencia de resonancia que provee mejores resultados al momento de compactar o expandir la cama de micropartículas. Por falta de tiempo no se estudió más acerca de este fenómeno de resonancia.

No fue posible, en este tiempo, medir la masa de las micropartículas para calcular el volumen de ellas y de esta manera obtener su volumen. El volumen es necesario para calcular la tasa de compactación. Se hicieron algunos intentos, pero las básculas empleadas carecieron de la resolución necesaria para medir estos pesos. Se está ideando un sistema magnético que permita medir la fuerza magnética, que es proporcional a la masa.

### 3.3.2 Experimentos de captura y liberación de nanopartículas fluorescentes en función de la compactación.

Se ha demostrado en este trabajo que es posible el control de la compactación en la trampa de micropartículas ferromagnéticas. Es de interés cuantificar las nanopartículas magnéticas fluorescentes atrapadas en función de la compactación. En resumen, como primer paso se preparará una cama de micropartículas con una cierta compactación, luego se harán fluir

nanopartículas con un flujo fijo. Para la captura y liberación de nanopartículas se acercará y alejará un imán respectivamente. Las nanopartículas, que son fluorescentes, formarán una nube al momento de ser liberadas. Para poder observar y grabar la nube de nanopartículas se usó un microscopio de fluorescencia invertido. Es importante mencionar que hay dos microscopios en el arreglo experimental, uno para la preparación de la trampa y otro para observar las nanopartículas.

Para la captura de nanopartículas se empleó un imán de neodimio de 6x3x25mm. Con ayuda de una impresora 3D, se construyó una estructura que ayuda a mantener el imán centrado y a una distancia controlada. El campo magnético se calibró con un gaussímetro a 150mT. En la figura 29 podemos observar el arreglo usado para el manejo del imán.

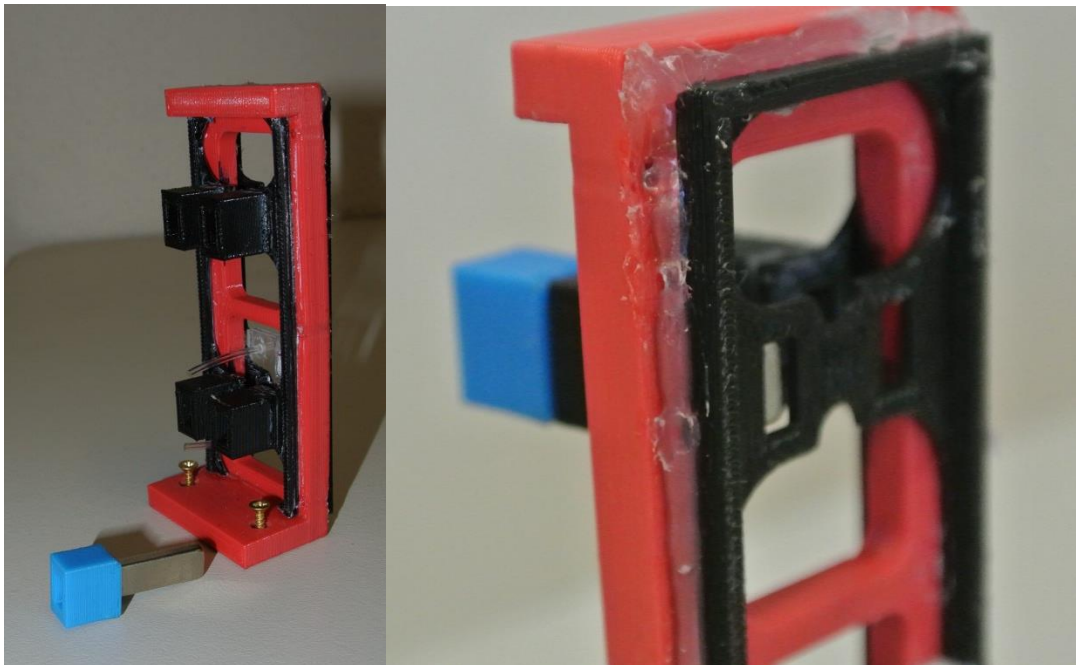


Fig. 29 Arreglo del imán



El flujo de nanopartículas es creado por una bomba de infusión a jeringas marca Kd scientific modelo KDS230. En la figura 30 se muestra la bomba empleada.



