

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA ELÉCTRICA
SECCIÓN BIOELECTRÓNICA

Sistema basado en microfluídica, sensores GMR y
partículas magnéticas con uso potencial en la detección
y cuantificación de células cancerosas

TESIS

Que presenta

CARLOS LÓPEZ ADAUTA

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE
INGENIERÍA ELÉCTRICA

Directores de la Tesis:

Dr. Arturo Vera Hernández

Dr. Goldie Oza

*Al que me enseñó que solo la gente valiente
busca ser fuerte desde su interior, que el
carácter se cultiva librando batallas con
el mundo y que los verdaderos talentos
se cultivan en la soledad.
A no tener miedo de defender lo correcto.
A ver la vida siempre como un regalo y a
valorar cada momento.*

Índice general

Agradecimientos	VI
Resumen	VIII
Abstract	X
Introducción	XII
1. Teoría preliminar	1
1.1. Aspectos físicos de la microfluídica	1
1.2. Ecuaciones fundamentales	2
1.2.1. Teorema del Transporte de Reynolds	2
1.2.2. Ecuación de continuidad	3
1.2.3. Ecuación del momento lineal	5
1.2.4. Ecuación de Cauchy	8
1.2.5. Ecuación de Navier-Stokes	9



1.3.	Resistencia hidráulica	14
1.4.	Ecuación de convección-difusión	15
1.5.	El Efecto de Magnetoresistencia	17
1.5.1.	Efecto de Magnetoresistencia Gigante (GMR)	18
1.6.	Nanopartículas magnéticas	20
1.6.1.	Comportamiento magnético	21
1.6.2.	Curva de magnetización	22
2.	Estado del Arte	25
2.1.	Aspectos tecnológicos de la microfluídica	25
2.2.	Fabricación de microcanales por el método de litografía suave	27
2.2.1.	Fabricación de moldes	28
2.2.2.	Fabricación de réplicas	30
2.2.3.	Sellado	30
2.3.	Aspectos tecnológicos de las MNP	31
2.4.	Últimos avances en sistemas microfluídicos para el conteo y la detección de células cancerosas	33
3.	Definición del Problema	36
3.1.	Planteamiento del problema	36
3.2.	Justificación	37



3.3. Objetivos	38
3.3.1. Objetivo General	38
3.3.2. Objetivos particulares	38
4. Método y materiales	40
4.1. Modelado por FEM de la distribución de MNPs en un microcanal recto . . .	40
4.1.1. Implementación en COMSOL multiphysics	42
4.2. Fabricación de microcanales	47
4.2.1. Fabricación de moldes	47
4.2.2. Fabricación de réplicas	48
4.2.3. Sellado del canal al sustrato	50
4.3. Fabricación por deposición de líneas de corriente	50
4.3.1. Fotolitografía para obtención de la geometría	51
4.3.2. Deposito por evaporación por haz de electrones	52
4.4. Implementación del Sistema electrónico de detección	54
4.4.1. Características de la Dynabeads M-270	55
4.4.2. Curva de magnetización de las Dynabeads M-270	56
4.4.3. Características de los sensor GMR AA002 y AAH002	57
4.4.4. Implementación del sistema de detección con imanes permanentes .	59
4.4.5. Implementación del sensor GMR AA002	60



4.4.6.	Implementación del sistema de detección con líneas de corriente . . .	65
4.4.7.	Implementación del sensor GMR AAH002	66
4.5.	Pruebas y caracterización de los Sistema desarrollados	67
4.6.	Instrumentación	69
5.	Resultados y discusiones	72
5.1.	Modelado mediante FEM de la distribución de MNPs a través del microcanal	72
5.1.1.	Distribución de MNPs con el campo magnético constante	73
5.1.2.	Distribución de MNP con campo magnético generado por una linea de corriente	75
5.2.	Fabricación de microcanales	77
5.3.	Pruebas y Caracterización de los sistemas implementado	78
5.3.1.	Experimentación con el sistema de imanes permanentes	79
5.3.2.	Observaciones	83
5.4.	Sistema con lineas de corriente	84
5.5.	Discusiones	86
	Conclusiones	87
	Bibliografía	90
	Anexos	93

Agradecimientos

Al **Dr. Arturo Vera Hernández**, por apoyarme en todo momento a lo largo de estos dos años, por estar siempre al pendiente de mi trabajo. Gracias por su generosidad y las oportunidades, por las charlas y los consejos siempre con ese gran carisma, que hasta cuando me regañaba lo hacía sonriendo. Siempre agradeceré que me permitiera formar parte de su equipo de trabajo. Gracias por motivarme a seguir adelante y por ayudarme cuando las cosas se tornaron difíciles.

Al **Dr. Lorenzo Leija Salas** por apoyarme en todo momento a pesar de nuestras diferencias, gracias por todos los consejos, por compartir conmigo su experiencia y ofrecerme su apoyo cuando me vio preocupado. Gracias por esas charlas de libros y de la vida. De igual manera siempre agradeceré que me permitiera formar parte de su equipo de trabajo.

Al **Dr. Goldie Oza**, no hay palabras para agradecer todas sus atenciones y que siempre estuviera atento a mi trabajo, desde luego mil gracias por la motivación, paciencia, apoyo y generosidad, por esas pláticas y los buenos momentos que convivimos.

Al **Dr. Jannu Ricardo Casanova**, por toda su atención, motivación y apoyo brindado a lo largo del desarrollo de esta tesis, gracias por la dedicación y la siempre disposición para discutir sobre el tema.

Al **DR. Pablo Rogelio**, por toda su atención, motivación y apoyo brindado a lo largo del desarrollo de esta tesis, Gracias por todos las pláticas y todos sus consejos.

Al **Dr. David Elias**, por siempre brindarme su apoyo, gracias por todas las pláticas y sus consejos, a pesar de que ya no está, siempre lo recordaré.



Al M. en C. **José Hugo Zepeda Peralta**, gracias por todo el apoyo técnico durante el montaje de todos los experimentos que realizamos. Gracias por compartir tus valiosas ideas para la realización de este trabajo.

Al M. en C. **Rubén Pérez Valladares**, por todo el apoyo brindado, por todas las pláticas, gracias Tigre.

A mis amigos de generación, **Eduardo, Sebastian, Jeniffer, Andrés, Carlos** (Tocayo), **Juan, Daniel, Texar, Victor, Ilian, Salvador, Jorge, Ana Laura, Victor Chuc**. Gracias por todos los momentos increíbles que pasamos, por todas las pláticas acompañados de un café, por esas desveladas intentando sacar los proyectos, por todas las fiestas en el biobar. Gracias por ser parte de mi vida.

Agradezco profundamente al **Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN**, en particular a la **Sección de Bioelectrónica** por permitirme realizar los estudios de maestría en esta hermosa Institución.

Agradezco al **CONACyT** por el apoyo económico brindado durante la elaboración de este trabajo.

Resumen

Actualmente, la bionanotecnología ha logrado funcionalizar nanopartículas magnéticas (MNPs) con ligandos bioactivos, por ejemplo los anticuerpos; de esta manera es posible unir nanopartículas a entidades biológicas como células, genes, etc. Es posible detectar la señal magnética emitida por las MNPs mediante sensores magnéticos de alta sensibilidad llamados GMR. Con esta tecnología, se intentan desarrollar sistemas microfluídicos que sean capaces de detectar células cancerosas tomadas de muestras aisladas. El propósito de esta tesis se resume en el desarrollo de un sistema basado en microfluídica, sensores GMR y partículas magnéticas con una potencial aplicación en la detección de células cancerosas. Se describen principalmente cuatro aspectos: (1) La implementación de modelos para conocer el comportamiento y la distribución de una concentración de MNPs a través de un microcanal recto, (2) la fabricación de microcanales con la técnica de litografía suave y la fabricación de pistas de corriente en sustratos por deposición de películas delgadas, (3) la implementación de un sistema electrónico usando sensores GMR para la detección de la señal magnética emitida por las partículas que atraviesan los microcanales, (4) pruebas y caracterización del sistema mediante la obtención de algunos parámetros como la concentración mínima de partículas magnéticas detectables para el sensor. Se usaron dos fuentes de campo magnético independiente para magnetizar las partículas: (1) Una disposición de imanes permanentes de neodimio de 1.2 T, (2) líneas de corriente de oro fabricadas por deposición de películas delgadas en sustratos. En cuanto a los resultados obtenidos, los modelos de la distribución de MNPs a través de los microcanales permitieron tener una referencia de la región donde se concentran las MNPs para la caracterización del sistema. Se fabricaron canales microfluídicos de 500 μm de ancho, 60 μm de altura y 2 cm de largo. Se obtuvo la mínima cantidad de partículas detectables por el sistema; en este caso



partículas magnéticas Dynabeads M-270, se obtuvo la curva de calibración para diferentes concentraciones de Dynabeads. Los experimentos realizados permitieron plantear mejoras y perspectivas para desarrollar un sistema optimizado para la detección, separación y cuantificación de células cancerosas.

Abstract

Currently, bionanotechnology has managed to functionalize magnetic nanoparticles (MNPs) with bioactive ligands, for example antibodies; in this way, it is possible to bind nanoparticles to biological entities such as cells, genes, etc. It is possible to detect the magnetic signal emitted by MNPs using high sensitivity magnetic sensors called GMR. With this technology, attempts are made to develop microfluidic systems that are capable of detecting cancer cells taken from isolated samples. The purpose of this thesis is summarized in the development of a system based on microfluidics, GMR sensors and magnetic nanoparticles for the purpose of cancer cell detection. Four aspects are mainly described: (1) The implementation of models to know the distribution of the concentration of magnetic nanoparticles through the microchannels, (2) the manufacture of microchannels with the soft lithography technique, (3) the implementation of an electronic system using GMR sensors for the detection of the magnetic signal emitted by the MNPs that pass through the microchannels, (4) characterization of the system by obtaining parameters such as: Minimum magnetic excitation field of the MNP, minimum concentration of MNP detectable for the sensor, etc. Two independent magnetic field sources were used to magnetize the nanoparticles: (1) A permanent 1.2 Teslas neodymium magnet at a distance from the microchannel and the sensor, (2) gold current lines made by deposition on a substrate; they cross perpendicularly through the microchannel. Regarding the obtained results, microfluidic channels of 500 μm wide, 60 μm high and 2 cm long were manufactured. The detection system for different concentrations of MNPs was characterized in this case Dynabeads M-270. The calibration curve and the minimum amount of detectable particles were obtained. The experiments carried out allowed us to propose improvements and perspectives to develop an optimized system for the detection separation and quantification



of cancer cells.

Introducción

1959 es considerado el inicio de la micro y nanotecnología debido a la conferencia presentada por Richard Feynman durante la reunión de la sociedad Americana de Física. En ella, Feynman propuso la miniaturización de sistemas con diferentes aplicaciones, entre ellas la manipulación de células y átomos [1].

En años recientes, el campo de la miniaturización ha progresado considerablemente. Actualmente, es posible miniaturizar todo tipo de sistemas: mecánicos, fluidicos, electromecánicos, térmicos, etc. Como resultado de esta tendencia en reducir la escala de los sensores y actuadores, en 1980 surgió una tecnología novedosa llamada MEMS (Micro Electro Mechanical Systems). En los años 90s, esta área se diversificó con la fabricación de MEMS para aplicaciones químicas, biológicas y biomédicas. Como consecuencia, surgió una nueva disciplina la microfluídica, que se encarga del estudio y desarrollo de sistemas para manipular cantidades muy pequeñas de fluido a través de microcanales que van desde unos cuantos micrómetros hasta cientos de micrómetros [2].

El primer dispositivo microfluídico consistió en un sistema de cromatografía de gases, desarrollado alrededor de 1975. Este sistema consistía de microcanales grabados en silicio por los cuales circulaba un gas, un sistema de microinyección electromagnética y un microdetector térmico [2]. Sin embargo, no fue hasta inicios de los años noventa que se empezaron a fabricar sistemas de separaciones, bombas electroosmóticas, sistemas de separación difusiva, micromezcladores, etc. Durante el mismo periodo, la microfluídica fue utilizada para aclarar conceptos fundamentales de física, como por ejemplo el estudio de la elongación del ADN, experimento realizado por Steven Chu; él y su equipo utilizaron un sistema microfluídico para controlar una fuerza de estiramiento viscosa y aplicarla al



ADN [3].

Los dispositivos microfluídicos presentan la habilidad realizar análisis en paralelo, por lo que en 1990 se incorpora el termino Lab on a Chip (Laboratorio en un chip) que integra varias funciones de un laboratorio en un solo chip. Partiendo de esta idea, en 1994, un grupo de investigadores tuvo éxito en la fabricación de un chip que integra tres funciones diferentes: La mezcla de reactivos, desarrollo de reacciones enzimáticas y separación de reactivos [1].

Durante muchos años, los chips microfluídicos eran fabricados con tecnologías derivadas de la industria de la microelectrónica; esto resultaba en ocasiones inaccesible. A partir del año 2000, se introduce la litografía suave que es la principal técnica de fabricación de dispositivos microfluídicos, cuyo principal material de fabricación es el PDMS (Polidimetilsiloxano) que es un elastómero transparente parecido al silicón; éste se vierte sobre un molde fabricado con fotolitografía sobre obleas de silicio o de vidrio [4]. Con la llegada de las impresoras 3D, surgen nuevas ideas para simplificar más la fabricación de dispositivos microfluídicos, por ejemplo las impresoras 3D con resolución de 100 μm . Esto redujo los costos y la microfluídica se popularizo aún más, desde entonces se han desarrollado dispositivos microfluídicos para diferentes aplicaciones.

A partir del año 2000 cuando se comenzó la investigación con nanomateriales, se sintetizaron partículas del orden de los nanómetros con propiedades magnéticas, superparamagnéticas entre otras propiedades. Actualmente la bionanotecnología ha logrado funcionalizar nanopartículas magnéticas (MNP) con ligandos bioactivos, por ejemplo los anticuerpos, de esta manera es posible unir nanopartículas a entidades biológicas como células, genes, etc [5]. Las propiedades magnéticas de las MNPs las hace atractivas para múltiples aplicaciones en biodetección ya que éstas se pueden manipular mediante gradientes magnéticos, desde el año 2010 la microfluídica y la bionanotecnología han unido recursos para desarrollar biosensores microfluídicos.

A través de microcanales fluidicos pueden circular nanopartículas magnéticas [5]. Es posible detectar la señal magnética emitida por las MNPs mediante un sensores magnético de alta sensibilidad llamado Magnetoresistencia Gigante (GMR) [6]. Con esta tecnología se



intentan desarrollar sistemas microfluídicos que sean capaces de detectar células cancerosas tomadas de muestras aisladas unidas a MNPs funcionalizadas [7].

El novedoso campo de la microfluídica, la bionanotecnología y la tecnología nueva en sensores y actuadores, brinda la posibilidad de mejorar las áreas médico biológicas para el análisis y el diagnóstico de enfermedades. Por ejemplo, para el diagnóstico de cáncer se requiere de equipo muy sofisticado como el citómetro de flujo, que se encarga de la separación y conteo de células a partir de una técnica de activación por fluorescencia. Actualmente, se intentan desarrollar sistemas microfluídicos que realicen las funciones de un citómetro de flujo.

El desarrollo de micro analizadores basados en microfluídica para aplicaciones biomédicas y/o químicas, presentan muchas ventajas incluyendo el bajo costo de fabricación, el uso y desechos de los dispositivos es amigable con el medio ambiente, el consumo de reactivos y analitos es mínimo, finalmente la miniaturización permite la portabilidad de estos dispositivos [2]. En México, estos micro analizadores podrían ser utilizados para la detección y conteo de células cancerosas en tiempos más cortos.

En este trabajo se presenta el desarrollo de un sistema basado en microfluídica, sensores GMR y partículas magnéticas con una potencial aplicación en la detección de células cancerosas. El escrito se divide en dos partes fundamentales que son: El modelado por elemento finito de la distribución de MNPs a través de un microcanal recto, y la elaboración de un prototipo de sistema microfluídico que consiste de dos partes: La fabricación de microcanales con la técnica de litografía suave, y la implementación de un sistema electrónico usando sensores GMR para la detección de la señal magnética emitida por las partículas magnéticas que atraviesan el microcanal.

El presente escrito tiene 6 capítulos que se describen a continuación.

Capítulo 1: Se describen los fundamentos teóricos de la microfluídica, el principio de funcionamiento de los sensores GMR, y se describen las propiedades de las partículas magnéticas, estos fundamentos sirven para realizar modelos del arrastre de partículas magnéticas a través de los microcanales.



Capítulo 2: Se describen los avances tecnológicos más recientes en el desarrollo de biosensores basados en microfluídica para la detección y conteo de células cancerosas, se describen también las tecnologías y las condiciones ambientales necesarias para el desarrollo de sistemas microfluídicos para análisis.

Capítulo 3: Basándose en la revisión del estado del arte y las condiciones tecnológicas actuales de México se definió el problema a resolver. En este mismo capítulo se plantea la justificación y los objetivos de esta tesis.

Capítulo 4: Se describe detalladamente el método y los materiales utilizados para el desarrollo de cada etapa, la primera etapa es el modelado por elemento finito de la distribución de partículas magnéticas en un microcanal recto; se modela la distribución bajo la influencia de un campo magnético generado por un imán permanente, se modela también la distribución bajo la influencia de un campo magnético generado por una línea de corriente. La segunda etapa es la fabricación de microcanales con la técnica de litografía suave y la fabricación de pistas de corriente en sustratos por deposición de películas delgadas, la tercera etapa es la implementación del sensores GMR para detectar la señal magnética de las MNPs, finalmente la cuarta etapa consiste en realizar las pruebas pertinentes del sistema y la caracterización del sistema desarrollado mediante la obtención de algunos parámetros como: resolución, sensibilidad etc.

Capítulo 5: Se describen los resultados obtenidos de cada una de las etapas implementadas en el desarrollo de esta tesis. Se muestran los resultados más significativos del sistema microfluídico desarrollado y las respectivas discusiones.

Capítulo 6: Se plantea la conclusión y perspectivas del trabajo a lo largo del desarrollo de la tesis.

Capítulo 1

Teoría preliminar

En este capítulo se presentan los fundamentos teóricos de la microfluídica, se presentan las ecuaciones fundamentales para describir el movimiento los fluidos en espacios confinados de dimensiones micrométricas, principalmente las ecuaciones de Navier-Stokes y de continuidad. Se presenta la ecuación de convección-difusión, esta última para modelar fenómenos de transporte en fluidos. Se presenta también el efecto de magnetoresistencia gigante, principio por el cual funcionan los sensores de alta sensibilidad GMR. Finalmente se presentan las propiedades y aspectos físicos de las nanopartículas magnéticas (MNPs).

1.1. Aspectos físicos de la microfluídica

Es importante conocer y caracterizar perfectamente los fluidos para realizar un estudio numérico y físico adecuado, puesto que las propiedades del fluido van a determinar su comportamiento tanto real como numérico.

Hay varias propiedades que caracterizan a un fluido, una de las más importantes es que es un medio continuo. A escala micrométrica un fluido es discontinuo tomando en cuenta la estructura y las interacciones moleculares, sin embargo, caracterizamos a un fluido como continuo a partir de un volumen suficientemente grande en el cual sus propiedades se



definen con unas variaciones mínimas, ignorándose de esta manera la estructura molecular de la materia. Las variables de estado del fluido, como la presión, la densidad, la velocidad o la temperatura pueden ser consideradas como funciones continuas del espacio y el tiempo. Por otra parte, para que dicha hipótesis sea válida el recorrido libre promedio de las moléculas del fluido, distancia media entre colisiones recorrida por las moléculas, debe ser mucho menor que una longitud característica del sistema físico en que se encuentra el fluido en cuestión.

En esta tesis el movimiento de los microfluidos se estudia en el sentido clásico, con las ecuaciones de la mecánica de fluidos y la hipótesis del medio continuo, las ecuaciones fundamentales se describen a continuación

1.2. Ecuaciones fundamentales

Para describir el movimiento de los fluidos como un medio continuo existen dos enfoques, el enfoque Lagrangiano y el enfoque Euleriano, en la descripción Lagrangiana se sigue a la partícula individual en su movimiento de tal manera que se busca una función del vector de posición \vec{r} y del vector velocidad \vec{v} o cualquier otra propiedad en cada instante de tiempo. En la descripción Euleriana no se sigue el rastro de la posición y/o la velocidad de una partícula del continuo en su movimiento, si no que se posiciona en cualquier punto del espacio ocupado por el continuo y describe a la partícula en cualquier instante de tiempo en ese punto.

1.2.1. Teorema del Transporte de Reynolds

Para describir el flujo de fluidos se define un volumen finito llamado volumen de control (VC), a través del cual el fluido fluye hacia adentro y hacia afuera, este volumen de control comprende una región seccionada del continuo donde tanto masa como energía pueden cruzar su frontera (SC). Se definen variables de campo dentro del volumen de control, funciones del espacio \vec{r} y el tiempo t para describir, por ejemplo, la presión $P = P(\vec{r}, t)$, la



velocidad $\vec{V} = \vec{V}(u(\vec{r}, t), v(\vec{r}, t), u(\vec{r}, t))$ de cualquier partícula del fluido que este en lugar y momento de interés, las variaciones temporales de una propiedad extensiva para un sistema y las integrales de volumen y superficie del volumen de control están relacionadas por el teorema del transporte de Reynolds.

Para un volumen de control fijo, que no se mueve si se deforma con el tiempo, y $B_{sist} = B$ es cualquier propiedad extensiva del sistema como la masa, la energía, o la cantidad de movimiento, el teorema del transporte de Reynolds se expresa

$$\frac{dB_{sist}}{dt} = \int_{VC} \frac{\partial}{\partial t} \rho b dV + \int_{SC} \rho b \vec{V} \cdot \hat{n} dA \quad (1.1)$$

donde $b = \frac{B}{m}$ es la propiedad intensiva correspondiente B_{sist} , \vec{V} es el vector velocidad del fluido que cruza la diferencial de área dA , y \hat{n} es el vector normal exterior unitario al diferencial de superficie. Afortunadamente la ecuación (1.1) también es válida para un volumen de control con forma arbitraria, en movimiento o deformación en el instante t siempre que el vector velocidad sea la velocidad absoluta

1.2.2. Ecuación de continuidad

Aplicando el teorema de *Reynolds* a un volumen de se obtiene una expresión para la conservación de la masa. Si hacemos $b = 1$ entonces la propiedad extensiva B es la masa $B = m$ y la ecuación (1.1) se reduce a

$$\frac{dm_{sist}}{dt} = \int_{VC} \frac{\partial \rho}{\partial t} dV + \int_{SC} \rho \vec{V} \cdot \hat{n} dA \quad (1.2)$$

El teorema de la divergencia de Gauss permite transformar la integral de la divergencia del vector \vec{A} , en una integral de área sobre la superficie cerrada S que define el volumen, este se expresa como



$$\int_V \nabla \cdot \vec{A} dV = \oint_s \vec{A} \cdot \hat{n} dA \quad (1.3)$$

Aplicando el teorema de la divergencia a (1.2) para convertir el segundo término en un integral de volumen se obtiene

$$\int_{VC} \left[\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \vec{V}) \right] = 0 \quad (1.4)$$

por lo tanto, como el volumen de control es arbitrario se obtiene

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \vec{V}) = 0 \quad (1.5)$$

Esta ecuación se conoce como la ecuación de conservación de la masa o ecuación de continuidad, su versión extendida usando la regla del producto sobre la divergencia es

$$\underbrace{\frac{\partial \rho}{\partial t} + \vec{V} \cdot \nabla \rho}_{\text{Derivada material de } \rho} + \rho \nabla \cdot \vec{V} = 0 \quad (1.6)$$

Dado que la densidad nunca es cero, la ecuación anterior puede escribirse en forma alternativa como

$$\frac{1}{\rho} \frac{D\rho}{Dt} + \nabla \cdot \vec{V} = 0 \quad (1.7)$$

Donde $\frac{D}{Dt}$ es la derivada material. la ecuación (1.7) muestra que si se sigue un volumen de control infinitesimal (llamado elemento de fluido, elemento material, o partícula de fluido) a través del campo de flujo, su densidad cambia con el cambio de $\nabla \cdot \vec{V}$. Por otra parte, si los cambios en la densidad del elemento de fluido son despreciablemente pequeños en comparación con la magnitud de los gradientes de velocidad en $\nabla \cdot \vec{V}$ cuando el fluido atraviesa en campo de flujo, entonces $\frac{D\rho}{Dt} \cong 0$, por tanto el campo de flujo satisface



$$\nabla \cdot \vec{V} = 0 \tag{1.8}$$

Si el fluido satisface (1.8) se dice que es incompresible. Esto significa que conforme el campo de velocidad cambia en una parte de flujo incompresible, todo el resto del campo de flujo se ajusta inmediatamente al cambio, de modo que (1.7) se satisface en todo momento.

1.2.3. Ecuación del momento lineal

La segunda ley de Newton expresa que la aceleración de un cuerpo es proporcional a la fuerza neta que actúa sobre él y es inversamente proporcional a su masa. Para un cuerpo rígido de masa m , la segunda ley de Newton se expresa como:

$$\vec{F} = \frac{d\vec{p}}{dt}$$

Donde $\vec{P} = m\vec{v}$ es el momento lineal o cantidad de movimiento del cuerpo en cuestión, a menudo expresamos la segunda ley de Newton en el caso de que la masa sea constante como

$$\vec{F} = \frac{d\vec{p}}{dt} = \frac{d(m\vec{v})}{dt} = m \frac{d\vec{v}}{dt} = m\vec{a}$$

Donde \vec{a} es la aceleración de ese cuerpo bajo la influencia de \vec{F} , en mecánica de fluidos es común hacer referencia a la segunda ley de Newton como la ecuación del momento lineal.

Para aplicar la segunda ley de Newton a un volumen de control se necesita identificar las fuerzas que actúan sobre éste. Estas fuerzas se dividen en fuerzas volumétricas que actúan en todo el cuerpo de ese volumen tales como la fuerza de gravedad, eléctrica o magnética, y las fuerzas superficiales que actúan sobre la superficie de control como la



fuerza de presión y la viscosa. La suma de todas las fuerzas que actúan sobre el volumen de control en un instante de tiempo se expresa como

$$\sum \vec{F} = \sum \vec{F}_{\text{volumétricas}} + \sum \vec{F}_{\text{superficiales}} \quad (1.9)$$

La única fuerza volumétrica que se considera es la gravitatoria, es decir la fuerza de gravedad sobre un elemento diferencial de fluido de volumen dV dentro del volumen de control es sencillamente su peso, es decir

$$d\vec{F} = \rho \vec{g} dV$$

Donde \vec{g} puede tener orientación arbitraria con respecto al sistema de coordenadas. En coordenadas cartesianas adoptamos \vec{g} en dirección negativa o hacia abajo físicamente $\vec{g} = -g\hat{j}$. La fuerza volumétrica total que actúa sobre el volumen de control está dada por

$$\sum \vec{F}_{\text{volumétricas}} = \int_{VC} \rho \vec{g} dV \quad (1.10)$$

Las fuerzas superficiales se deben a los esfuerzos en las caras de la superficie de control, estas fuerzas superficiales constan tanto de componentes normales como de tangenciales que conviene definir un tensor de esfuerzos σ , para describir los esfuerzos superficiales en un punto del campo de flujo:

$$\sigma = \begin{pmatrix} \sigma_{xx} & \sigma_{xy} & \sigma_{xz} \\ \sigma_{yx} & \sigma_{yy} & \sigma_{yz} \\ \sigma_{zx} & \sigma_{zy} & \sigma_{zz} \end{pmatrix} \quad (1.11)$$

Las componentes de esta diagonal de este tensor de segundo orden, σ_{xx} , σ_{yy} y σ_{zz} se llaman esfuerzos normales; los cuales están formados por esfuerzos de presión y los viscosos. Las componentes fuera de la diagonal se llaman esfuerzos de corte y consisten



solamente de esfuerzos viscosos. En la ecuación (1.9), cada componente σ_{ij} se define como el esfuerzo en la dirección j que actúa sobre una carga cuya normal está en la dirección i .

La fuerza superficial que actúa sobre la superficie se expresa como:

$$d\vec{F}_{\text{Superficie}} = \sigma \cdot \hat{n}dA$$

Por tanto, la fuerza de superficie total que actúa sobre la superficie de control está dada por

$$\sum \vec{F}_{\text{Superficiales}} = \int_{SC} \sigma \cdot \hat{n}dA \quad (1.12)$$

De (1.10) y (1.12) se obtiene la ecuación de conservación del momento lineal de la mecánica de fluidos

$$\sum \vec{F} = \int_{VC} \rho \vec{g}dV + \int_{SC} \sigma \cdot \hat{n}dA \quad (1.13)$$

Utilizando el teorema del transporte de Reynolds proporciona también una expresión de la razón de cambio temporal del momento lineal de un sistema B ; haciendo $b = \vec{V}$, entonces $B = m\vec{V}$ y la ecuación (1.1) se expresa:

$$\sum \vec{F} = \frac{d(m\vec{V})_{\text{Sist}}}{dt} = \int_{VC} \frac{\partial \vec{V}}{\partial t}dV + \int_{SC} (\rho \vec{V})\vec{V} \cdot \hat{n}dA \quad (1.14)$$

Usando (1.13) resulta

$$\int_{VC} \rho \vec{g}dV + \int_{SC} \sigma \cdot \hat{n}dA = \int_{VC} \frac{\partial \vec{V}}{\partial t}dV + \int_{SC} (\rho \vec{V})\vec{V} \cdot \hat{n}dA \quad (1.15)$$

Donde σ es el tensor de esfuerzos. Esta ecuación es válida para volúmenes de control



fijos y en movimiento, siempre que \vec{V} se la velocidad absoluta ¹.

1.2.4. Ecuación de Cauchy

La ecuación de Cauchy se deriva de la ecuación del momento lineal. El teorema de la divergencia de Gauss puede extenderse también para tensores y tiene prácticamente la misma forma que en (1.3)

$$\int_V \nabla \cdot \mathbf{T} dV = \oint_s \mathbf{T} \cdot \hat{n} dA \quad (1.16)$$

Donde \mathbf{T} es un tensor de segundo orden, en este caso una matriz de 3x3, con el teorema de la divergencia extendido se pueden expresar las integrales de superficie en la ecuación (1.15) en integrales de volumen, en efecto.

Si en (1.16) sustituimos $\mathbf{T} = (\rho\vec{V})\vec{V}$, un tensor de segundo orden, entonces, el ultimo termino en (1.15) se transforma en

$$\int_{SC} (\rho\vec{V})\vec{V} \cdot \hat{n} dA = \int_{CV} \nabla \cdot (\rho\vec{V})\vec{V} dV$$

Donde $\vec{V}\vec{V}$ es el producto exterior ² del vector velocidad consigo mismo

También aplicando (1.16) a la otra integral de superficie en (1.15) obtenemos

$$\int_{SC} \sigma \cdot \hat{n} dA = \int_{VC} \nabla \cdot \sigma dV$$

¹Velocidad absoluta se refiere a la velocidad medida desde un observador fijo en todo momento

²Para dos vectores $\vec{A} = (A_x, A_y, A_z)$ y $\vec{B} = (B_x, B_y, B_z)$ el producto exterior se denota por $\vec{A} \otimes \vec{B}$ o $\vec{A}\vec{B}$ y se define como

$$\vec{A} \otimes \vec{B} = \begin{pmatrix} A_x B_x & A_x B_y & A_x B_z \\ A_y B_x & A_y B_y & A_y B_z \\ A_z B_x & A_z B_y & A_z B_z \end{pmatrix}$$



Por lo tanto, la ecuación (1.15) se transforma en una integral de volumen

$$\int_{VC} \left[\frac{\partial(\rho \vec{V})}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \vec{V} \vec{V}) - \rho \vec{g} - \nabla \cdot \sigma \right] dV = 0 \quad (1.17)$$

Esta ecuación es válida para cualquier volumen de control y representa la forma diferencial para la conservación de la cantidad de momento lineal, conocida como ecuación de Cauchy

$$\frac{\partial(\rho \vec{V})}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \vec{V} \vec{V}) = \rho \vec{g} + \nabla \cdot \sigma \quad (1.18)$$

La ecuación anterior es válida si el flujo es compresible o incompresible y corresponde a tres ecuaciones escalares para problemas tridimensionales

1.2.5. Ecuación de Navier-Stokes

Cuando un fluido se mueve los esfuerzos que actúan sobre cualquier elemento del fluido se dividen en esfuerzos de presión y esfuerzos viscosos. Así el tensor de esfuerzos puede representarse como

$$\sigma = \begin{pmatrix} \sigma_{xx} & \sigma_{xy} & \sigma_{xz} \\ \sigma_{yx} & \sigma_{yy} & \sigma_{yz} \\ \sigma_{zx} & \sigma_{zy} & \sigma_{zz} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -P & 0 & 0 \\ 0 & -P & 0 \\ 0 & 0 & -P \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \tau_{xx} & \tau_{xy} & \tau_{xz} \\ \tau_{yx} & \tau_{yy} & \tau_{yz} \\ \tau_{zx} & \tau_{zy} & \tau_{zz} \end{pmatrix} \quad (1.19)$$

Donde cada componente τ_{ij} corresponde al tensor de esfuerzo τ . Para un flujo de fluido compresible la presión P está relacionada con la temperatura y la densidad por medio de la ecuación de estado; introduciendo así una nueva incógnita, la temperatura T , y una nueva ecuación. Si el fluido es incompresible no se tiene ecuación de estado y la presión se define como la presión mecánica (presión media)



$$P = P_m = -\frac{1}{3}(\sigma_{xx} + \sigma_{yy} + \sigma_{zz}) \quad (1.20)$$

Limitando solo el estudio a fluidos newtonianos entonces, el tensor de esfuerzos es linealmente proporcional al tensor de razón de deformación

$$\tau = 2\mu\epsilon \quad (1.21)$$

Donde μ se conoce como viscosidad y ϵ es el tensor de razón de deformación

$$\epsilon = \begin{pmatrix} \epsilon_{xx} & \epsilon_{xy} & \epsilon_{xz} \\ \epsilon_{yx} & \epsilon_{yy} & \epsilon_{yz} \\ \epsilon_{zx} & \epsilon_{zy} & \epsilon_{zz} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \frac{\partial u}{\partial x} & \frac{1}{2}\left(\frac{\partial u}{\partial y} + \frac{\partial v}{\partial x}\right) & \frac{1}{2}\left(\frac{\partial u}{\partial z} + \frac{\partial w}{\partial x}\right) \\ \frac{1}{2}\left(\frac{\partial v}{\partial x} + \frac{\partial u}{\partial y}\right) & \frac{\partial v}{\partial y} & \frac{1}{2}\left(\frac{\partial v}{\partial z} + \frac{\partial w}{\partial y}\right) \\ \frac{1}{2}\left(\frac{\partial w}{\partial x} + \frac{\partial u}{\partial z}\right) & \frac{1}{2}\left(\frac{\partial w}{\partial y} + \frac{\partial v}{\partial z}\right) & \frac{\partial w}{\partial z} \end{pmatrix}$$

Además, se ha asumido que el flujo es incompresible ($\rho = cte$) y aproximadamente isotérmico; quitándose con esta última suposición la ecuación de conservación de la energía e indicando también que varias propiedades del fluido, como la viscosidad μ , son constantes. En coordenadas cartesianas, el tensor de esfuerzos σ se convierte en

$$\sigma = \begin{pmatrix} -P & 0 & 0 \\ 0 & -P & 0 \\ 0 & 0 & -P \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} 2\mu\frac{\partial u}{\partial x} & \mu\left(\frac{\partial u}{\partial y} + \frac{\partial v}{\partial x}\right) & \mu\left(\frac{\partial u}{\partial z} + \frac{\partial w}{\partial x}\right) \\ \mu\left(\frac{\partial v}{\partial x} + \frac{\partial u}{\partial y}\right) & 2\mu\frac{\partial v}{\partial y} & \mu\left(\frac{\partial v}{\partial z} + \frac{\partial w}{\partial y}\right) \\ \mu\left(\frac{\partial w}{\partial x} + \frac{\partial u}{\partial z}\right) & \mu\left(\frac{\partial w}{\partial y} + \frac{\partial v}{\partial z}\right) & 2\mu\frac{\partial w}{\partial z} \end{pmatrix}$$

y por tanto



$$\begin{aligned}
\nabla \cdot \sigma &= - \begin{pmatrix} \frac{\partial P}{\partial x} \\ \frac{\partial P}{\partial y} \\ \frac{\partial P}{\partial z} \end{pmatrix}^T + \begin{pmatrix} 2\mu \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \mu \frac{\partial}{\partial y} \left(\frac{\partial u}{\partial y} + \frac{\partial v}{\partial x} \right) + \mu \frac{\partial}{\partial z} \left(\frac{\partial u}{\partial z} + \frac{\partial w}{\partial x} \right) \\ \mu \frac{\partial}{\partial x} \left(\frac{\partial v}{\partial x} + \frac{\partial u}{\partial y} \right) + 2\mu \frac{\partial^2 v}{\partial y^2} + \mu \frac{\partial}{\partial z} \left(\frac{\partial v}{\partial z} + \frac{\partial w}{\partial y} \right) \\ \mu \frac{\partial}{\partial x} \left(\frac{\partial w}{\partial x} + \frac{\partial u}{\partial z} \right) + \mu \frac{\partial}{\partial y} \left(\frac{\partial w}{\partial y} + \frac{\partial v}{\partial z} \right) + 2\mu \frac{\partial^2 w}{\partial z^2} \end{pmatrix}^T \\
&= - \begin{pmatrix} \frac{\partial P}{\partial x} \\ \frac{\partial P}{\partial y} \\ \frac{\partial P}{\partial z} \end{pmatrix}^T + \mu \begin{pmatrix} \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial z^2} \\ \frac{\partial^2 v}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v}{\partial z^2} \\ \frac{\partial^2 w}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 w}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 w}{\partial z^2} \end{pmatrix}^T \\
&= -\nabla P + \mu \nabla^2 \vec{V}
\end{aligned} \tag{1.22}$$

Donde T , en este caso representa la transpuesta del vector columna. En el segundo termino de (1.22) se ha utilizado el hecho de que el fluido es incompresible y por ende satisface (1.8), sustituyendo la ecuación (1.22) en la ecuación de Cauchy, (ecuación 1.18), se obtiene la forma compacta

$$\rho \left[\frac{\partial \vec{V}}{\partial t} + (\nabla \cdot \vec{V}) \vec{V} \right] = -\nabla P + \rho \vec{g} + \mu \nabla^2 \vec{V} \tag{1.23}$$

Conocida como la ecuación de Navier-Stokes. Esta ecuación no lineal de segundo orden, junto con la ecuación de continuidad para fluidos incompresibles, es válida para cualquier sistema de coordenadas ortogonal y forma la base de la mecánica de fluidos.

Parámetros de escalamiento	Descripción	Dimensiones
L	Longitud característica	L
V_0	Velocidad característica	LT^{-1}
f	Frecuencia característica	T^{-1}
$P_0 - P_\infty$	Diferencia de presión de referencia	$ML^{-1}L^{-2}$
g	Aceleración gravitacional	LT^{-2}

Tabla 1.1: Parámetros de escalamiento, L , M y T representan las unidades de longitud, masa y tiempo

Por otra parte. Se pueden utilizar parámetros de escalamiento para eliminar las dimen-



siones en las ecuaciones de Navier-Stokes de tal manera que puedan compararse adecuadamente los órdenes de magnitud de los diversos términos éstas. Algunos parámetros para adimensionalizar las ecuaciones de Navier-Stokes se encuentran en la tabla 1.1

Las variables adimensionales utilizando los parámetros de escalamiento de la tabla 1.1 comúnmente usadas son

$$t_D = fT \quad \vec{r}_D = \left(\frac{x}{L}, \frac{y}{L}, \frac{z}{L} \right) \quad \vec{V}_D = \frac{\vec{V}}{V_0}$$

$$P_D = \frac{P - P_\infty}{P_0 - P_\infty} \quad \vec{g}_D = \frac{\vec{g}}{g} \quad \nabla_D = L\nabla$$

La ecuación (1.23) puede escribirse en términos de las variables adimensionales transformándose en

$$\left(\frac{fL}{V_0} \right) \frac{\partial V_D}{\partial t_D} + (\nabla_D \cdot \vec{V}_D) \vec{V}_D = - \left(\frac{P_0 - P_\infty}{\rho V_0^2} \right) \nabla_D P_D + \left(\frac{gL}{V_0^2} \right) \vec{g}_D + \left(\frac{\mu}{\rho V_0 L} \right) \nabla_D^2 \vec{V}_D$$

Cada agrupación adimensional de parámetros recibe un nombre especial

Número de Strouhal $St = \frac{fL}{V_0}$

Número de Euler $Eu = \frac{p_0 - P_\infty}{\rho V_0^2}$

Número de Froude $Fr = \left(\frac{V_0^2}{gL} \right)^{\frac{1}{2}}$

Número de Reynolds $Re = \frac{\rho V_0 L}{\mu}$

De esta manera, la ecuación de Navier-Stokes puede escribirse como

$$St \frac{\partial V_D}{\partial t_D} + (\nabla_D \cdot \vec{V}_D) \vec{V}_D = -Eu \nabla_D P_D + \frac{1}{Fr^2} \vec{g}_D + \frac{1}{Re} \nabla_D^2 \vec{V}_D \quad (1.24)$$



La importancia relativa de los términos en la ecuación (1.24) sólo depende de las magnitudes relativas de los parámetros adimensionales St , Eu , Rf y Re

En microfluídica generalmente se trabaja en régimen de flujo laminar, este tipo de régimen está determinado por el número de Reynolds, el cual representa la relación entre las fuerzas inerciales y las fuerzas viscosas. Este número es resultado de los experimentos realizados por Osborne Reynolds

$$Re = \frac{\text{Fuerzas inerciales}}{\text{Fuerzas viscosas}} = \frac{\rho V_0 L}{\mu}$$

Para números de Reynolds bajos ($Re < 2000$) las fuerzas viscosas son las que predominan y el flujo es laminar [3]. Conforme Re se incrementa a valores mayores a 2000, las fuerzas inerciales dominan produciendo una tendencia a la inestabilidad provocando turbulencia.