Fig. 30 Bomba de infusión a jeringas.

En la figura 31 se muestra el arreglo experimental para la captura y liberación nanopartículas.

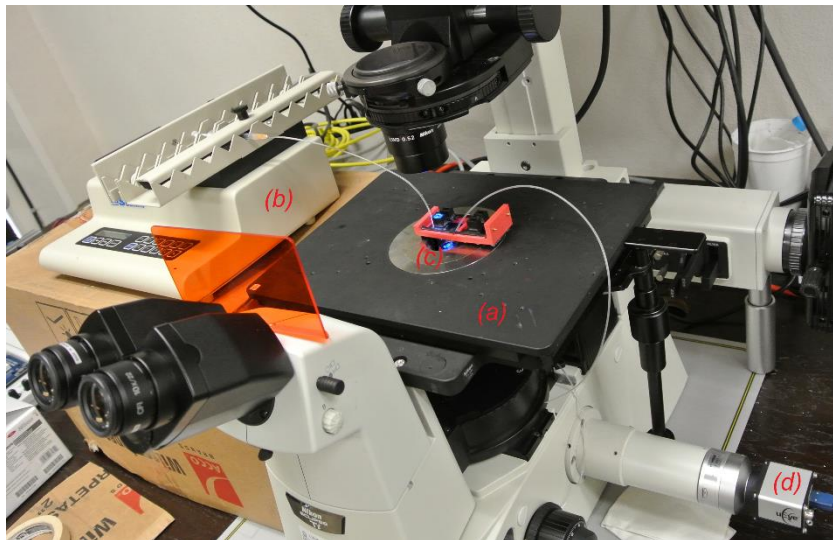


Fig. 31 Arreglo experimental de captura y liberación de MCSNP. (a) Platina del microscopio de fluorescencia. (b) Bomba de infusión. (c) Dispositivo microfluídico. (d) Cámara CCD.

### 3.3.2.1 Metodología de los experimentos

A continuación se detallan cada uno de los pasos realizados para obtener la captura y liberación de nanopartículas en función de la compactación. Para obtener un punto del gráfico es necesario aplicar lo siguiente:

Preparación de la trampa magnética:

1. Llenado de fluido: El canal microfluídico se llena de agua milliQ. Se elimina cualquier burbuja de aire dentro del canal.
2. Se vierten las partículas dentro del canal: con ayuda de una jeringa, y usándola como minicuchara, se toman micropartículas y luego se colocan en el chip microfluídico. Es poco el control que se tiene sobre cuantas micropartículas hay dentro del canal, por esto, es importante usar el mismo chip para determinados experimentos.
3. Se hace vibrar con frecuencia y amplitud controlada por 10 segundos: Para este paso se utiliza el instrumento virtual creado en LabVIEW. Se selecciona secuencialmente un factor de intensidad para cada experimento.
4. Se dejan pasar 10 s de reposo: es necesario este tiempo para que las micropartículas dejen de asentarse.
5. Se retira el porta chips del dispositivo vibrador y se coloca horizontalmente en la platina del microscopio de fluorescencia. Con ayuda de la pistola de silicón fundido, se fija provisionalmente el porta chips en el microscopio. Esto último es necesario para no mover el chip de su lugar al momento de insertar o quitar el imán permanente.

6. Una vez fijo el dispositivo en el microscopio, se conecta y enciende la bomba de infusión dejando que se estabilice el flujo por 5 min. Luego, se empieza la grabación de video y se abre la lámpara de fluorescencia.
7. Se mide el tamaño de la trampa de micropartículas (h), Se inserta el imán por 10 segundos y luego se retira por otros 10s. A causa de la atracción magnética del imán y el flujo, hay cierta compactación que debe tomarse en cuenta, es por esto que, cada vez que se inserte el imán debe medirse antes el tamaño de la trampa de micropartículas.
8. Se repite paso 7 cuatro veces.
9. Se repite desde el paso 3, tres veces.