De acuerdo con la expresión del número de Reynolds, la velocidad y la longitud característica junto con las propiedades del fluido determinan el régimen dinámico. En microfluídica las velocidades son bajas y la longitud característica es de orden de micrómetros, por esta razón el régimen dinámico es comúnmente de tipo laminar (Figura 1.1)

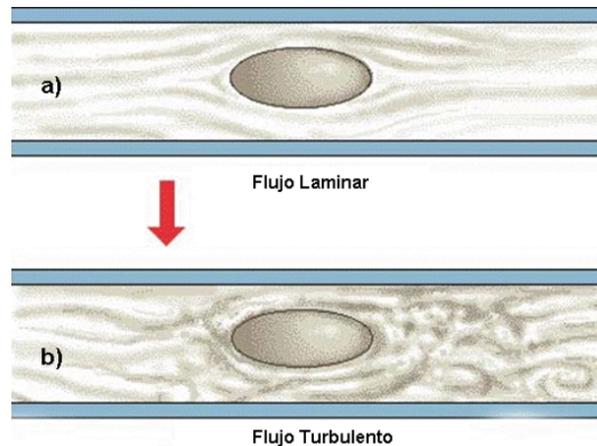


Figura 1.1: En a) se muestra un esquema de flujo laminar alrededor de una partícula central, en b) se muestra un esquema de flujo turbulento en el que se originan patrones circulares alrededor de la partícula central



1.3. Resistencia hidráulica

La resistencia hidráulica R es una variable que se debe de considerar en la caracterización de dispositivos microfluídicos, se define como la oposición de un fluido a circular a través de un canal, su comportamiento es equivalente a la resistencia eléctrica en un circuito eléctrico. Al igual que en la resistencia eléctrica, en la resistencia hidráulica hay una disipación de energía en forma de calor provocada por la viscosidad del fluido, esta propiedad influye directamente en la presión ΔP dentro del canal [3], de esta manera tenemos

$$\Delta P = RQ \quad (1.25)$$

donde Q es el gasto volumétrico. La resistencia hidráulica también depende de la geometría, para el de placas paralelas infinitas (Figura 1.2) se tiene

$$R = 12\mu L \frac{1}{h^3 w} \quad (1.26)$$

Donde L es la longitud del canal, h es la altura y w es el ancho del microcanal [8]

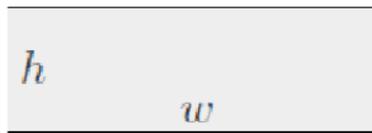


Figura 1.2: Geometría de un par de placas paralelas infinitas de altura h y ancho w

Como la resistencia hidráulica es equivalente a la resistencia eléctrica, por lo tanto para el diseño y caracterización de microcanales se consideran circuitos hidráulicos de tipo serie y paralelo

La diferencia de presión en un microcanal compuesto de diferentes estructuras conectadas en serie (ver figura 1.3) se expresa como



$$\Delta P = (R_1 + R_2 + \dots + R_n)Q \quad (1.27)$$



Figura 1.3: Arreglo de dos microcanales conectados en serie

En el caso de canales conectados en paralelo (Figura 1.4), la diferencia de presión se expresa como

$$\Delta P = \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \dots + \frac{1}{R_n} \right) Q \quad (1.28)$$

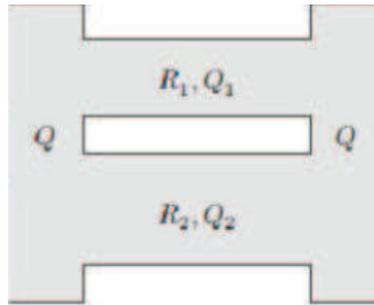


Figura 1.4: Arreglo de dos canales conectados en paralelo

1.4. Ecuación de convección-difusión

La difusión es el proceso en el cual se transporta materia, de una zona de mayor concentración a una de menor concentración, mediante el movimiento estocástico de las partículas. Las expresiones matemáticas que describen este fenómeno son derivadas del concepto de movimiento Browniano y de las leyes Stokes - Einstein y de Fick. Este fenómeno es la base del funcionamiento de dispositivos microfluídicos como los separadores, filtros H y mezcladores.



El movimiento de estas partículas es similar al que presenta un caminante al azar, en donde se observa que su andar no es uniforme y no sigue una trayectoria recta de tal manera que el desplazamiento cuadrático medio se describe por [4]

$$l(n) \cong 4Dt \tag{1.29}$$

Donde $l(n)$ es la posición de la n -ésima partícula, D es el coeficiente de difusión y t es el tiempo de difusión y es el tiempo que tarda en recorrer de la posición inicial a la final. El coeficiente de difusión determina la velocidad de difusión de la concentración en una cierta distancia.

El tiempo de difusión de las partículas dependerá de las características del fluido, por tanto es necesario considerar la viscosidad. Paul Langevin expuso el equilibrio mecánico de una partícula inmersa en un fluido sujeta a las fuerzas de fricción: su propia inercia y a la presencia de colisiones, matemáticamente se define como [4]

$$\frac{du}{dt} - \beta u = f(t) \tag{1.30}$$

Donde u es una de las componentes de velocidad de la partícula a difundir y β es el coeficiente de fricción. Con la ecuación (1.30) y el tiempo de difusión se encuentra la fórmula de Einstein

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\mu r} \tag{1.31}$$

Donde k_B es la constante de Boltzman, T es la temperatura, μ es la viscosidad del fluido y r es el radio de la partícula, esta expresión se utiliza para obtener el coeficiente de difusión de ciertas partículas.

Tanto el movimiento Browniano como la ecuación de Einstein sólo consideran el movimiento de partículas aisladas, Fick expresa matemáticamente este fenómeno desde el punto de vista de la concentración [4]



$$\vec{J}_\alpha = -D\rho\nabla C_\alpha \quad (1.32)$$

Donde \vec{J} es la densidad de corriente de la masa del soluto (partículas), ∇C_α es el gradiente de concentración. Aplicando la ecuación de continuidad, Ec. (1.5) a (1.32) obtenemos

$$\frac{\partial C_\alpha}{\partial t} + \vec{V} \cdot \nabla C_\alpha = D\nabla^2 C_\alpha \quad (1.33)$$

Esta ecuación es conocida como la ecuación de convección difusiva y de ella se obtiene la ecuación de difusión considerando un sólo soluto, por lo que se puede suprimir el subíndice α considerando la velocidad del fluido como cero la convección desaparece, por lo tanto

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\nabla^2 C \quad (1.34)$$

La expresión anterior es conocida como la ecuación de difusión, con la solución de ésta se obtiene la distancia característica sobre las cuales la concentración varia.

1.5. El Efecto de Magnetoresistencia

La magnetoresistencia (MR) es el efecto durante el cual ocurrirá un cambio en la resistencia del material conductor cuando se le aplica un campo magnético externo \vec{B} . Este efecto fue descubierto por primera vez en 1851 por William Thomson, conocido por Lord Kelvin. Matemáticamente se expresa como

$$R = f(B) \quad (1.35)$$

El porcentaje de magnetoresistencia se determina con la expresión

$$MR \% = \frac{R_{(H=H_{\text{sat}})} - R_{(H=0)}}{R_{(H=0)}} = \frac{\Delta R}{R} \quad (1.36)$$

Donde H_{sat} es el campo de saturación

Con el efecto MR no se puede obtener cambios en la resistencia de más del 5%. Sin embargo el progreso de la microelectrónica y la tecnología de estado sólido a finales del siglo xx permitieron las aplicaciones del efecto MR en sensores industriales de alta sensibilidad y amplio rango dinámico

1.5.1. Efecto de Magnetoresistencia Gigante (GMR)

El Efecto de Magnetoresistencia Gigante (GMR) mejora el efecto MR al mostrar un gran cambio en la resistencia que puede ascender hasta 65% [6]

Una estructura GMR típica consiste en un par de capas de película delgada ferromagnética, generalmente tomadas de los metales de transición (Fe, Co, Ni), separadas por una capa conductora no magnética, por ejemplo Cr, Cu, Ag o Au. El cambio en la resistencia de esta multicapa surge cuando el campo magnético aplicado externamente alinea los momentos magnéticos de las capas magnéticas sucesivas como se muestra esquemáticamente

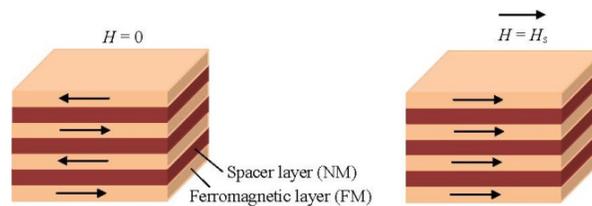


Figura 1.5: Estructura GMR típica

El efecto GMR se deduce de la interacción de los electrones portadores de corriente y la magnetización del material magnético. Una vez que se encuentra presente un campo magnético, la dispersión de electrones dependiente del espín se reduce dentro de la estructura y la resistencia lectora disminuye [6]. La Figura 1.6 muestra una red de resistencias

utilizada para modelar la estructura GMR más simple (una estructura de tres capas).

Los electrones de spin-arriba y spin-abajo están representados por dos circuitos paralelos y la resistencia de las diferentes capas

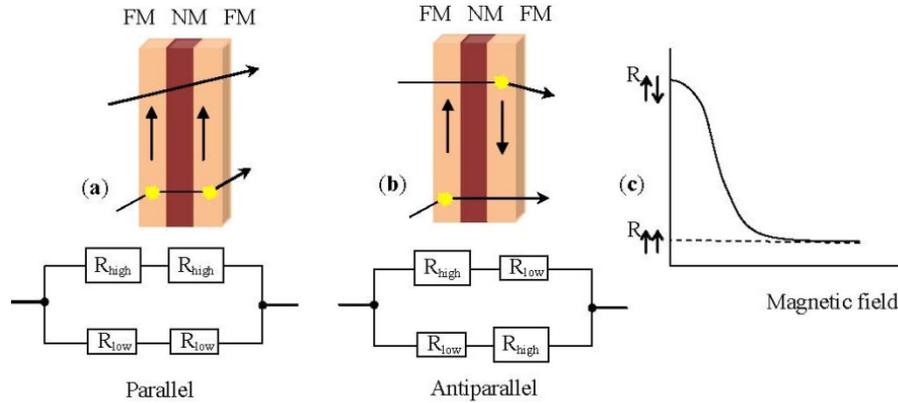


Figura 1.6: (a) Disposición paralela de una estructura de tres capas, que consiste en un par de capas ferromagnéticas (FM) separadas por una capa no magnética (NM) con la red de resistencia equivalente; (b) Disposición antiparalela de la misma estructura de tres capas con la red de resistencia equivalente; (c) Ilustración gráfica de la variación de resistencia en función del campo magnético aplicado

Un parámetro principal para producir una resistencia GMR efectiva es variar el espesor de la capa de separación (la capa de Cr no magnética (Figura 1.8), que se observó en los primeros resultados obtenidos por Baibich et al. en 1988 [6].

La resistencia del material se puede expresar con la siguiente ecuación

$$R = R_0 + \frac{1}{2} \Delta R_{\text{máx}} \sin \theta_f \quad (1.37)$$

Donde

$$R_0 = R_{\text{paralelo}} + \frac{1}{2} \Delta R_{\text{máx}}$$

$$\Delta R_{\text{máx}} = R_{\text{antiparalela}} - R_{\text{paralela}}$$



θ_f ; Es el ángulo de orientación de la capa libre de magnetización con respecto al eje longitudinal del material

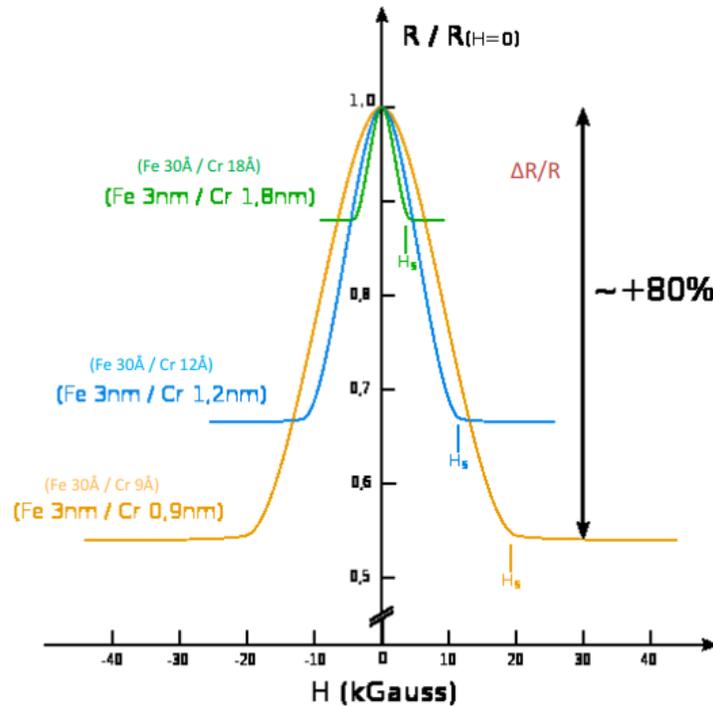


Figura 1.7: Respuesta del cambio de resistencia ΔR del material al variar la capa de Cr no magnético a la aplicación de un campo magnético H , El mayor cambio de resistencia se observa en la curva naranja reduciendo el espesor de la capa de cromo. H_s es el campo de saturación después del cual el material dejará de responder al cambio del campo H [6]

1.6. Nanopartículas magnéticas

La nanotecnología es uno de los mayores avances científicos y tecnológicos del siglo XXI. Múltiples campos de la ciencia y la industria buscan su desarrollo con el fin de darles una aplicación. Los dispositivos de tamaño nanométrico son aquellos comprendidos en la escala entre 1 y 100 nm. Las nanopartículas (NP) se sitúan en esta escala de tamaño entre las moléculas y estructuras microscópicas, tienen la característica de poseer propiedades diferentes a las de los sólidos macroscópicos, aun teniendo la misma composición química. En biomedicina se presentan como una estrategia esperanzadora especialmente en el campo



del diagnóstico, como agentes de contraste y tratamiento de enfermedades como soporte de medicamentos y de nuevas terapias.

1.6.1. Comportamiento magnético

El magnetismo es una propiedad de la materia que surge como consecuencia de la existencia de partículas con masa y carga como los electrones, que cuando giran, generan un dipolo magnético (regiones donde el magnetismo aparece concentrado). Los electrones girando en torno al núcleo son equivalentes a corrientes circulares o elípticas dentro de las moléculas que generan sus propios campos magnéticos. En función de las características electrónicas de un átomo se producen los diferentes comportamientos magnéticos más comunes de un material: diamagnetismo, paramagnetismo y ferromagnetismo.

Los materiales diamagnéticos son aquellos cuyos átomos presentan orbitales atómicos completos. Sus momentos magnéticos están apareados ya que el giro de los spines se compensa, resultando átomos magnéticamente neutros. Así, la susceptibilidad magnética (propiedad que mide el grado de magnetización ante un campo magnético externo aplicado) de estos materiales será ligeramente negativa, $\chi < 0$, y un campo magnético aplicado sobre ellos se verá repelido. Los demás comportamientos magnéticos se producen como consecuencia de existir electrones desapareados en algún orbital atómico. En los materiales paramagnéticos los electrones se orientan al aplicar un campo magnético. Esto se debe a que en presencia del campo magnético, los spines tienden a orientarse en el estado de más baja energía, es decir, en la misma dirección que el campo ($\chi > 0$, $\chi < 1$) Cuando el campo magnético se elimina, la agitación térmica fuerza a los spines a orientarse de forma aleatoria, de forma que no hay comportamiento magnético remanente

Los materiales ferromagnéticos presentan un comportamiento magnético cooperativo, con el fin de disminuir la energía magnetostática, que es la energía potencial producida por el campo magnético externo. Este comportamiento lleva a que los spines atómicos se alineen paralelamente en secciones denominadas dominios magnéticos, que están separadas por regiones denominadas paredes de Bloch. Dentro de cada dominio, los spines están alineados paralelamente, pero el sentido de los spines es diferente entre dominios de forma que



todos ellos se compensan y el resultado de toda la masa de material es una magnetización nula. Los dominios cuentan con un tamaño concreto, entre uno y cientos de micrómetros. Si se reduce el tamaño de un material ferromagnético hasta alcanzar este tamaño crítico menor que un dominio, se estará generando un sistema monodominio. Este cambio es fundamental, ya que aparece un nuevo comportamiento magnético, el Superparamagnetismo. El comportamiento superparamagnético se define por poseer una susceptibilidad magnética elevada, propia de materiales ferromagnéticos, pero con la característica de poder voltear los spines de forma aleatoria bajo la influencia de la temperatura, propia del paramagnetismo. Las Nanopartículas Superparamagnéticas presentan coercividad nula, es decir que el campo magnético necesario que habría que aplicar a las partículas para lograr desmagnetizarlas una vez alcanzada la magnetización de saturación (estado en el que todos los dominios del material están orientados al mismo sentido), es cero. La consecuencia es que una vez que se retire el campo magnético aplicado no presentan ninguna magnetización. Este hecho es fundamental, ya que implica que las nanopartículas no van a tener actividad una vez introducidas in vivo hasta que se aplique un campo magnético y que la actividad se eliminará cuando lo haga el campo.

1.6.2. Curva de magnetización

Los átomos y moléculas están formados por partículas cargadas positiva y negativamente y que, en conjunto son eléctricamente neutros. Al girar los electrones al rededor del núcleo los electrones producen campos magnéticos internos \vec{B}_i y con ello un momento magnético \vec{m} , la suma de las diversas m es igual a cero, a causa de la orientación aleatoria de \vec{m} .

Cuando se aplica un campo externo \vec{B} los momentos de los electrones se alinean en mayor o menor medida con \vec{B} de modo que el momento magnético total no es cero.

La magnetización se define como el momento dipolar magnético por unidad de volumen, de manera que el momento dipolar $d\vec{m}$ de un pequeño volumen dv será



$$d\vec{m} = \vec{M}(\vec{r})dv \quad (1.38)$$

Así que el momento dipolar total de un volumen V será

$$m_{\text{total}} = \int_V \vec{M}(\vec{r})dv \quad (1.39)$$

En el vacío $\vec{M} = 0$, de lo que se obtiene

$$\nabla \vec{H} = \vec{J}_f \quad \text{o} \quad \nabla \times \left(\frac{\vec{B}}{\mu_0} \right) = \vec{J}_f \quad (1.40)$$

donde \vec{J}_f es la densidad de corriente volumétrica libre. En un medio material, $\vec{M} \neq 0$, como resultado de lo cual \vec{B} cambia

$$\nabla \times \left(\frac{\vec{B}}{\mu_0} \right) = \nabla \times \vec{H} + \nabla \times \vec{M} \quad (1.41)$$

por tanto

$$\vec{B} = \mu_0(\vec{H} + \vec{M}) \quad (1.42)$$

La relación expresada en (1.42) es válida para todos los materiales, sean lineales o no.

En los materiales lineales \vec{M} en [A/m] depende linealmente de \vec{H} , es decir

$$\vec{M} = \chi_m \vec{H} \quad (1.43)$$

donde χ_m es la susceptibilidad magnética del medio, esta es un valor del grado de susceptibilidad (o sensibilidad) de un material a un campo magnético.



Sustituyendo (1.43) en (1.42) obtenemos

$$\vec{B} = \mu_0(1 + \chi_m)\vec{H} \quad (1.44)$$

si denotamos $\mu_r = 1 + \chi_m$ Obtenemos

$$\vec{B} = \mu_0\mu_r\vec{H} \quad (1.45)$$

La susceptibilidad o la permeabilidad relativa μ_r permite clasificar a los materiales de acuerdo con sus propiedades o comportamientos magnéticos. Un material es no magnético cuando $\chi_m = 0$ o $\mu_r = 1$

Dependiendo de los valores de χ y μ_r los materiales se clasifican en Diamagnéticos, paramagnéticos y Ferromagnéticos.

Aunque (1.42) impera sobre todos los materiales en los ferromagnéticos la relación entre \vec{B} y \vec{H} depende de la magnetización previa, o "Historia magnética" del material, la relación entre \vec{B} y \vec{H} dista de ser lineal, salvo en el caso de que $\vec{B} = \mu_o\vec{H}$ y solo es posible representarlo en una curva de magnetización o curva B-H.

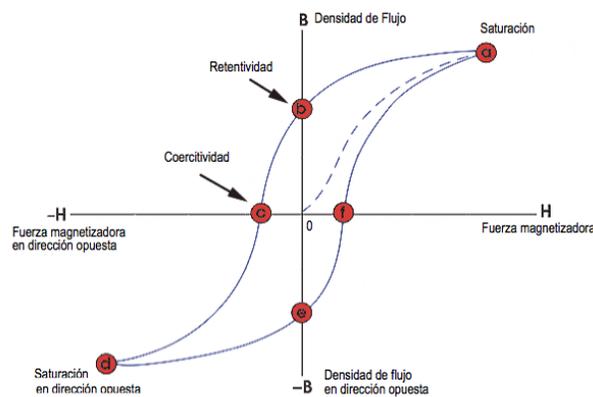


Fig. 10
Curva de Histéresis

Figura 1.8: Curva de magnetización B-H, principales puntos de referencia

Capítulo 2

Estado del Arte

En este capítulo se presentan los últimos avances en el desarrollo de dispositivos microfluídicos para detección y conteo de células cancerosas, se describen también las tecnologías y las condiciones ambientales necesarias para el desarrollo de sistemas microfluídicos para análisis.

2.1. Aspectos tecnológicos de la microfluídica

En 1970 la microelectrónica permite la miniaturización de dispositivos electrónicos en una sola pastilla de silicio en un encapsulado llamados circuitos integrados, con esto empieza la revolución por la miniaturización de diferentes dispositivos que detona en la década de los 80's. Así mismo la elaboración de los primeros *Sistemas Micro Electro Mecánicos* denominados MEMS y con ello, se desarrollan dispositivos como los acelerómetros, micro-motores, etc. Entre estas tecnologías se menciona el concepto de sistemas que requieren microflujos, con ello nace una nueva disciplina llamada microfluídica; que se encarga del estudio y desarrollo de sistemas para manipular cantidades muy pequeñas de fluido que van desde unos cuantos micrómetros hasta cientos de micrómetros.

El primer dispositivo microfluídico consistió en un sistema de cromatografía de ga-

ses, desarrollado alrededor de 1975. Este sistema consistía de microcanales grabados en silicio por los cuales circulaba un gas, un sistema de microinyección electromagnética y un microdetector térmico [2]. Sin embargo, no fue hasta inicios de los años noventa que se empezaron a fabricar sistemas de separaciones, bombas electro-osmóticas, sistemas de separación difusiva, micromezcladores, etc. Durante el mismo período, la microfluídica fue utilizada para aclarar conceptos fundamentales de física, como por ejemplo el estudio de la elongación del ADN, experimento realizado por Steven Chu, él y su equipo utilizaron un sistema microfluídico para controlar una fuerza de estiramiento viscosa y aplicarla al ADN [3].

Los dispositivos microfluídicos presentan la habilidad realizar análisis en paralelo, por lo que en 1990 Manz incorpora el termino Lab on a Chip (Laboratorio en un chip) que integra varias funciones de un laboratorio en un solo chip. Partiendo de esta idea, el 1994 un grupo de investigadores tuvo éxito en la fabricación de un chip que integra tres diferentes: La mezcla de reactivos, desarrollo de reacciones enzimáticas y separación de reactivos [1].

En la Figura 2.4 se presentan entidades biológicas comparables a la escala de los micro y nano fluidos, también ejemplifica algunas tecnologías que se han desarrollado a escala micrométrica.

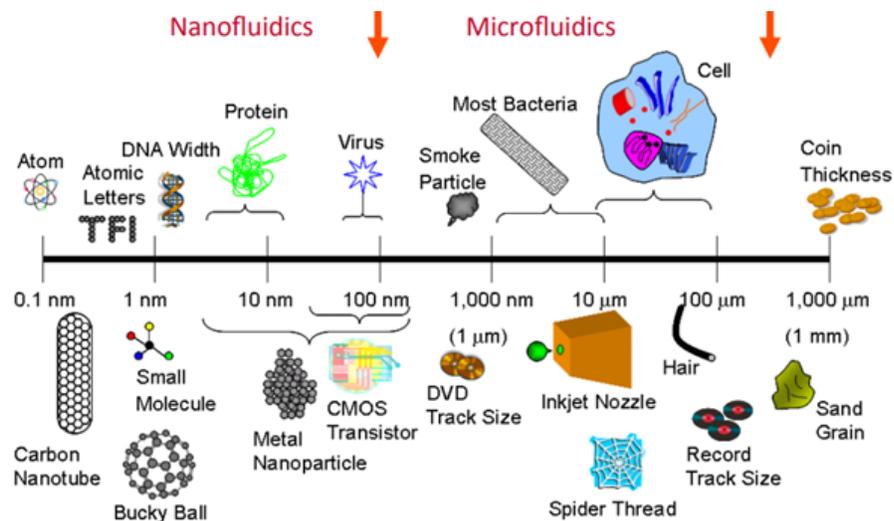


Figura 2.1: Diferentes tecnologías que se encuentran en la escala de los micro y nano fluidos. Las células y algunas entidades biológicas se encuentran entre los 10 y los 100 μm.



A partir del año 2000 se introduce la litografía suave que es la principal técnica de fabricación de dispositivos microfluídicos, cuyo principal material de fabricación es el PDMS (Polidimetilsiloxano) que es un elastómero transparente parecido al silicón; se vierte sobre un molde fabricado con fotolitografía sobre obleas de silicio o de vidrio [4]. Con la llegada de las impresoras 3D surgen nuevas ideas para simplificar más la fabricación de dispositivos microfluídicos, por ejemplo las impresoras 3D con resolución de $100\ \mu\text{m}$. Esto redujo los costos y la microfluídica se popularizó aún más, desde entonces se han desarrollado nuevas técnicas para fabricar dispositivos microfluídicos para diferentes aplicaciones.

En la Figura 2.2 se presenta un chip microfluídico típico para el estudio de comportamiento del fluido al atravesar una bifurcación.

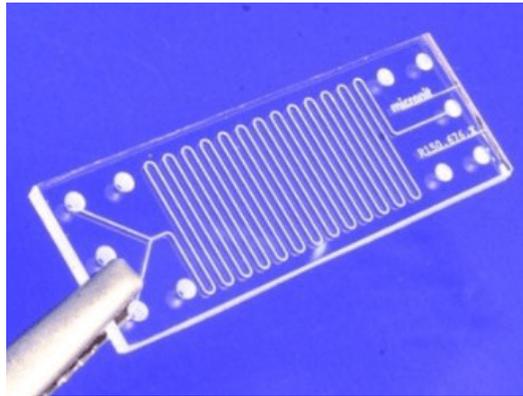


Figura 2.2: Muestra de un chip microfluídico típico para manipulación de pequeñas muestras de fluido.

2.2. Fabricación de microcanales por el método de litografía suave

Durante muchos años los chips microfluídicos eran fabricados con tecnologías derivadas de la industria electrónica de semiconductores, los chips microfluídicos se fabricaban por métodos utilizados para la fabricación de transistores y circuitos integrados, es decir los microcanales se fabrican silicio o vidrio, esto resultaba en ocasiones inaccesible, salas blancas y equipos sofisticados de deposición de películas delgadas son necesario para

el estudio de la microfluídica. Sin embargo, en 1998 el grupo de investigadores dirigido George Whitesides introdujo el método de litografía suave [4], en donde los dispositivos microfluídicos son fabricados en polímeros reduciendo los costos de fabricación, haciendo esta tecnología más accesible.

La litografía suave es una técnica no fotolitográfica con la cual se obtienen réplicas detalladas de patrones en Polidimetilsiloxano (PDMS) un elastómero parecido al silicón. Esta técnica consiste en elaborar primero el modelo del patrón en relieve y posteriormente se realiza la réplica de dicho patrón en el polímero, Para el caso de dispositivos microfluídicos es necesario realizar un sellado de la réplica obtenida con una tapa que confine los canales, el sellado puede ser sobre vidrio, por ejemplo sustratos o portaobjetos. Con esta técnica se pueden obtener microestructuras de 20 a 100 μm [10]. En la Figura 2.3 se presentan las etapas para la fabricación de canales microfluídicos por el método de litografía suave que son básicamente tres, fabricación de moldes, fabricación de réplicas y finalmente el sellado. Las etapas se describen detalladamente a continuación.

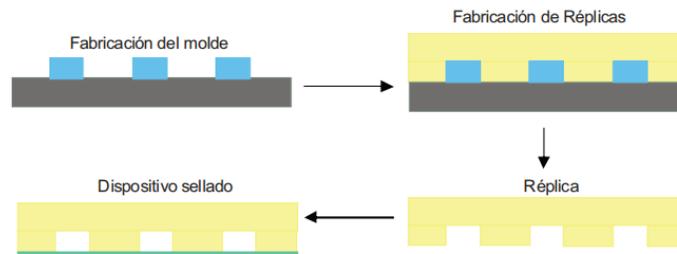


Figura 2.3: Proceso de fabricación de canales microfluídicos por el método de litografía suave [4].

2.2.1. Fabricación de moldes

La litografía es un proceso fundamental en la microfabricación de moldes para canales microfluídicos, consiste en la transferencia de patrones geométricos a un sustrato de silicio o de vidrio. Existen varios tipos de litografía, entre las que se encuentran: La óptica y la de rayos x.

En cualquiera de los procesos litográficos comienza con la deposición de una resina

fotosensible sobre un portaobjetos. Sobre la resina se coloca una máscara la cual tiene áreas transparentes que son las área de la resina a radiar y áreas oscuras que impiden el paso de la radiación [4]. De esta manera se transfiere el diseño plasmado a la máscara (Figura 2.4)

La resina fotosensible más utilizada en el proceso de litografía óptica para la fabricación de moldes es la conocida como SU-8, la cual es una resina epóxica de tipo negativo y fue desarrollada por IBM. La resina se deposita por un proceso llamado *spin-coating* que consiste en colocar la superficie rígida de la oblea de silicio o de vidrio sobre una base giratoria comúnmente llamada base de vacío. La fotoresina se coloca sobre la oblea, la base girando a alta velocidad provoca que la resina se distribuya sobre la oblea, el espesor de esta película depende de la viscosidad de la resina empleada y de la velocidad de giro, variando así desde $3\mu\text{m}$ hasta $500\mu\text{m}$ [11]. De esta manera se pueden obtener relieves tridimensionales directamente polimerizando perfiles profundos en SU-8.

Con la finalidad de reducir los costos de fabricación de los dispositivos para tener una tecnología más accesible, se han desarrollado otros métodos de fabricación de moldes de bajo costo, como la impresión del diseño en materiales en poliestireno termoplástico que al reducir su tamaño quedan estructuras de tamaños micrométricos [10]. Otros métodos de fabricación de moldes de bajo costo siguen el proceso convencional de litografía óptica con la sustitución de la resina SU-8 por resinas adhesivas que polimerizan con la luz UV.

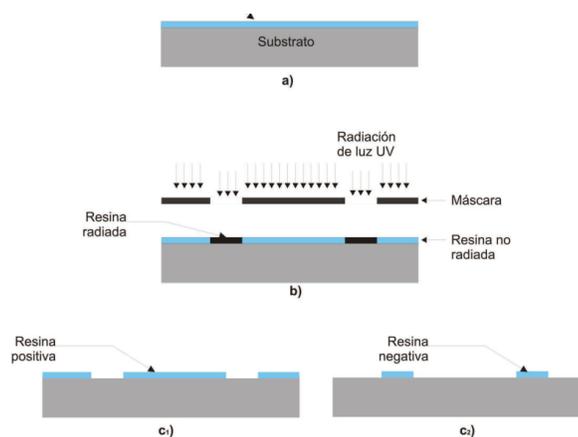


Figura 2.4: Pasos del proceso fotolitográfico [12]. En a) se observa una película de resina depositada sobre un sustrato, en b) se expone la radiación UV al sustrato con la resina, en c1) presenta el resultado del molde cuando se utiliza resina de tipo positivo y en c2) resina tipo negativo.

2.2.2. Fabricación de réplicas

Con el molde fabricado se puede realizar la réplica por micromoldeo, que consiste en la preparación del polímero a utilizar, el más común es el PDMS, el cual se vierte sobre el molde, una vez realizada la polimerización se desprende del molde [12], este proceso se ilustra en la Figura 2.5



Figura 2.5: Proceso para la obtención de réplicas por micromoldeo.

2.2.3. Sellado

El último paso del proceso de fabricación de canales microfluídicos por litografía suave es el sellado del dispositivo con relieves definidos y una tapa que puede ser una capa delgada de PDMS o un sustrato de silicio o vidrio. El pegado se realiza por medio de plasma de aire. El proceso consiste en introducir al plasma tanto el canal de PDMS como la tapa por un minuto permitiendo la oxidación del polímero.

En otras palabras, el plasma realiza un cambio químico temporal sobre las superficies a sellar, transformándose de hidrofóbicas a hidrofílicas. Inmediatamente después, se ponen en contacto las piezas para unir las y formar un sellado irreversible.

El sellado es químicamente irreversible, ya que la oxidación del PDMS por medio del plasma de aire o de oxígeno origina grupos de silanol (Si-OH) en su superficie, y de hidroxilos (-OH) en materiales como el vidrio. Al poner en contacto ambas superficies los grupos polares forman un enlace covalente -O-Si-O- lo que provoca el sellado irreversible. Se recomienda poner en contacto las superficies de inmediato porque la oxidación del PDMS es contrarrestada por el contacto con el medio ambiente [13].

Este proceso es muy efectivo, pero el uso de una cámara de plasma eleva los costos. Ac-



tualmente se ha demostrado que el sellado se puede llevar a cabo por medio de la radiación UV sobre las piezas a sellar [13].

2.3. Aspectos tecnológicos de las MNP

Las nanopartículas magnéticas exhiben propiedades ópticas, eléctricas y magnéticas únicas que pueden ser muy útiles en ciencias de la vida y biomedicina; estas propiedades dependen en gran medida de sus dimensiones, en su mayoría por debajo de 100 nm, y de sus características de área de superficie. Su tamaño es comparable al de las entidades biológicas (por ejemplo, virus, bacterias, células, genes, etc.) y por lo tanto, permite su acoplamiento [5]. Una vez que la superficie de las nanopartículas se recubre con ligandos bioactivos, se pueden unir e interactuar con entidades biológicas antes mencionadas[5][7], lo que proporciona un método clave para etiquetar o abordar estas entidades (Figura 2.7). Otra gran ventaja es su naturaleza magnética; se pueden controlar y manipular mediante un gradiente de campo magnético externo [5]. Los desarrollos recientes en nanotecnología y biotecnología permitieron esta modulación y adaptación de su composición, tamaño, funcionalización de la superficie y propiedades magnéticas manteniendo sus propiedades superparamagnéticas ¹

Además, es posible fabricar partículas con tamaños en el rango de micrómetros simplemente encapsulando las nanopartículas magnéticas en una matriz polimérica durante la fabricación, manteniendo así sus propiedades de superparamagnéticas. Las nanopartículas de Superparamagnéticas generalmente están compuestas de partículas de ferrita (óxido de hierro Fe_3O_4) encapsuladas en una matriz de polímero (Figura 4.16).

El uso de la matriz polimérica también actúa como una capa de funcionalización para la conjugación adicional con moléculas bioactivas o ligandos dirigidos por medio de diferentes tipos de enlaces (anticuerpos, adsorción y enlace covalente) usando, por ejemplo, grupos carboxílicos o amino. Estas técnicas de funcionalización permiten que las partículas se

¹El superparamagnetismo es un efecto que aparece en las nanopartículas ferromagnéticas (Fe_3O_4) Por debajo de la temperatura de Curie o Néel, las partículas consistirán en un solo dominio magnético.



unan a las células, biomoléculas, radionúclidos y muchas otras moléculas dependiendo del campo de trabajo, en la Figura 2.7 se ejemplifica el principio de funcionamiento para detectar células cancerosas a partir de la señal magnética de las nanopartículas.

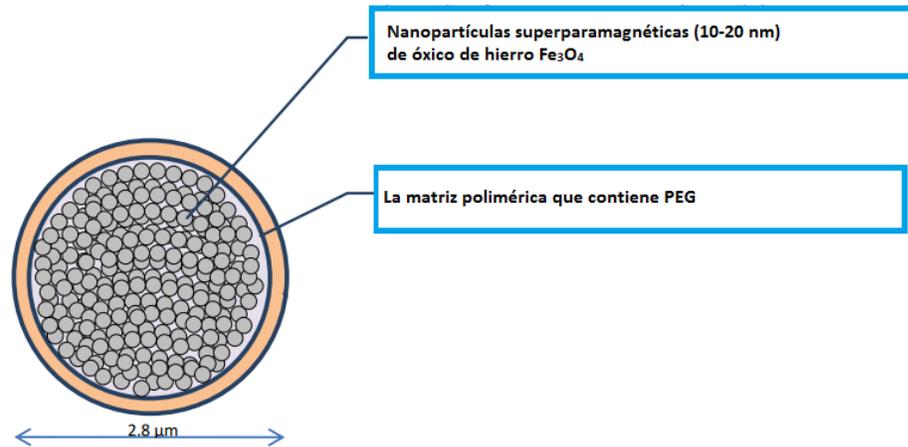


Figura 2.6: Esquema de una partícula superparamagnética

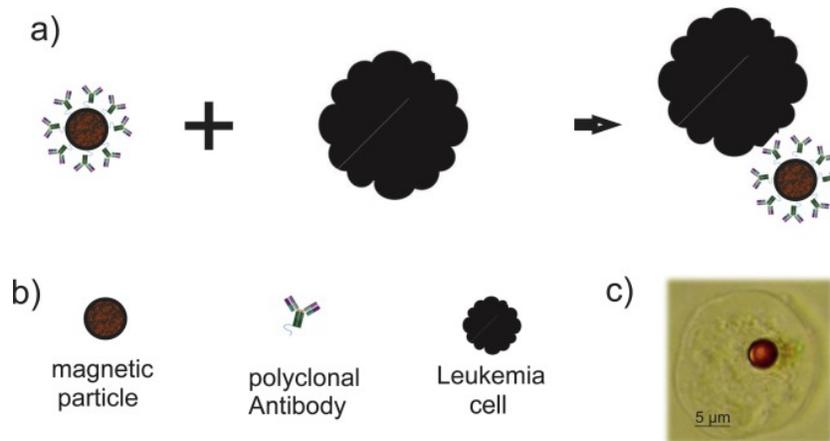


Figura 2.7: En a) se muestra una nanopartícula funcionalizada que interactúa con células cancerosas dando origen a una célula cancerosa etiquetada (LCC), en b) se muestran los elementos independientes y en c) un ejemplo real de una célula etiquetada con una partícula magnética de 5 μm [7]



2.4. Últimos avances en sistemas microfluídicos para el conteo y la detección de células cancerosas

Murad Jamalieh desarrolló un prototipo de biosensor microfluídico para detección de células cancerosas de leucemia unidas a MNPs funcionalizadas con anticuerpos (Figura 2.8), los sensores GMR utilizados para detectar las nanopartículas magnéticas son fabricados por deposición en una portaobjetos, básicamente el sistema integra el sensor, un sistema de magnetoforesis por líneas de corriente y el canal microfluídico en un solo chip. El sistema está constituido por un canal lineal y dos sensores de referencia, opera con un fluido estático, el arrastre de las nanopartículas se realiza generando gradiente magnéticos controlados generados por líneas de corriente.