#### 3.3.2.2 Análisis de los videos obtenidos de los experimentos.

Una vez realizados los experimentos y obtenidos los videos, es necesario procesar cada video de cada experimento. Este procesamiento se realizó con ayuda de un software llamado IDL. El procedimiento realizado para el análisis de imágenes es el siguiente:

1. El video se segmento en imágenes como las mostradas en la figura 32.

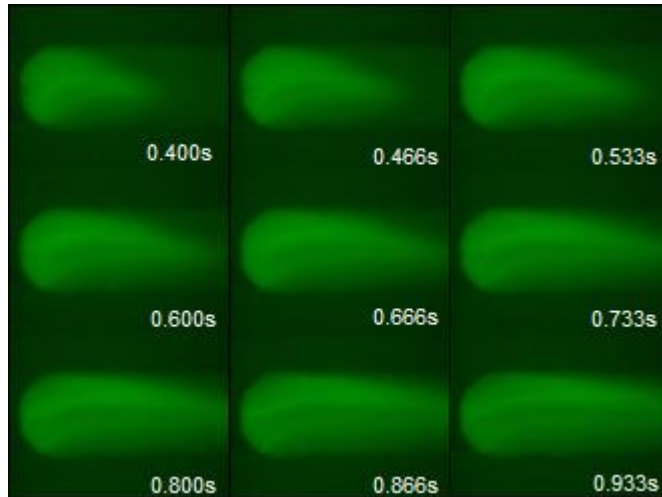


Fig. 32 Imágenes obtenidas de video de liberación. Una cada 1/15 s.

2. El conteo de nanopartículas se realizó sobre un área de interés construida a partir del perfil de velocidades del flujo dentro del canal, y de la distancia recorrida en pixeles de una imagen a otra a 15 imágenes por segundo. En la figura 33 se muestra la máscara creada para delimitar el área que se desea analizar en cada imagen del video.

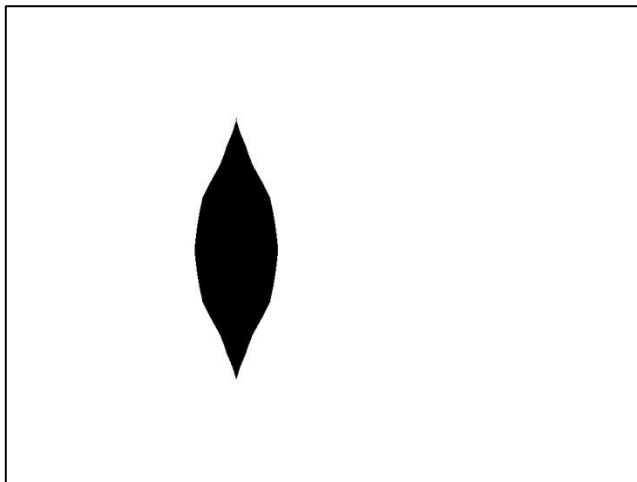


Fig. 33 Mascara del área de interés.

- Al multiplicar la máscara compuesta por unos en el área negra y ceros en el área blanca, se eliminan los pixeles no deseados, se obtienen los histogramas como los mostrados en la figura 34. Estos histogramas corresponden a 30 imágenes de un experimento de captura y liberación de nanopartículas.