Se realizaron pruebas para una célula de leucemia aislada previamente, la detección de la célula se realizó con diferencias de velocidad entre un canal de referencia y el canal de interés, en el canal de referencia sólo circulan MNP, mientras que en el canal de detección circulan MNP unidas a células. Intuitivamente se espera que una célula unida a una MNP viaje más lento comparado con una MNP individual. [14]. Las MNPs utilizadas en este trabajo son Dynabeads M270

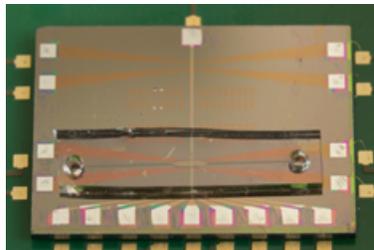


Figura 2.8: Dispositivo microfluídico desarrollado por Murad Jamalieh para la detección de células cancerosas de leucemia [14]

Jongwon Park, presenta el artículo titulado Cuantificación de nanopartículas superparamagnéticas utilizando un sensor magnetoresistencia gigante e imanes permanentes. En este trabajo se realiza la medición cuantitativa de las nanopartículas superparamagnéticas que se inyectaron en un tubo capilar de vidrio. Se utilizaron un par de imanes permanentes

que se colocan de manera diagonal opuestos entre sí para proporcionar campos magnéticos horizontales y verticales para la magnetización de partículas [15].

Georgios Kokkinis publica el artículo titulado Plataforma microfluídica con sensores GMR integrados para la cuantificación de células cancerosas, en este trabajo se desarrolla un separador microfluídico tipo Y (Figura 2.9), mediante un sistema de magnetoforesis activado por microcontrolador las partículas son separadas por diferencias de velocidades, con un sensores GMR integrados y fabricados por deposición en el mismo chip microfluídico, el sistema puede detectar la señal magnética emitida por las MNPs y de esta manera cuantificar células de leucemia tomadas de muestras aisladas, las MNPs utilizadas en este trabajo son Dynabeads M-270 [7].

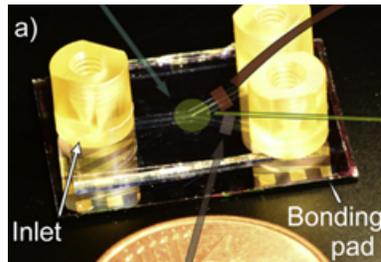


Figura 2.9: Dispositivo microfluídico desarrollado por Georgios Kokkinis para la detección de células cancerosas de leucemia [7].

Younggeun Jo¹, Young Ki Hahn² desarrolló una plataforma de separación de beads magnéticas unidas a entidades biológicas, el sistema está basado en microfluídica y magnetoforesis, la técnica de separación es combinar una técnica llamada *Inertial focusing*; en la cual las partículas magnéticas se alinean al atravesar un canal de tipo sinoidal, la separación se realiza mediante imanes permanentes generando gradiente magnéticos [16].

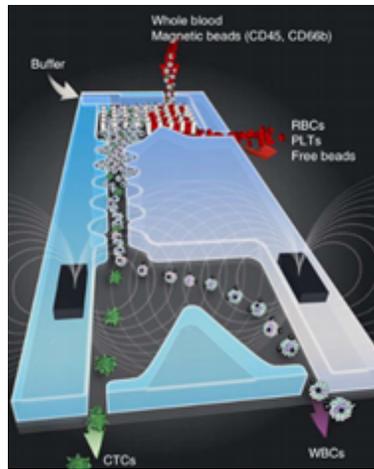


Figura 2.10: Dispositivo microfluídico desarrollado por Young Ki Hahn² para la separación de beads unidas a entidades biológicas

Capítulo 3

Definición del Problema

3.1. Planteamiento del problema

Actualmente en México se tienen tasas de crecimiento mayores en casos de cáncer, esto implica grandes inversiones en el sector salud para el diagnóstico y el tratamiento de esta enfermedad. En los últimos años se han adquirido equipos sofisticados de alto valor para el diagnóstico de cáncer, por ejemplo el citómetro de flujo, que se encarga de la separación y el conteo de células. Sin embargo para la investigación, en ocasiones es difícil acceder a estos equipos, por tanto surge la necesidad de innovar e investigar nuevas tecnologías más baratas que permitan realizar un diagnóstico de cáncer de manera más rápida y confiable.

Actualmente el diagnóstico de cáncer, por ejemplo leucemia, requiere de varias pruebas como son: aspiración y biopsia de la médula ósea, punción lumbar, biopsia de los ganglios linfáticos, Con estas muestras se realizan exámenes al microscopio, citometría de flujo e inmunohistoquímica, pruebas de Cromosomas, Citogenética entre otras pruebas.

Sustituir vasos de precipitado, vasos de cultivos celulares, cromatógrafos de líquidos, citómetros de flujo, por microsistemas que lleven a cabo estos análisis biomédicos y/o químicos, puede reducir costos, reducir tiempos y espacio, la cantidad de muestras es pequeña, entre otros beneficios.



En particular, el uso del citómetros de flujo; que se encarga de la separación y conteo de células a partir de una técnica de activación por fluorescencia puede sustituirse por un sistema microfluídicos para conteo de células. En el estado de arte se presentaron dispositivos microfluídicos desarrollados para detectar y contar de células cancerosas, aunque esta tecnología aun nos es óptima ni comercial.

En nuestro país la investigación en sistemas microfluídicos para detección de células cancerosas es mínimo, y la que existe es reciente como el caso de esta tesis. La tecnología digital y los nuevos sensores magnéticos pueden ayudar a desarrollar dispositivos microfluídicos para análisis en una escala mayor y menos costosos, de esta manera se participa en la innovación y nuevos métodos para lograr la detección y el conteo de células cancerosas en un chip microfluídico.

3.2. Justificación

Hasta hace algunos años se fabricaban dispositivos microfluídicos utilizando sustratos de silicio y equipos sofisticados de deposición y abrasión de películas delgadas derivados de la industria electrónica de semiconductores que son de alto costo. En años recientes se han logrado métodos de fabricaciones menos costosas; como la litografía suave. Los dispositivos microfluídicos son fabricados por medio de la obtención de moldes que pueden ser de silicio o de vidrio, estos avances permiten en la actualidad desarrollar diferentes tecnologías para el análisis de muestras biológicas con aplicaciones en diferentes campos de la medicina y diagnóstico.

Los dispositivos microfluídicos para análisis se espera puedan servir como analizadores de muestras biológicas que puedan servir para el diagnóstico de cáncer. Sustituir vasos de precipitado, vasos de cultivos celulares, cromatógrafos de líquidos, citómetros de flujo, por microsistemas que lleven a cabo estos análisis biomédicos y/o químicos, puede reducir costos, reducir tiempos y espacio, la cantidad de muestras es pequeña, entre otros beneficios.

Actualmente México, cuenta con el *Laboratorio Nacional de Micro y Nano fluidos*



(LABMYN) en Centro de Investigación y Desarrollo tecnológico en Electroquímica (CI-DETEQ) Querétaro; se encarga del desarrollos y estudio de dispositivos micro y nano fluídicos para diferentes aplicaciones.

Por otra parte, el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados de IPN, en la sección de Bioelectrónica se trabaja con diferentes tipos de sensores para el desarrollo de biosensores, en departamento de nanociencias se sintetizan diferentes tipos de nanopartículas con aplicaciones médicas.

México cuenta actualmente con la infraestructura y los recursos para innovar en el campo de los biosensores basados en microfluídica para detección de células cancerosas.

3.3. Objetivos

3.3.1. Objetivo General

Desarrollar y caracterizar un prototipo de sistema basado en microfluídica y sensores GMR comerciales que sea capaz de detectar la señal magnética de una concentración de partículas magnéticas que atraviesan un microcanal recto.

3.3.2. Objetivos particulares

Para cumplir con el objetivo general se tienen contemplados una serie de objetivos específicos. Cada objetivo específico está conformado por un conjunto de acciones que se detallan a continuación.

1. Revisión del estado del arte sobre dispositivos microfluídicos y sus aplicaciones en la detección y el conteo de células cancerosa. Basándonos en la revisión y el análisis del estado de arte se determinarán algunos objetivos a resolver en esta tesis. El planteamiento del objetivo general se basará en la problemática actual en el desarrollo de



dispositivos microfluídicos en México.

Etapa de modelado

1. Se realizará un modelado de la distribución de nanopartículas magnéticas en un microcanal recto bajo la influencia de un campo magnético constante, El modelado se realiza para dos casos.

- a)* Con un campo magnético generado por un imán permanente de neodimio.
- b)* Con una campo magnético generado por una línea de corriente.

El modelo se resolverá de manera numérica mediante el método de los elementos finitos (FEM).

Desarrollo experimental del sistema microfluídico

La etapa de desarrollo experimental se divide en los siguientes puntos

1. Diseño y fabricación de microcanales rectos con la técnica de litografía suave.
2. Fabricación por deposición de películas delgadas de oro y titanio en sustratos para generar líneas de corriente.
3. Implementación del sistema electrónico para la detección de la señal magnética emitida por las MNPs usando sensores GMR comerciales.
4. Realizar las pruebas pertinentes con partículas magnéticas Dynabeads M-270.
5. Realizar la pruebas pertinentes y caracterizar el sistema mediante la obtención de algunos parámetros como la resolución, sensibilidad, etc.
6. Obtención de la curva de calibración del sistema para diferentes concentraciones de Dynabeads-M270 y la respuesta del sistema.

Capítulo 4

Método y materiales

En este capítulo se describen los materiales utilizados y métodos seguidos para el desarrollo de la tesis. Se describen cada una de las etapas desarrolladas para llegar a la solución del objetivo planteado.

4.1. Modelado por FEM de la distribución de MNPs en un microcanal recto

Para que las nanopartículas magnéticas emitan una señal detectable para el sensor GMR es necesario magnetizarlas con una fuente de campo magnético externa. En el estado del arte se presentaron algunos sistemas donde la magnetización se realiza a partir del campo generado por líneas de corriente, y por imanes permanentes.

En esta sección se describe la implementación de un modelo de la distribución de MNPs dentro del microcanal cuando las MNPs son afectadas por dos fuerzas principalmente: la fuerza de arrastre del fluido y la fuerza magnética externa. En caso de la fuerza magnética se modela con dos fuentes de campo magnético, con una disposición de imanes permanente de neodimio y con líneas de corriente de oro.

En la Figura 4.1 se presenta un diagrama del sistema implementado, en este caso la magnetización de las MNPs se realiza con líneas de corriente. En la figura 4.2 se presenta un diagrama donde la magnetización se realiza con imanes permanentes.

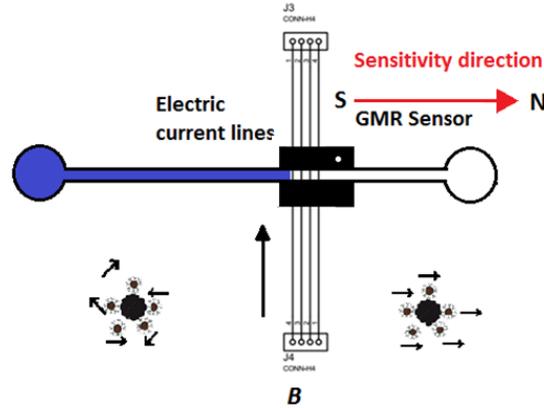


Figura 4.1: Representación de un sistema microfluídico, la magnetización se realiza con líneas de corriente que cruzan de manera perpendicular al microcanal. Las líneas de corriente son colocadas encima del sensor GMR, en este caso nos interesa saber la distribución de MNPs en la región del sensor, al pasar por el campo magnético se alinean los spines de la MNPs y en conjunto emitan una señal que se espera detecte el sensor.

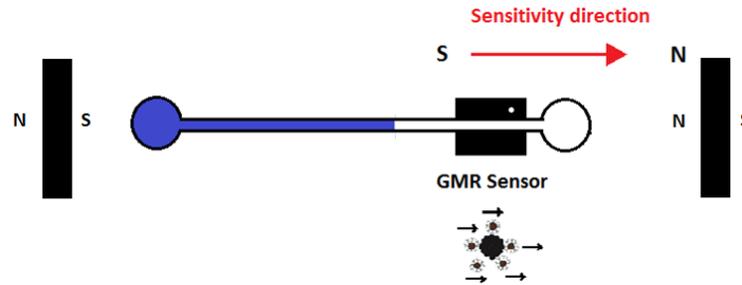


Figura 4.2: Representación del sistema microfluídico, la magnetización se realiza con imanes permanentes colocados a cierta distancia, el interés en este caso es saber la distribución de MNPs en la región del sensor. Al pasar las MNPs por el campo magnético se alinean los spines emitiendo en conjunto una señal que se espera detecte el sensor.

En movimiento de una MNP dentro del microcanal es afectado por dos fuerzas principales: la fuerza fluidica \vec{F}_s y la fuerza magnética \vec{F}_m . Otras fuerzas como la gravedad, la interacción entre partículas no se toman en cuenta.



Por la segunda ley de Newton, donde \vec{v}_p es la velocidad de la partícula.

$$m_p \frac{d\vec{v}_p}{dt} = \vec{F}_s + \vec{F}_m \quad (4.1)$$

La fuerza fluídica de una partícula esférica está determinada por la ley de Stokes [17]

$$\vec{F}_s = -6\pi\eta r_p (\vec{v}_p - \vec{u}) \quad (4.2)$$

donde r_p es el radio de la partícula, η es la viscosidad, \vec{u} es el campo de velocidades del fluido.

Sustituyendo (4.2) en (4.1) y despreciando la aceleración teniendo en cuenta que las MNP adquieren su velocidad máxima en nanosegundos [18], entonces

$$\vec{F}_s - 6\pi\eta r_p (\vec{v}_p - \vec{u}) = 0$$

por lo tanto

$$\vec{v}_p = \vec{u} + \frac{\vec{F}_m}{6\pi\eta r_p} \quad (4.3)$$

En esta ecuación, la velocidad de la partícula depende de la fuerza magnética y del campo de velocidad de fluido que las transporta.

4.1.1. Implementación en COMSOL multiphysics

La simulación completa consistió en tres partes, el modelo magnético, el modelado del flujo a través del microcanal y la convección-difusión de MNPs a través del canal. Se resolvieron secuencialmente con un estudio dependiente del tiempo. Se utilizó el software



COMSOL Multiphysics para resolver numéricamente las siguientes ecuaciones de manera secuencial

Se resuelve la ecuación de campo magnético, de aquí se obtiene la intensidad de campo magnético generadas por la línea de corriente. y el gradiente magnético generado por los imanes permanentes, también se obtiene la fuerza magnética \vec{F}_m tanto para las líneas de corriente como para los imanes permanentes.

La intensidad de campo magnético \vec{H}_a puede obtenerse de la distribución de campo magnético \vec{B} resolviendo la siguiente ecuación

$$\nabla \times \left(\frac{1}{\mu_0 \mu_r} (\vec{B} - \vec{B}_r) \right) = \vec{J} \quad (4.4)$$

donde μ_r es la permeabilidad relativa, $\mu_r = 1$, \vec{J} es la densidad de corriente externa y \vec{B}_r es el densidad de flujo remanente del material. $\vec{B}_r = 0$.

La distribución de campo magnético \vec{B} tanto para la línea de corriente como para el imán permanente puede obtenerse de la ecuación (4.4) con ciertas condiciones. En caso del campo magnético emitido por las líneas de corriente puede calcularse con la ley de Ampere, en el caso de los imanes permanentes puede calcularse introduciendo el potencial magnético \vec{A} , donde

$$\vec{B} = \nabla \times \vec{A} \quad (4.5)$$

La fuerza magnética esta dada por

$$\vec{F}_m = \mu_0 V_m \frac{3\chi}{\chi + 3} (\nabla \cdot \vec{H}_a) \vec{H}_a \quad (4.6)$$

Donde V_m es el volumen de la partícula, \vec{H}_a es la intensidad de campo magnético en caso de las líneas de corriente y el gradiente magnético en caso de los imanes permanentes.



Se resuelven las ecuaciones de Navier-Stokes y de continuidad combinadas con la fuerza magnética y se obtiene el campo de velocidades del fluido

El campo de velocidades de un fluido incompresible puede escribirse resolviendo la ecuación de continuidad y una ecuación de Navier-Stokes modificada [18]

$$\nabla \cdot \vec{u} = 0 \quad (4.7)$$

$$\rho \left(\frac{\partial \vec{u}}{\partial t} + (\nabla \cdot \vec{u}) \vec{u} \right) = \nabla P + \eta \nabla^2 \vec{u} + \vec{F}_{vol} \quad (4.8)$$

donde P es la presión, \vec{u} es el campo de velocidad del fluido, η es la viscosidad del fluido, \vec{F}_{vol} es la fuerza volumétrica, La cual es igual a la fuerza magnética multiplicada por el número de partículas por unidad de volumen

$$\vec{F}_{vol} = n \vec{F}_m = \mu_0 n V_m \frac{3\chi}{\chi + 3} (\nabla \cdot \vec{H}_a) \vec{H}_a = C_v \mu_0 \frac{3\chi}{\chi + 3} (\nabla \cdot \vec{H}_a) \vec{H}_a \quad (4.9)$$

donde C_v es el volumen de concentración

Se resuelve la ecuación de convección-difusión para una concentración C_v de MNPs diluidas en PBS (buffer fosfato salino), solución empleada en la investigación biológica.

Para describir los cambios en la fuerza volumétrica con la concentración de volumen C_v y el transporte de masa de la solución de MNP dentro del canal microfluídico, se introduce la concentración de volumen adimensional c , con ($C_v = cC_0$) y se calcula y resolvemos la ecuación

$$\frac{\partial c}{\partial t} + (\nabla c) \cdot \vec{v} = D \nabla^2 c \quad (4.10)$$

donde C_0 es la concentración inicial, D es el coeficiente de difusión, el cual se asume constante, \vec{v}_p es la velocidad de la partícula que puede obtenerse con la ecuación (4.3).



\vec{v}_p depende de la fuerza magnética y del campo de velocidades del fluido \vec{u} .

\vec{F}_m puede obtenerse de las ecuaciones (4.4), (4.5) y (4.6), \vec{u} puede obtenerse de las ecuaciones (4.7) y (4.8)

Modelo magnético

En el primer caso el modelo magnético se realizó con una fuente de campo magnético generado por un par de imanes permanente de neodimio de dimensiones, 4 mm de ancho, 2.5 mm de altura y 3 cm de largo separados a una distancia de 10.5 cm (figura 4.3), las propiedades utilizadas se presentan en la Tabla 4.1

Propiedad	Cantidad
Permitividad magnética	$1.3210^6 \mu\text{H/m}$
permeabilidad relativa	1.05
Densidad	7.01 g/cm^3

Tabla 4.1: Propiedades utilizadas para el neodimio.

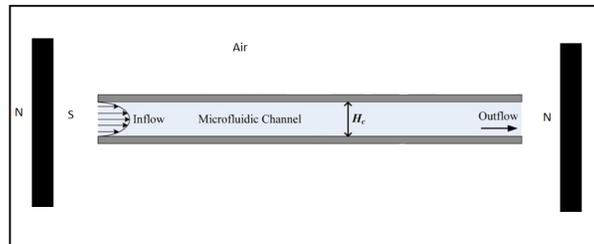


Figura 4.3: : Geometría utilizada para resolver el modelo, hay tres regiones: el microcanal, los imanes y la región de aire el potencial vectorial $A_z = 0$ se le da una condición inicial $A_z = 0$ puesto que el modelo es bidimensional.

En el segundo caso el modelo magnético se realizó por una línea de corriente unidimensional de 2 cm de largo y que cruza perpendicularmente al microcanal (Figura 4.4)

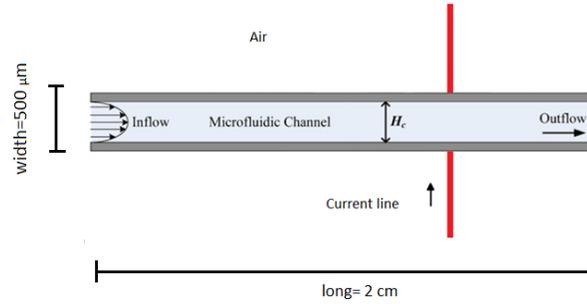


Figura 4.4: Geometría utilizada para resolver el modelo, hay tres regiones: el microcanal, la línea de corriente y la región de aire. La corriente inicial $i = 400$ mA.

En ambos modelos el campo magnético se calculó para las dos regiones de interés: la región del microcanal y la región de aire. Los límites externos se definieron como aislamiento magnético donde $B = 0$. El tamaño del elemento de malla para la región de aire fue de $0,1$ mm. El tamaño de la malla en la región del microcanal fue de $0,005$ mm.