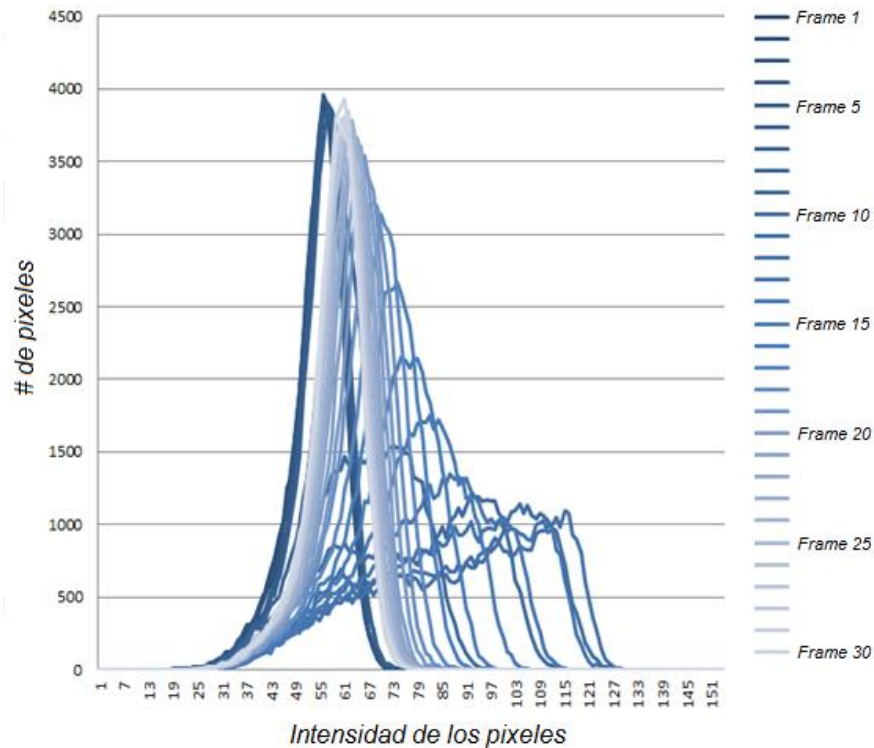


Fig. 34 Histogramas de 30 imágenes.

- De los histogramas anteriores (fig. 34) se observa cómo cambia la intensidad en los píxeles, pasando de baja intensidad (azul fuerte, sin MCSNP), a intensidad media (azul normal, pico de concentración de MCSNPs) y de nuevo a intensidad baja (azul claro). Si realizamos una sumatoria de la intensidad de cada píxel se puede obtener la intensidad de luz por imagen. En la figura 35 podemos observar el comportamiento de la intensidad de luz correspondiente a la fluorescencia de las

MCSNPs de un experimento de liberación de 90 imágenes ó 6 segundos.

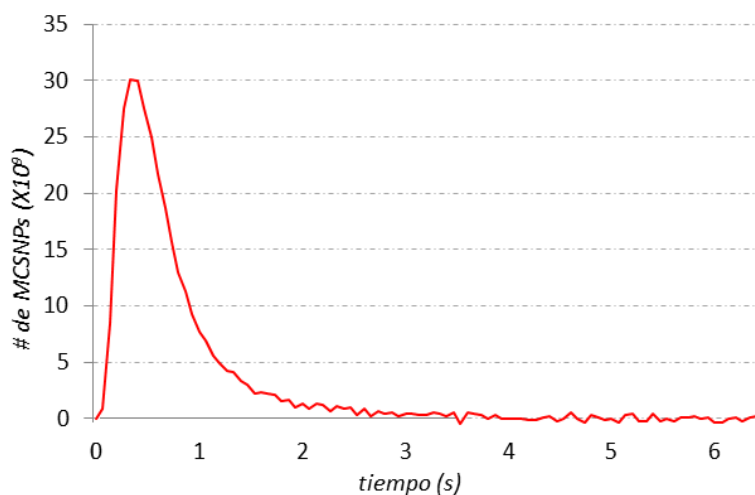


Fig. 35 Intensidad de luz en un experimento de liberación.

Al conocer la concentración usada de MCSNPs en los experimentos, es fácil obtener una referencia para convertir intensidad de luz a cantidad de MCSNPs. Es posible cuantificar y comparar para cada experimento de liberación, la cantidad total de MCSNPs capturadas a partir del área bajo la curva de la figura 35.

### 3.3.2.3 Resultados de los experimentos de liberación de nanopartículas magnéticas fluorescentes.

En el gráfico de la figura 36, se muestran los resultados de 31 experimentos de liberación de MCSNPs.