Modelo de flujo a través del microcanal

El canal microfluídico fue modelado con un rectángulo de $500 \mu\text{m}$ de ancho y 2 cm de largo. Se calculó el flujo únicamente en la región del microcanal, se resuelven las ecuaciones de continuidad y de Navier-Stokes combinada con la fuerza magnética a través de la fuerza volumétrica, las propiedades físicas necesarias para la simulación son las del agua. Las condiciones iniciales son: en la entrada del canal la velocidad inicial se estableció como $u_0 = 0,004$ m / s, a la salida del canal la presión se estableció como $P = 0$ Pa. La condición de frontera es velocidad cero en las paredes del canal $u = 0$.

Modelo de difusión de MNPs

Para conocer la distribución de la concentración de MNPs a través del microcanal, se modeló con la ecuación de convección-difusión, se calculó solo en la región del microcanal mediante el transporte de mezclas diluidas, en este caso partículas de óxido de hierro diluidas en PBS (buffer fosfato salino); solución empleada en la investigación biológica. La



concentración volumétrica inicial es $C_v = 0.001$ mol/ml. Los parámetros utilizados durante la simulación se presentan en la Tabla 4.2.

Símbolo	Nombre	Valor
r_p	Radio de la partícula	100×10^{-9}
χ	Susceptibilidad magnética	0,8
η	Viscosidad	0.001 Ns/m ²
D	Coefficiente de difusión	1×10^{-9} m ² /s
v_0	Velocidad inicial de entrada	1×10^{-4} m/s
C_0	Concentración inicial de MNPs	0.001 mol
ρ	Densidad del fluido	1000 kg/m ³

Tabla 4.2: Parámetros y constantes utilizadas durante la simulación.

4.2. Fabricación de microcanales

El método de fabricación de canales microfluídicos es por litografía suave explicado en el estado del arte [4]. Los pasos se describen a continuación.

4.2.1. Fabricación de moldes

El molde fue fabricado sobre un sustrato de dimensiones 75 mm por 25 mm y aproximadamente 1 mm de espesor, se realiza limpieza del portaobjetos con metanol para eliminar impurezas, posteriormente se agrega una máscara de resina fotosensible (SU-8 50) por toda la superficie del sustrato. El portaobjetos se coloca sobre el spin coater SCS G808P, éste se hizo girar a 3000 rpm durante 30 segundos para obtener un espesor de resina de 60 μ m aproximadamente.

La geometría utilizada (Figura 4.5) se realizó en el software Layout Editor

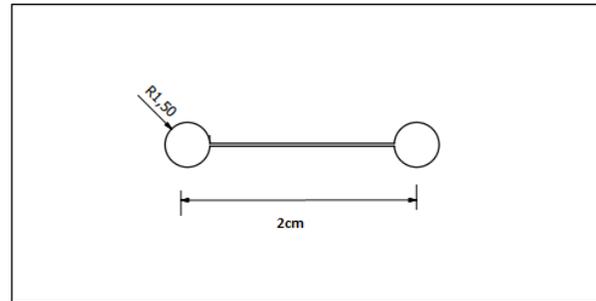


Figura 4.5: Geometría utilizada para la fabricación del molde.

Para realizar el grabado de la geometría sobre la resina se utilizó un equipo de litografía Heidelberg mPG10, finalmente para quitar la resina en la que no está grabado el molde y dejar la capa de resina con las dimensiones definidas para el molde se utilizó una mezcla como disolvente de 50 % etanol y 50 % acetona.

4.2.2. Fabricación de réplicas

Una vez que se ha obtenido el molde, el siguiente paso es la fabricación de réplicas, las réplicas se obtuvieron con un polímero Polidimetilsiloxano (PDMS) (Figura 4.6).

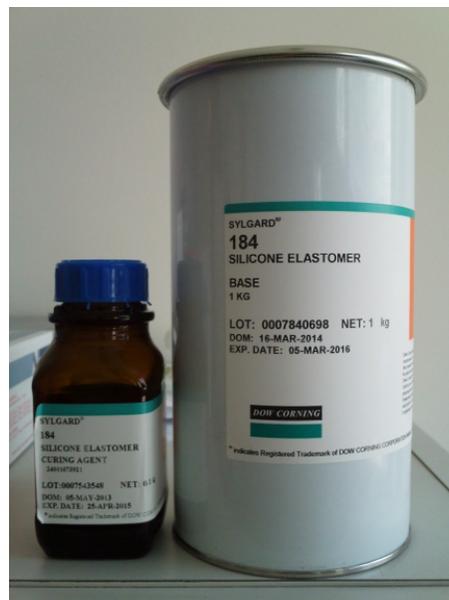


Figura 4.6: Polidimetilsiloxano (PDMS) más catalizador



La obtención de réplicas consiste de los siguientes pasos:

1. Limpieza del molde con etanol y agua destilada para eliminar los restos orgánicos.
2. Colocar el molde en un recipiente con el espacio suficiente para poder separar el polímero del molde.
3. Preparar la mezcla de PDMS y agente curador (catalizador), la mezcla se realiza con 1:10
4. Se introduce el molde en un desecador y se deja por 15 – 30 minutos al vacío hasta que se observe que las burbujas de aire en el PDMS desaparezcan
5. Hornear a 60° durante 3 horas para polimerizar el PDMS
6. Separar el polímero

Los equipos utilizados en orden secuencial para la fabricación de réplicas se presentan en la Figura 4.7

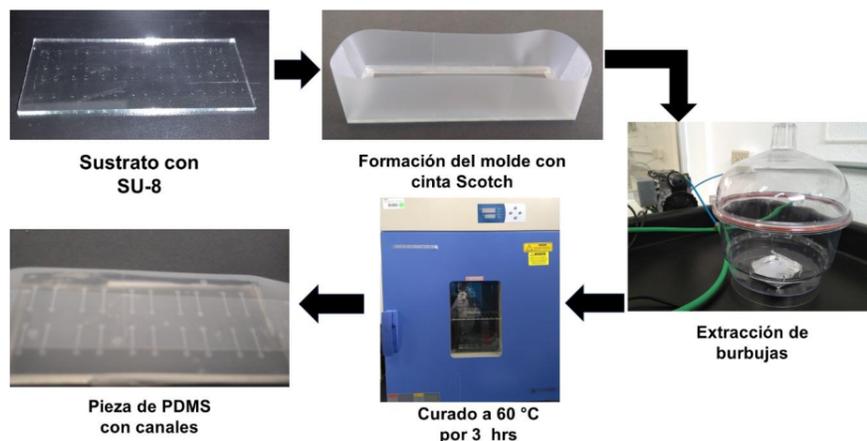


Figura 4.7: Equipos y proceso de fabricación de réplicas

Se realizaron perforaciones en la entrada y la salida de microcanal canal para poder conectar la bomba de microinyección.



4.2.3. Sellado del canal al sustrato

El último paso en el proceso de fabricación de canales microfluídicos es el sellado de la microestructura, éste consiste en unir la réplica a una tapa de vidrio que en este caso es un sustrato. En este trabajo el sellado se realizó con PLASMA CLEANER PDC-001-LD (Figura 4.8)



Figura 4.8: Generador de plasma

El sellado se hace mediante un limpiador de plasma MTI PDC-001-LD. Se introducen el sustrato y la pieza de PDMS con el canal, con la cara que se quiere sellar hacia arriba. Se hace vacío en la cámara, se gira la válvula a la posición de venteo, y se deja que se estabilice la presión a 7×10^{-1} torr. Se enciende la radiofrecuencia en intensidad media, y se expone el material durante 1 minuto y 15 segundos a partir de la ignición del plasma. Después se sacan el sustrato de vidrio y la pieza de PDMS y se unen, obteniendo así el dispositivo microfluídico (Figura 4.9)

4.3. Fabricación por deposición de líneas de corriente

Como se dijo en capítulos anteriores otra forma activar magnéticamente las MNPs es mediante el campo generado por líneas de corriente, estas líneas de corriente son fabricadas en sustrato por deposición de películas delgadas de titanio y oro, una vez que se tienen el



Figura 4.9: Microcanal ya fabricado puesto a prueba

sustrato con pistas, éste se usa como tapa sellar un canal microfluídico (Figura 4.10)

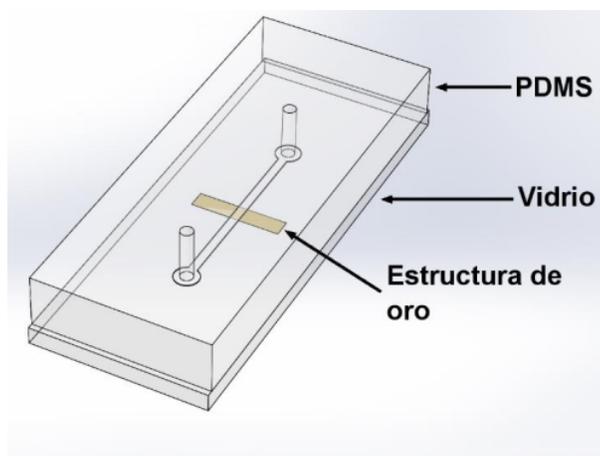


Figura 4.10: Esquema 3D del dispositivo microfluídico con pistas de oro

El procedimiento se describe continuación

4.3.1. Fotolitografía para obtención de la geometría

En un cristalizador se preparó una solución piraña 3:1 v/v de H_2SO_4 y H_2O_2 . y se calentó a $100\text{ }^\circ\text{C}$. Los sustratos de vidrio se sumergieron en esta disolución durante 15 minutos y se enjuagaron con agua desionizada. Los sustratos se calentaron en la parrilla



EMS 1000-1 a 100 °C por 1 minuto para eliminar residuos de agua. Se colocaron en el spin coater SCS G808P, donde se agregó uniformemente con un gotero la resina (AZ nLOF 2020) en toda el área del sustrato. El sustrato se hizo girar a 2500 rpm por 30 segundos, para obtener un espesor de resina de 2 μm aprox. y una vez terminado el proceso se colocó el sustrato en la parrilla para el *soft bake*, que se usa para evaporar solventes, a 110 °C por 60 segundos.

Una vez terminado el proceso se colocó el sustrato en la parrilla para empezar el proceso de *post exposure bake* a 110 °C durante 60 segundos el cual sirve como catalizador y completa la fotorreacción iniciada durante la exposición. Una vez terminado el proceso de post exposure bake, se introdujo el sustrato en el revelador AZ 300MIF durante 60 segundos la geometría utilizada para las pistas de oro se presenta en la figura 4.11, observando que cubriera todo el sustrato, posteriormente se sumergió en agua desionizada para detener el proceso de revelado. Después se secó el sustrato con aire seco o N₂, y se caracterizó en un microscopio metalográfico AmScop.

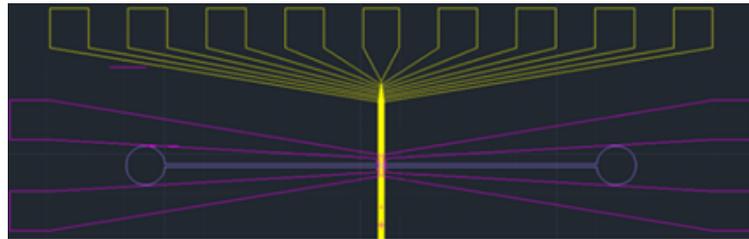


Figura 4.11: Geometría utilizada para la fabricación de las líneas de corriente.

4.3.2. Deposito por evaporación por haz de electrones

Una vez que se fabrican las estructuras para los electrodos con la ayuda de la resina AZnLOF 2020 y el equipo de litografía Heidelberg μPG101 , se utiliza el equipo de depósito físico a vapor Intercovamex D18 (Figura 4.12) para aplicar la técnica de evaporación por haz de electrones (Figura 4.13) las propiedades de los materiales depositados se presentan el la Tabla 4.3



Figura 4.12: Equipo para deposición de material por haz de electrones de la marca Intercovamex



Figura 4.13: Equipo para deposición de material por haz de electrones de la marca Intercovamex

Muestra	Densidad	Z-Radio
Titanio (Ti)	4.5	0.628
Oro (Au)	19.3	0.381

Tabla 4.3: Propiedades utilizadas para el neodimio.

Se depositaron Ti y Au a velocidades de 1.3 \AA/s y 6.2 \AA/s respectivamente, y se obtienen grosores de cada material de 20 y 200 nm respectivamente. Para remover la resina AZnLOF 2020 del sustrato, éste se sumerge en el removedor AZ 400T a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 hora tras lo que se obtienen los sustratos de vidrio con pistas de oro (figura 1.13)

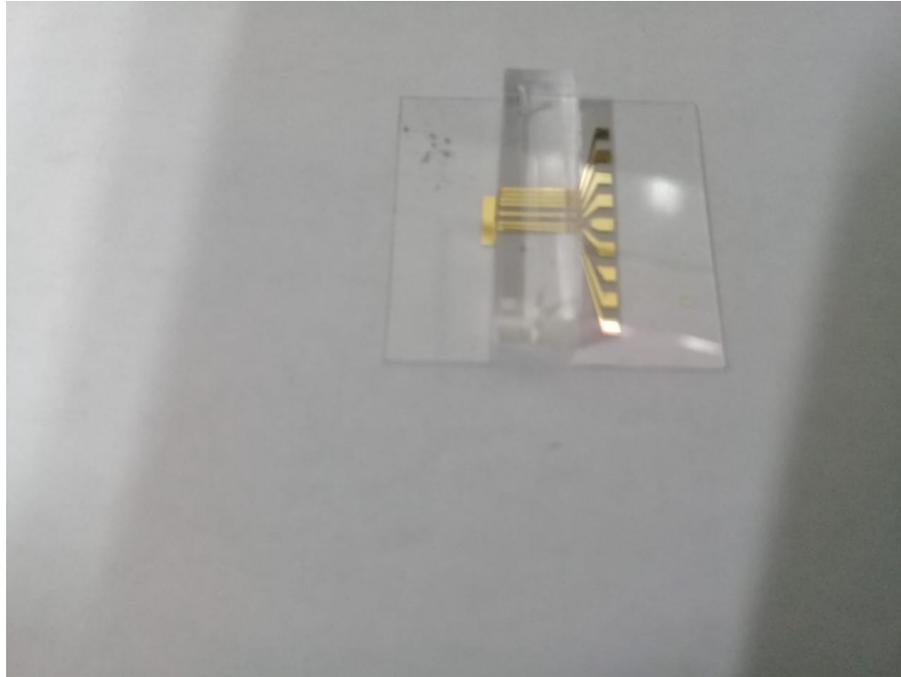


Figura 4.14: Canal microfluídico con pistas de oro y titanio integradas para la estimulación magnéticas de Dynabeads

4.4. Implementación del Sistema electrónico de detección

Para detectar la señal magnética de las MNPs que atraviesan el canal se diseñaron e implementaron dos sistemas de detecciones basados en sensores magnéticos GMR. El primero se diseñó con una fuente de campo magnético generado por imanes permanentes de Neodimio para magnetizar las MNPs, se utilizó el sensor GMR AA002. El segundo sistema de detección se diseñó con líneas de corriente para magnetizar las MNPs y se utilizó el sensor AAH002.

Las MNPs utilizadas son Dynabeads M-270 comerciales fabricadas por ThermoFisher Scientific (Figura 4.15)



Figura 4.15: Dynabeads M-27, fabricadas por Invitrogen ThermoFisher Scientific.

Existe una amplia gama de sensores GMR comerciales con diferentes características, el sensor GMR AA002 y AAH002 fueron elegidos en función de las propiedades magnéticas de las Dynabeads y en función del sistema utilizado para magnetizarlas. Sus propiedades y características de los sensores se describen a continuación.

4.4.1. Características de la Dynabeads M-270

Las Dynabeads M-270 son partículas superparamagnéticas de $2.8 \mu\text{m}$, están compuestas de MNPs superparamagnéticas de óxido de hierro Fe_3O_4 encapsuladas en una matriz de polímero (Figura 1.6)

El uso de la matriz polimérica también actúa como una capa de funcionalización para la conjugación adicional con moléculas bioactivas o ligandos dirigidos por medio de diferentes tipos de enlaces (anticuerpos, adsorción y enlace covalente) usando, por ejemplo, grupos carboxílicos o amino. Estas técnicas de funcionalización permiten que las partículas se unan a las células, biomoléculas, radionúclidos y muchas otras moléculas dependiendo del campo de trabajo, En el caso de células cancerosas por ejemplo de leucemia, se determina la línea células de linfocitos y se consiguen anticuerpos para unir linfocitos a Dynabeads

superparamagnéticas.

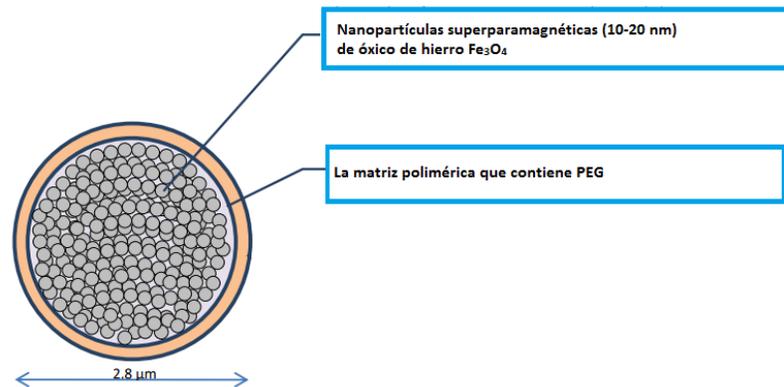


Figura 4.16: Esquema de una partícula superparamagnética Dynabead M-270.

Las dynabeads tienen las siguientes propiedades

- Dynabeads son partículas superparamagnéticas, lo que significa que muestran propiedades magnéticas cuando se colocan en un campo magnético sin magnetismo residual una vez que se eliminan del campo magnético
- Su exclusiva reproducibilidad entre lotes garantiza resultados reproducibles y de calidad
- La forma esférica y la química de superficie definida minimizan la aglutinación química y la unión inespecífica
- La capa de polímero de cada gránulo protege el objetivo frente a la exposición tóxica al hierro
- Las moléculas bioreactivas pueden ser absorbidas o acopladas a su superficie, y utilizarse para separar materiales biológicos (células, proteínas, ácidos nucleicos, etc.)

4.4.2. Curva de magnetización de las Dynabeads M-270

Cuando un material es expuesto a un campo magnético se satisface la siguiente relación



$$\vec{H} = \frac{\vec{B}}{\mu_0} - \vec{M} \quad (4.11)$$

Donde \vec{B} [T] es la densidad de campo de flujo magnético, \vec{H} [A/m] es la intensidad de campo magnético y \vec{M} [Am²/kg] es la magnetización del material.

En el caso de las partículas magnéticas M-270, se tiene una curva de magnetización para diferentes campos magnéticos aplicados. Ésta se presenta en la Figura 3.16.

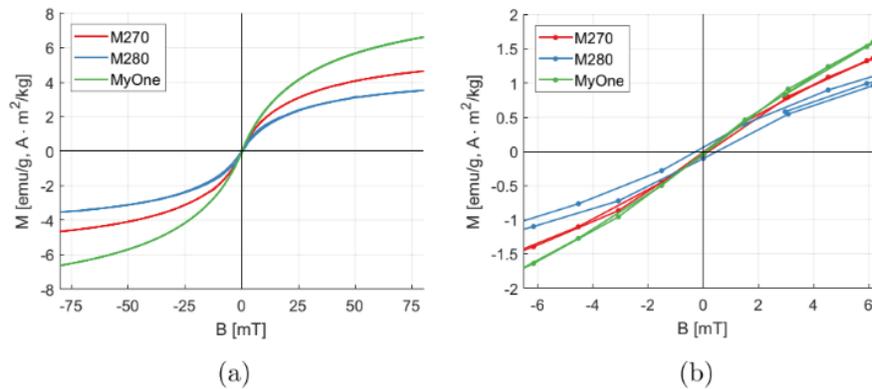


Figura 4.17: Curva de magnetización de las para tres tipos de Dynabeads, entre ellas las M-270 para diferentes campos magnéticos, La magnetización se satura en campos más fuertes que 0.5 T (no se muestra) con una magnetización de saturación de 6.4 Am² / kg para la M-270 [19]

Las Dynabeads no tienen histéresis dado que son superparamagnéticas, lo que significa que muestran propiedades magnéticas cuando se colocan en un campo magnético sin magnetismo residual una vez que se eliminan del campo magnético, observe que para obtener una magnetización significativa requiere campos magnéticos relativamente grandes. Este dato es de suma importancia para la implementación de los sensores GMR.

4.4.3. Características de los sensor GMR AA002 y AAH002

Cualquier sensor GMR de la serie AA de NVE corporation es un sensor activo montado en un puente de Wheatstone y empaquetado en un encapsulado SOIC8 para montaje



superficial, el sensor responde a la aplicación de un campo magnético externo. Las características del sensor AA002 y AAH002 se presentan en la Tabla 4.4 y 4.6, las curvas de calibración se presentan en las Figura 4.18 y 4.19 respectivamente.

Sensibilidad a 5V	Rango de trabajo [Oe]	saturación [Oe]	Histéresis []
18 mV/Oe	1.5 - 10	15	4

Tabla 4.4: Datos del sensor GMR AA002 utilizado para la detección de Dynabeads.

Sensibilidad a 5V	Rango de trabajo [Oe]	saturación [Oe]	Histéresis
75 mV/Oe	0.6 - 3	6	15

Tabla 4.5: Datos del sensor GMR AAH002 utilizado para la detección de Dynabeads.

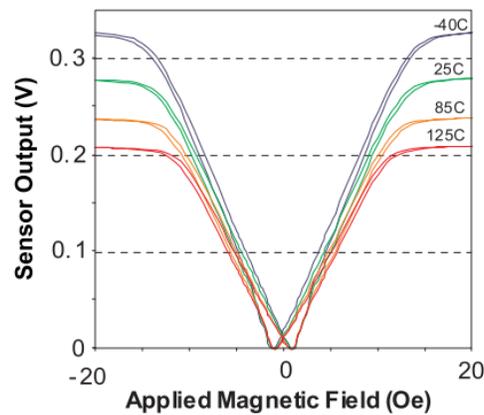


Figura 4.18: Curva de calibración del sensor GMR AA002, voltaje máximo entregado 275 mV.

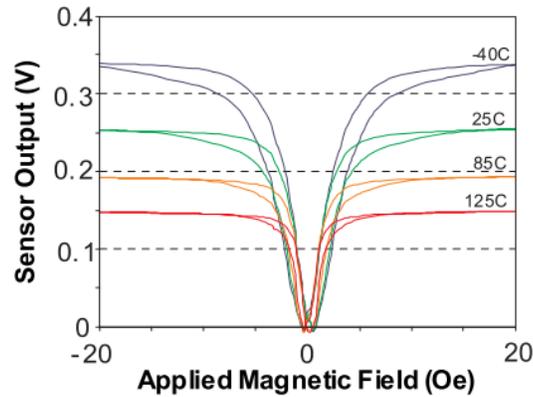


Figura 4.19: Curva de calibración del sensor GMR AAH002, voltaje máximo entregado 250 mV

4.4.4. Implementación del sistema de detección con imanes permanentes

Sistema con imanes permanentes

Para implementar este sistema se utilizó el sensor GMR AA002. Para magnetizar las Dynabeads se utilizaron un par de imanes permanentes de neodimio de 1.2 Teslas y dimensiones 0.4 mm de ancho, 0.4 mm de altura y 2.4 cm de largo, se colocaron de frente con polos opuestos de sur a norte con un sistema de núcleos de hierro para transformador en forma de E para alinear el campo, la distancia entre imanes fue de 10 cm. El sensor es colocado en medio de los dos imanes a una distancia de 5 cm donde el campo es de 10 Gs, el canal es colocado y fijado encima del sensor y en medio de los dos imanes (Figura ??) donde el campo magnético es uniforme.

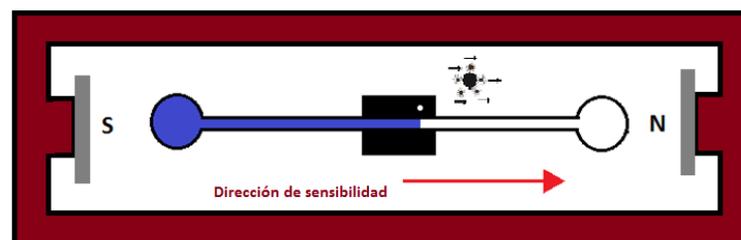


Figura 4.20: Sistema de imanes permanentes para magnetización de las Dynabeads



El sensor trabaja linealmente en un rango de 1.5 a 10 Oe, con una saturación en 15 Oe. Por lo tanto, la fuente de campo magnético para magnetizar las Dynabeads debe ser menor a 15 Oe, en este caso se fijó en 10 Oe equivalente a 10 Gs. Para este campo tenemos una magnetización $M = 0.25 \text{ Am}^2/\text{kg}$ según la curva de magnetización de las Dynabeads.

4.4.5. Implementación del sensor GMR AA002

En la Figura 4.26 se presenta el diagrama electrónico implementado para acondicionar la señal del sensor tomando en cuenta el sistema de imanes para magnetizar las Dynabeads, y sus propiedades magnéticas.

Las etapas se describen a continuación

Etapa de amplificación

Para esta etapa se utilizó un amplificador de instrumentación INA128 alimentado con $\pm 10 \text{ V}$ (Figura 4.21). Se decidió utilizar este voltaje para cubrir todo el rango de voltaje entregado por el sensor sin saturar el amplificador. De acuerdo con la curva de calibración del sensor AA002, el voltaje máximo entregado por el sensor es de 275 mV a una alimentación de 5 V por lo que la ganancia del amplificador es

$$G = \frac{5}{0,275} = 18,18$$

para esta ganancia $R_G = 2.6 \text{ k}\Omega$

El voltaje de referencia V_{ref} es conectado a tierra. Hasta esta etapa solo se amplifico la señal del sensor por 20 con salida única.

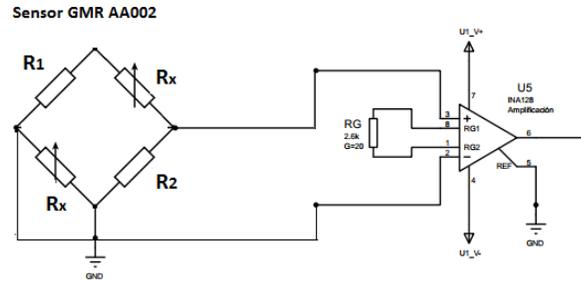


Figura 4.21: Etapa de amplificación con INA128.

Etapa de compensación

Cuando el sistema de imanes es colocado en el sensor, el nivel de voltaje se eleva hasta 3.8 V, para llevarlo a referencia se implementó una etapa de compensación con un restador con OPA2277 y un seguidor de voltaje con TLV271 conectado a la terminal no inversora (Figura), para calibrar el voltaje se utilizó un trimpot de 10 k Ω .

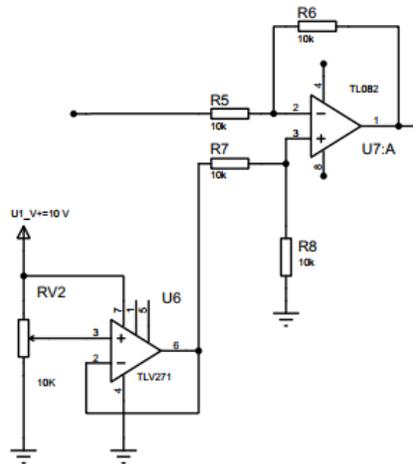


Figura 4.22: Etapa de compensación con OPA2277 y TLV271



Etapa de filtrado

Cuando la señal es llevada a referencia se implementa un filtro pasa bajos activo de segundo orden a una frecuencia de corte de 40 Hz, se usaron capacitores cerámicos de 0.1 μf , para esa capacitancia el valor de resistencia se calculó con la relación

$$f_c = \frac{1}{2\pi RC}$$

Donde R es la resistencia y C la capacitancia, obteniendo un valor $R=39\text{ k}\Omega$, redondeado a valores comerciales de resistencia 40 $\text{k}\Omega$.

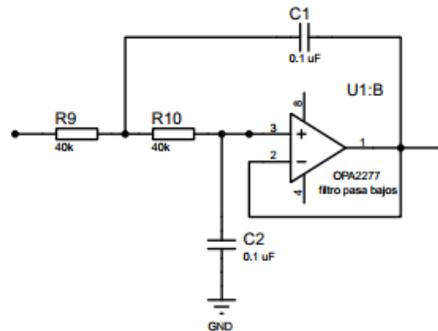


Figura 4.23: Filtro pasa bajos activo de segundo orden con frecuencia de ideal $f_c=40\text{ Hz}$.

Segunda etapa de amplificación

Cuando la señal filtrada y restringida para campos oscilatorios menores a 40 Hz se implementa una segunda etapa de amplificación, el rango de voltaje a amplificar no es el voltaje restante entregado por el sensor hasta la saturación, en este caso la ventana a amplificar es la de las Dynabeads. La ganancia se fija en 500, se usaron resistencia de $R_1=50\text{ k}\Omega$ y $R_2=100\ \Omega$.

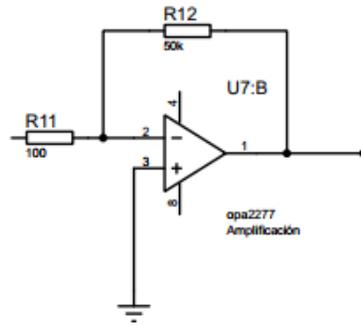


Figura 4.24: Segunda etapa de amplificación con $G=500$

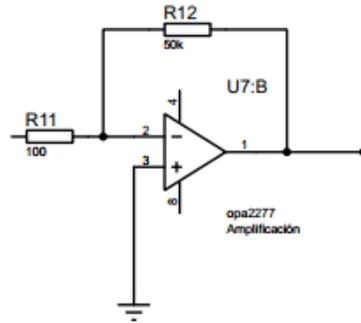


Figura 4.25: Segunda etapa de amplificación con $G=500$

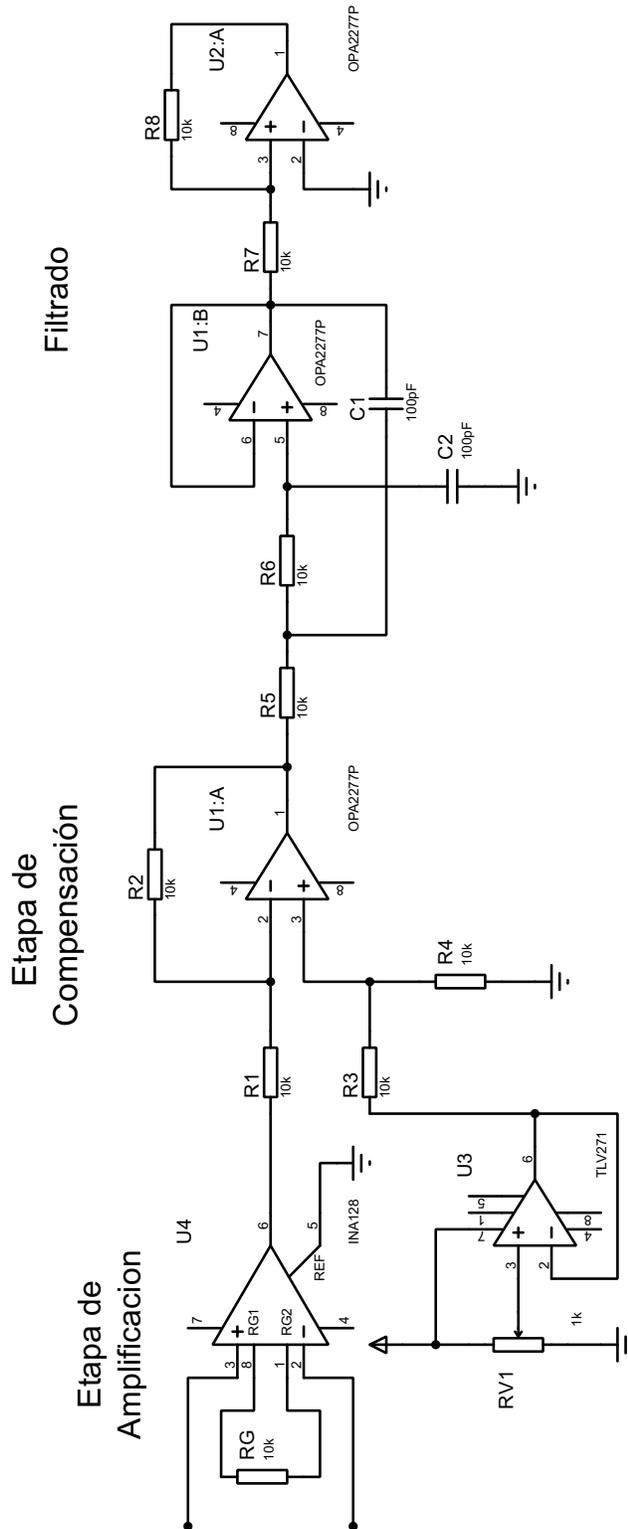


Figura 4.26: Segunda etapa de amplificación con $G=500$

4.4.6. Implementación del sistema de detección con líneas de corriente

Sistema con líneas de corriente

Para implementar este sistema se utilizó el sensor GMR AAH002. Para magnetizar las Dynabeads se utilizó en canal microfluídico con pistas de oro. El canal tiene varias líneas de corriente de las cuales solo se utilizó una, el canal es colocado y fijado encima del sensor de tal manera que la línea de corriente quede debajo del sensor y centrada (Figura 4.27).

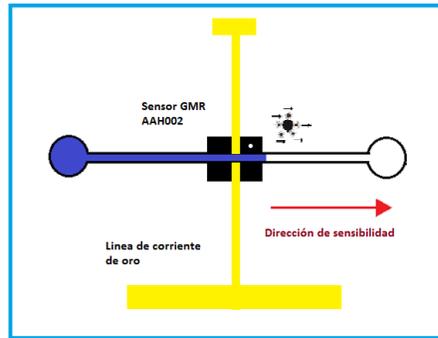


Figura 4.27: Sistema de imanes permanentes para magnetización de las Dynabeads

El sensor trabaja linealmente en un rango de 0.6 a 3 Oe, con una saturación en 6 Oe. Por lo tanto, la fuente de campo magnético para magnetizar las Dynabeads debe ser menor a 6 Oe, en este caso se fijó la corriente a 400 mA, se puede calcular el campo generado por una línea de corriente con la siguiente relación

$$B = \frac{\mu_0 i}{2\pi r} \quad (4.12)$$

donde i [A] es la corriente y r [m] es la distancia radial perpendicular a la línea de corriente.

Tomando en cuenta el espesor del sustrato de 100 μm y el encapsulado del sensor, tenemos una distancia aproximada de 400 μm , a esa distancia el campo generado tiene un



valor de 2×10^{-4} T igual 0.2 mT igual a 2 Gs.

4.4.7. Implementación del sensor GMR AAH002

El circuito electrónico implementado para acondicionar la señal del sensor AAH002 fue el mismo que en el caso anterior, con los mismos componentes cambiando algunos datos y tomando en cuenta el campo aproximado emitido por la línea de corriente.

Etapa de amplificación

De acuerdo con la curva de calibración del sensor AAH002, el voltaje máximo entregado por el sensor es de 250 mV a una alimentación de 5V. Por lo que la ganancia del amplificador es

$$G = \frac{5}{0,250} = 20$$

Por tanto $R_G = 2.7 \text{ k}\Omega$

Etapa de compensación

No cambia

Etapa de filtrado

El filtro se diseña con una frecuencia de corte de 500 Hz, esto porque las pruebas se realizan con corriente directa y corriente alterna a una frecuencia de 250 Hz.



Segunda etapa de amplificación

Cuando la señal filtrada y restringida para campos oscilatorios menores a 500 Hz se implementa una segunda etapa de amplificación, el rango de voltaje a amplificar no es el voltaje restante entregado por el sensor hasta la saturación, en este caso la ventana a amplificar es la de las Dynabeads. La ganancia se fija en 1000, se usaron resistencia de $R_1=100\text{ k}\Omega$ y $R_2=100\ \Omega$.

4.5. Pruebas y caracterización de los Sistema desarrollados

En esta sección se describe la instrumentación utilizada para realizar las pruebas pertinentes del sistema desarrollado, las pruebas tienen dos objetivos

1. Demostrar que los sensores son capaces de detectar la señal magnética que emiten las MNPs al cruzar por el microcanal.
2. Encontrar la mínima cantidad de partículas detectables por el sistema (Resolución), obtener la curva de calibración para diferentes concentraciones.

Para realizar las pruebas se utilizaron los siguientes equipos.

- Osciloscopio LeCroy waverunner 6100A de cuatro canales utilizado para las mediciones.
- Dynabeads M-270 con concentración inicial $C_0 = 2 \times 10^9$ beads/ml.
- Fuente de voltaje de 5 y 10 V
- Gaussímetro 5180 Gauus/Tesla Meters
- Tarjeta de adquisición de NATIONAL INSTRUMENTS NI9219 de cuatro canales.



- Dispensador repetitivo LANPETTE-RP
- 12 tubos eppendorf
- Bomba de microinyección con resolución de 1ml/h

La concentración inicial de las Dynabeads es $C_0 = 2 \times 10^9$ beads/ml.

Es necesario bajar la concentración de partículas se aplicó el siguiente protocolo.

1. Tomar $10 \mu\text{l}$ de Dynabeads con el dispensador repetitivo y se disolvieron en $990 \mu\text{l}$ de PBS (Phosphate Buffered Saline) la nueva concentración volumétrica es $C_{v1} = 20 \times 10^6$ beads/ml.
2. De la nueva muestra de Dynabeads diluidas, tomar $5, 10, \dots, 50 \mu\text{l}$ y disolverlos con el complemento de PBS para tener un volumen constante de $50 \mu\text{l}$.

Los datos de las diluciones realizadas se presentan en la Tabla 4.6, las muestras se almacenaron en tubos de eppendorf (Figura 4.28)



Figura 4.28: Muestras de Dynabeads para diferentes concentraciones a volumen constante de $50 \mu\text{l}$ en tubos eppendorf.



N ° de beads	S1 [mV]	S2 [mV]	Promedio [mV]
5	45	50	100×10^3
10	40	50	200×10^3
15	35	50	300×10^3
20	30	50	400×10^3
25	25	50	500×10^3
30	20	50	600×10^3
40	15	50	700×10^3
45	10	50	800×10^3
50	5	50	1000×10^3

Tabla 4.6: Datos de concentración a volumen constante $50 \mu\text{l}$

4.6. Instrumentación

El diagrama de la Figura 4.29 muestra el arreglo experimental y los instrumentos utilizados para obtener mediciones con el sistema de imanes permanentes. En la Figura 4.30 se presenta el sistema con líneas de corriente para obtener mediciones.

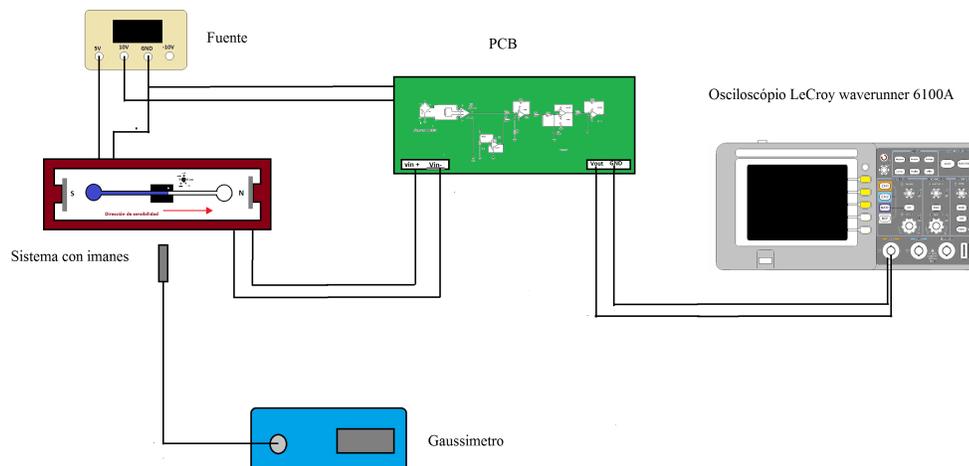


Figura 4.29: Instrumentación necesaria para realizar pruebas del sistema implementado con imanes permanentes.

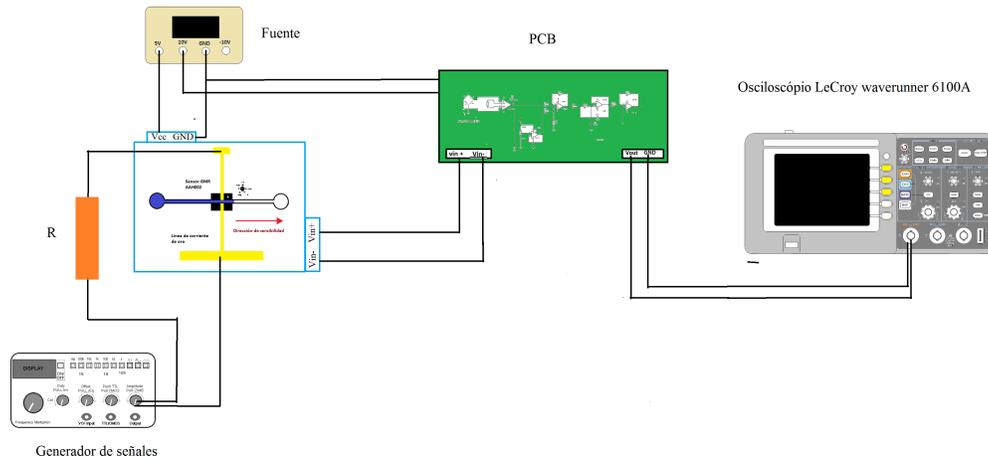


Figura 4.30: Instrumentación necesaria para realizar pruebas del sistema desarrollado con líneas de corriente.