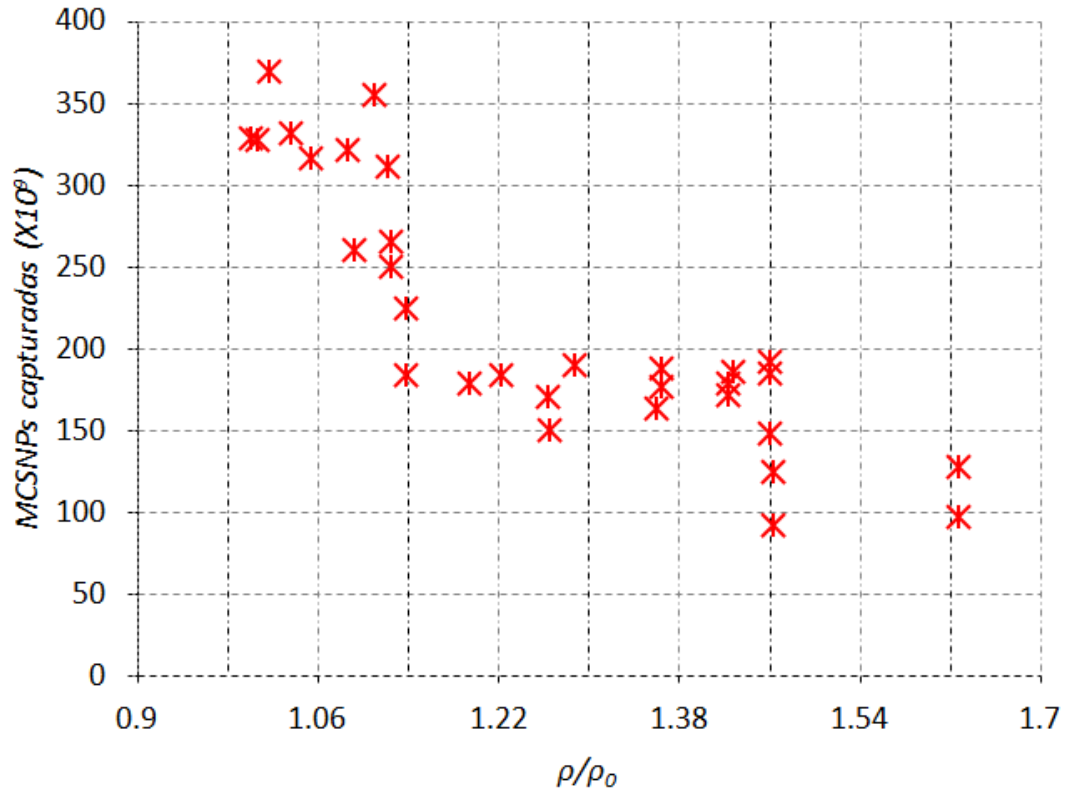


Fig. 36 Experimentos de liberación a diferentes compactaciones.

### 3.3.2.4 Discusión

En el gráfico de la figura 36 se puede apreciar que a compactación menos densa de la trampa magnética, hay una mayor capacidad de captura de nanopartículas. Al principio del trabajo se pensaba que esto sería al contrario, ya que en trampas más compactas hay más contactos entre las micropartículas. Las nanopartículas tienden a ser capturadas en los puntos de mayor gradiente magnético, esto es en los contactos de las micropartículas.

En el gráfico podemos apreciar que la trampa menos compacta captura 4 veces más nanopartículas que la más compacta. Creemos que la captura de nanopartículas es muy sensible al flujo, al tener la trampa expandida el flujo local dentro de esta es menor, mientras que en la trampa más compacta el flujo local es mayor. A flujos locales altos la fuerza de arrastre vence más

fácilmente a la fuerza de atracción magnética en las nanopartículas, por lo que la trampa magnética captura menos nanopartículas.

Los resultados de los experimentos de liberación mostrados en el gráfico son ruidosos, esto provoca errores que, aunque no se aprecia el comportamiento real de la captura de nanopartículas, sí se puede observar una clara tendencia de que la compactación sí afecta la capacidad de captura de estas. Este ruido en las mediciones es en gran medida a causa de que las mediciones del tamaño de la trampa se hicieron de manera horizontal, de manera que las micropartículas que conforman la trampa, pueden adoptar configuraciones muy irregulares en el perfil donde se realiza la medición. La solución a este problema es hacer el experimento completo en un solo microscopio, ya que se cuenta con uno en posición vertical para preparar la trampa (que no tiene fluorescencia) y otro del tipo invertido para medir las nanopartículas fluorescentes.



# CAPÍTULO 4

## Conclusiones

De los experimentos de compactación podemos concluir que sí es posible un control fino de la tasa de compactación (en un rango del 33%), de micropartículas pesadas (hierro 99.5%) dentro de un canal microfluídico (compuesto por PMMA), con un medio acuoso.

Este resultado es especialmente relevante ya que no era evidente a priori que los protocolos de compactación por vibración desarrollados y estudiados en sistemas macroscópicos y secos pudieran ser aplicados en sistemas micrométricos y con partículas inmersas en un fluido. Esto sugiere que gran parte del conocimiento generado en el área de materia granular en las últimas décadas pudiera ser usado en dispositivos microfluídicos en aplicaciones como inmunoensayos o cromatografía líquida. Actualmente se está preparando un artículo con estos resultados para mandar a consideración para publicación en alguna revista internacional.

En los experimentos de captura y liberación de nanopartículas se puede concluir que la tasa de compactación de una trampa magnética de micropartículas, sí influye en gran medida (hasta cuatro veces) la capacidad de captura de nanopartículas magnéticas fluorescentes, aunque en sentido opuesto a lo esperado: a mayor compactación, menor captura.

Debido a que el objetivo principal de la trampa magnética estudiada es realizar inmunoensayos con nanopartículas magnéticas, es indispensable tener un control preciso de la capacidad de captura de estas. En este trabajo se demostró que la forma en que se alojan las partículas de la trampa magnética sí afecta su rendimiento. Si se quisiera aplicar esta trampa mostrada en este trabajo en una aplicación real, tendría problemas de reproducibilidad, porque

la trampa cambiaría de forma con pequeños golpes o movimientos bruscos. Por esto es necesario buscar nuevas formas para eliminar estos problemas, una de estas formas es buscar partículas que tengan una forma esférica que ayude a alojarlas dentro de un canal microfluídico en una forma más homogénea y controlada. Se ha pensado en hacer estudios en una trampa compuesta por una monocapa de partículas, en usar partículas de otros tamaños y formas, en utilizar un electroimán en vez de un imán permanente etc.

# CAPÍTULO 5

## Bibliografía

- [1] Alphonsus H. C. Ng & Uvaraj Uddayasankar & Aaron R. Wheeler, *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397:991–1007
- [2] (a) Chiem N, Harrison DJ, *Anal Chem*, 2007, 69:373–378. (b) Hatch A, Kamholz AE, Hawkins KR, Munson MS, Schilling EA, Weigl BH, Yager P, *Nat Biotechnol*, 2001, 19:461–465
- [3] Bange A, Halsall HB, Heineman WR, *Biosens Bioelectron*, 2005, 20:2488–2503
- [4] S. Cesaro-Tadic, G. Dernick, D. Juncker, G. Buurman, H. Kropshofer, B. Michel, C. Fattinger and E. Delamarche, *Lab Chip*, 2004, 4, 563–569.
- [5] T.G. Henares, F. Mizutani and H. Hisamoto, *Anal. Chim. Acta*, 2008, 611, 17–30.
- [6] A. T. Pereira, P. Novo, D. M. F. Prazeres, V. Chu and J. P. Conde, *Biomicrofluidics*, 2011, 5, 014102.
- [7] O. Hofmann, G. Voirin, P. Niedermann and A. Manz, *Anal. Chem.*, 2002, 74, 5243–5250.
- [8] J. P. Golden, T. M. Floyd-Smith, D. R. Mott and F. S. Ligler, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22, 2763–2767.
- [9] V. N. Morozov, S. Groves, M. J. Turell and C. Bailey, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 12628–12629.
- [10] D. Holmes, J. K. She, P. L. Roach and H. Morgan, *Lab Chip*, 2007, 7, 1048–1056.
- [11] M. Herrmann, T. Veres and M. Tabrizian, *Lab Chip*, 2006, 6, 555–560.
- [12] E. Verpoorte, *Lab Chip*, 2003, 3, 60N.
- [13] M. Ikami, A. Kawakami, M. Kakuta, Y. Okamoto, N. Kaji, M. Tokeshi and Y. Baba, *Lab Chip*, 2010, 10, 3335–3340.
- [14] M. A.M. Gijs, F. Lacharme and U. Lehmann, *Chem. Rev.*, 2010, 110, 1518–1563.
- [15] D. Tang, Y. Yu, R. Niessner, M. Miro and D. Knopp, *Analyst*, 2010, 135, 2661–2667.
- [16] Y. Weizmann, F. Patolsky, E. Katz and I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 3452–3454.
- [17] F. Destremaut, J.-B. Salmon, L. Qi and J.-P. Chape, *Lab Chip*, 2008,

8, 950–957.

- [18] Bruno Teste, Florent Malloggi, Jean-Michel Siaugue, Anne Varenne, Frederic Kanoufia and Stephanie Descroix, *Lab Chip*, 2011, 11, 4207
- [19] M. Abonnenc, A.-L. Gassner, J. Morandini, J. Josserand and H. H. Girault, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, 395, 747–757.
- [20] T. Deng, M. Prentiss and G. M. Whitesides, *Appl. Phys. Lett.*, 2002, 80, 461–463.
- [21] M. Bu, T. B. Christensen, K. Smistrup, A. Wolff and M. F. Hansen, *Sens. Actuators A*, 2008, 145, 430–436.
- [22] Bruno Teste, Florent Malloggi, Anne-Laure Gassner, *Lab Chip*, 2011, 11, 833-840
- [23] Jaeger, Heinrich M.; Nagel, Sidney R. y Behringer, Robert P., *Reviews of Modern Physics*, 1996, 68, 1259.
- [24] ER Nowak, JB Knight, E Ben-Naim, HM Jaeger, *Physical Review E*, 1998
- [25] O. Carvente and J. C. Ruiz-Suárez, *Phys. Rev. Lett.* 95, 018001
- [26] O. Carvente and J. C. Ruiz-Suárez, *Phys. Rev.*, 2008, E 78, 011302
- [27] R. Massart, J. C. Bacri, R. Perzynski and D. Salin, *J. Magn. Magn. Mater.*, 1986, 62, 36–46.
- [28] Y. Lu, Y. Yin, B. T. Mayers and Y. Xia, *Nano Lett.*, 2002, 2, 183–186.
- [29](a) Butterworth, M. D., Illum, L., Davis, S. S. *Colloids Surf. A*, 2001, 179, 93. (b) Szabo, D. V., Vollath, D. *Adv. Mater*, 1999, 11, 1313. (c) Donselaar, L. N., Philipse, A. P., Suurmond, J. *Langmuir*, 1997, 13, 6018. (d) Liu, Q., Xu, Z., Finch, J. A., Egerton, R. *Chem. Mater.*, 1998, 10, 3936. (e) Correa-Duarte, M. A., Giersig, M., Kotov, N. A., Liz-Marzán, L. M. *Langmuir*, 1998, 14, 6430.
- [30] Ulman, A. *Chem. Rev.*, 1996, 96, 1533.
- [31] Dolník, V, Liu, S R, Jovanovich, S, *Electrophoresis*, 2000, 21, 41–54.
- [32] Becker, H., Gartner, C., *Electrophoresis*, 2000, 2, 12–26.
- [33] Becker, H., Locascio, L. E., *Talanta*, 2002, 56, 267–287.
- [34] Yun Chen Luyan Zhang, *Electrophoresis*, 2008, 29, 1801–1814
- [35] Laurie Brown, Terry Koerner, J., *Lab on a Chip*, 2006, 6, 66-73