En la Figura 4.31 se presenta el sistema con imanes permanentes puesto a prueba y en la Figura 4.32

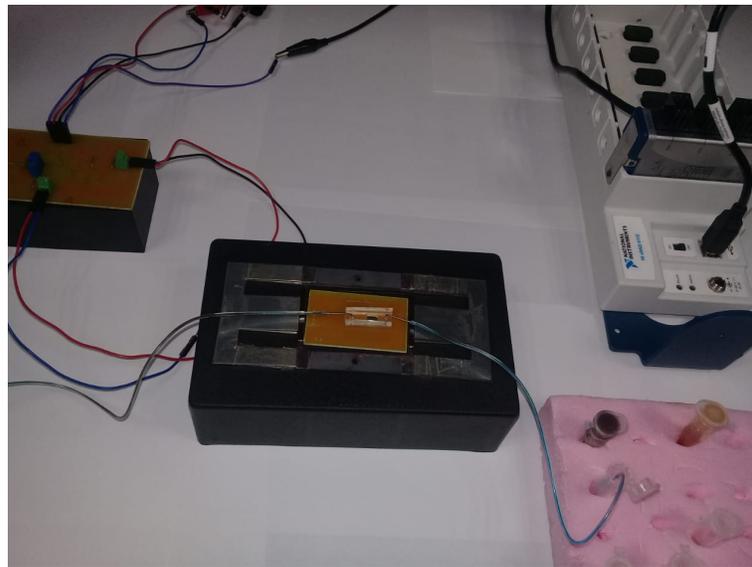


Figura 4.31: Sistema desarrollado usando imanes permanentes para la detección de Dynabeads

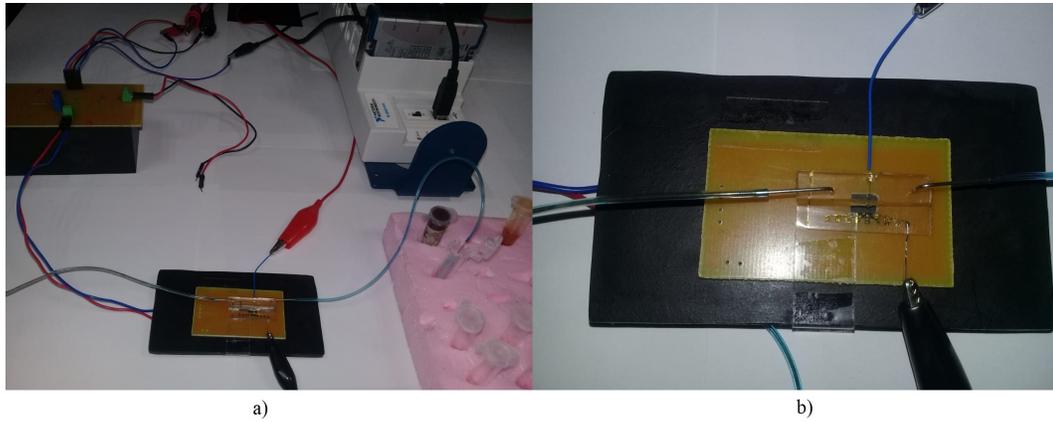


Figura 4.32: En a) se presenta el sistema desarrollado usando líneas de corriente para magnetizar las Dynabeads en b) se hace ampliación observar el canal con pistas de corriente justo arriba del sensor.

Capítulo 5

Resultados y discusiones

En este capítulo el lector encontrará una descripción detallada de los resultados obtenidos en cada una de las etapas llevadas a cabo para alcanzar el objetivo general de este trabajo de tesis. El lector encontrará los resultados obtenidos en el modelado mediante el FEM de la distribución de MNPs a través del microcanal. Los resultados de las pruebas del sistema microfluídico desarrollado con Dynabeads M-270, finalmente se plantean las discusiones generales del trabajo de tesis.

5.1. Modelado mediante FEM de la distribución de MNPs a través del microcanal

Se modeló la distribución de MNPs a través del microcanal recto, el estudio se realizó con el revolvedor dependiente del tiempo, el intervalo fue de 0 a 5 s. El gasto volumétrico fue $Q = 1\text{ml/h}$ con una velocidad del flujo aproximada dentro del microcanal de $u = 0,01\text{ m/s}$. los resultados obtenidos durante la simulación se presentan a continuación

5.1.1. Distribución de MNPs con el campo magnético constante

En la Figura 5.1 se muestra la distribución de MNPs para $t = 0.5$ s. La región de concentración está altamente distribuida en la entrada del microcanal. Por otro lado, las velocidades son pequeñas, en este caso la distribución a avanzado 5 mm del microcanal bajo las condiciones anteriores de velocidad y de campo magnético externo.

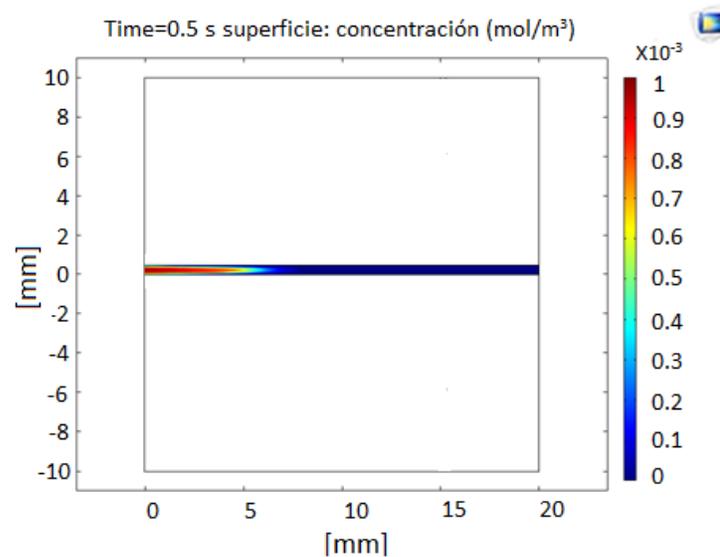


Figura 5.1: Distribución de MNPs en $t = 0.5$ s, las MNPs se han distribuido en los primeros 5mm de microcanal.

En la Figura 5.2 se muestra la difusión de MNPs para $t = 1$ s. Se observa una región de alta concentración en el intervalo de 0 a 15 mm, en este caso se puede considerar una situación en el que la distribución de MNPs se ha aglomerado en presencia del campo magnético.

En la Figura 5.3 se muestra la distribución de MNPs para $t = 3$ s. Se observa una región de alta concentración en el intervalo de 15 a 20 mm, el fluido al estar en movimiento transporta la concentración de partículas aglomeradas fuera del microcanal.

Este modelo otorga una idea geométrica de cómo se distribuyen las MNPs dentro del microcanal cuando su movimiento y distribución es afectado por la fuerza de arrastre del fluido y por la fuerza de un campo magnético externo, Sin embargo el modelo se realizó

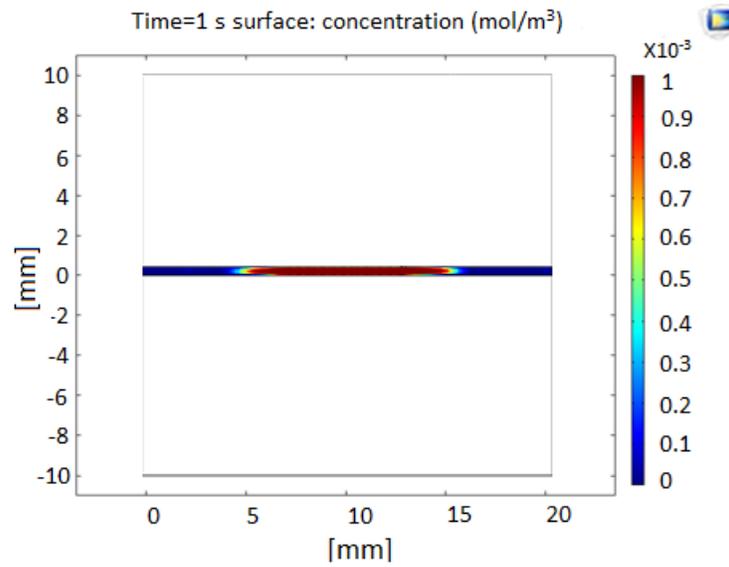


Figura 5.2: Distribución de la concentración de MNP en $t = 1$ s, la concentración se distribuye uniformemente en la región de 5 a 15 mm, en este caso la concentración de MNPs se aglomerado en esa región.

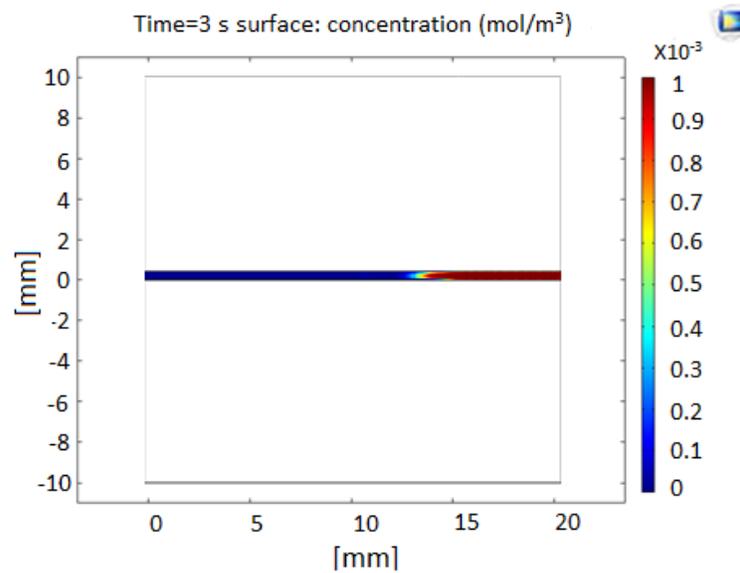


Figura 5.3: Distribución de la concentración de MNP en $t = 2$ s, la concentración distribuye desde la salida del canal hacia el centro del canal, en este caso el fluido continua arrastrando las MNPs hacia la salida.



en condiciones ideales. Como todo modelo, requiere de una validación experimental para saber que tanto se acercó el modelo a la realidad.

La manera más simple de saber que tanto se aproximó el modelo a realidad es tomar imágenes al microscopio y observar cómo se han distribuido las MNPs bajo las mismas condiciones del modelo.

5.1.2. Distribución de MNP con campo magnético generado por una línea de corriente

En la Figura 5.4 se muestra la distribución de MNPs para $t = 0.5$ s. La región de concentración está altamente distribuida en la entrada del microcanal. Por otro lado, las velocidades son pequeñas, en este caso la la distribución a avanzado 5 mm del microcanal bajo las condiciones anteriores de velocidad y de campo magnético externo.

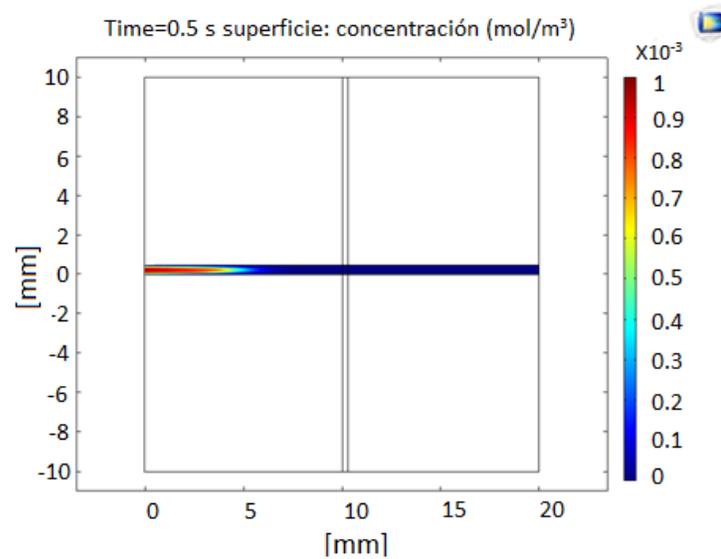


Figura 5.4: Distribución de la concentración de MNP en $t = 0.5$ s. En este caso, podemos considerar una situación en la que la fuerza magnética es mayor que la fuerza de arrastre del fluido.

En la Figura 5.5 se muestra la difusión de MNPs para $t = 1$ s. Se observa una región de alta concentración en el intervalo de 5 a 15 mm, en este caso se puede considerar una



situación en el que la distribución de MNPs se ha aglomerado en presencia del campo magnético generado por la línea de corriente. Observe que comparada con el caso de los imanes (Figura 5.2), las MNPs se encuentra más aglomerada, esto es debido a que las partículas cruzan rozando la línea de corriente donde la distancia entre las partículas y la línea de corriente es cero.

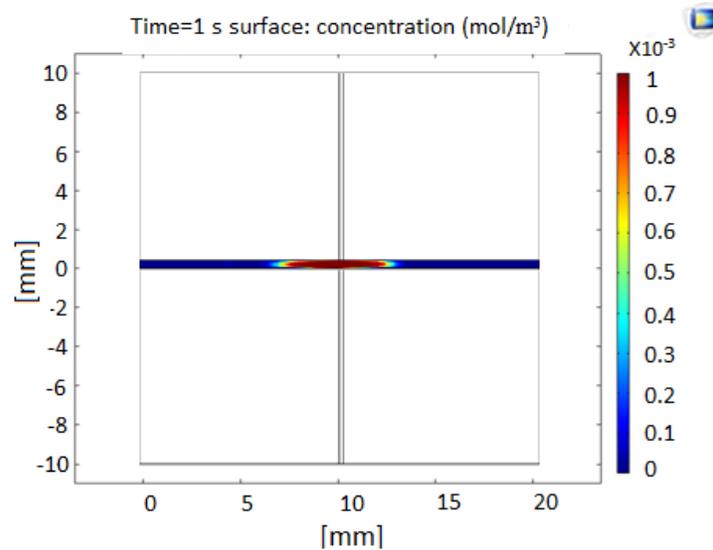


Figura 5.5: Distribución de la concentración de MNP en $t = 2$ s, la concentración de MNPs se ha aglomerado en la región de la línea de corriente donde el campo magnético es constante.

En la Figura 5.3 se muestra la distribución de MNPs para $t = 3$ s. Se observa una región de alta concentración en el intervalo de 15 a 20 mm, el fluido al estar en movimiento transporta la concentración de partículas aglomeradas fuera del microcanal.

El modelo aunque es ideal proporciona una idea de cómo se distribuyen las MNPs dentro del microcanal cuando cruzan por una línea de corriente que genera un campo magnético, De estos modelos tanto de este como del caso anterior, pueden extraerse algunos datos importantes como la velocidad de una partícula, dato importante para la implementación de sistemas de magnetoforesis para manipular MNPs a través de una región en canales microfluídicos.

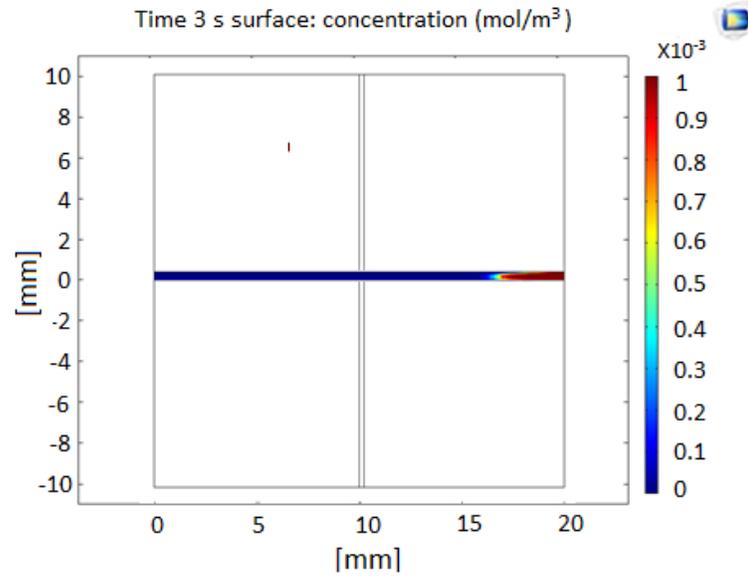


Figura 5.6: Distribución de la concentración de MNP en $t = 3$ s, las partículas tienen cierta resistencia al flujo de fluido debido al campo magnético.

5.2. Fabricación de microcanales

Se fabricaron canales microfluídicos de $500 \mu\text{m}$ de ancho por $60 \mu\text{m}$ de altura y 2 cm de largo. En la figura 5.7 se muestra un canal microfluídico fabricado por el método de litografía suave



Figura 5.7: Canal microfluídico fabricado



Se fabricaron pistas de oro por deposición de películas delgadas de titanio y oro, según el protocolo aplicado las pistas tienen un espesor de 250 nm, este sustrato se utilizó para sellar un microcanal, el resultado se presenta en la Figura 5.8

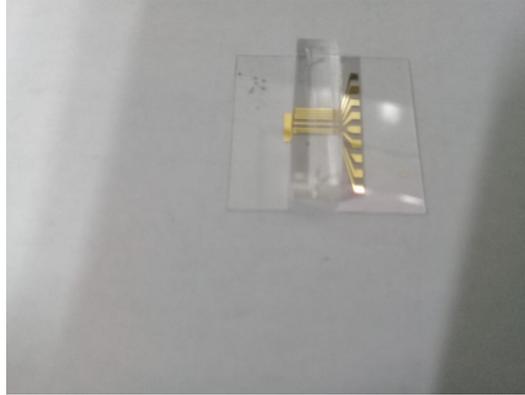


Figura 5.8: Canal microfluídico con pistas de oro para la estimulación magnéticas de Dynabeads.

El ambiente para fabricación de moldes para litografía suave, y para deposición de películas delgadas es sala blanca, ambas partes fueron fabricadas en la sala blanca del LABMyN en CIDETEQ Querétaro.

5.3. Pruebas y Caracterización de los sistemas implementado

Como se explico en la metodología, se desarrollaron dos sistemas para detectar la señal magnética de las Dynabeads, el primero donde la magnetización de las Dynabeads se lleva acabo con imanes permanentes, el segundo donde la magnetización se lleva a cabo con una linea de corriente. En esta sección se presentan los resultados de la experimentación realizada con ambos sistemas de detección.



5.3.1. Experimentación con el sistema de imanes permanentes

Se realizaron mediciones a un volumen constante de 50 μl de Dynabeads, los datos de partículas por cada muestra diluida se presentan en la Tabla 5.1

Dynabeads [μl]	PVS [μl]	volumen final [μl]	N° de beads
5	45	50	100x10 ³
10	40	50	200x10 ³
15	35	50	300x10 ³
20	30	50	400x10 ³
25	25	50	500x10 ³
30	20	50	600x10 ³
35	15	50	700x10 ³
40	10	50	800x10 ³
45	5	50	900x10 ³
50	0	50	1000x10 ³

Tabla 5.1: Datos de concentración a volumen constante 50 μl .

El canal microfluídico es fijado encima del sensor (Figura 4.31), la distancia del sensor al microcanal es de 400 μm , se conecta la bomba de microinyección a la entrada del microcanal (Figura 5.9). Se toma medición de la señal de referencia del sistema sin partículas 2.1 \pm 0.001 mV, se programa la bomba a un gasto volumétrico $Q = 1 \text{ ml/h}$, se inyectan cada una de las muestras observando la señal del sensor, se utilizó una tarjeta de adquisición de NATIONAL INSTRUMENTS NI9219 para adquirir las señales y calcular el valor promedio de voltaje, por cada muestra se realizaron 5 mediciones para garantizar la repetibilidad de las mediciones.

Las mediciones se realizaron bajo las siguientes condiciones

- Temperatura 25° C
- Gasto volumétrico $Q = 1 \text{ ml/h}$



- No objetos metálicos en por lo menos a un metro de distancia.
- Durante las mediciones se procuró no provocar vibraciones mecánicas en el sistema.
- La bomba de microinyección, la fuente y el osciloscopio se colocaron a una distancia relativamente alejada del sistema de detección.

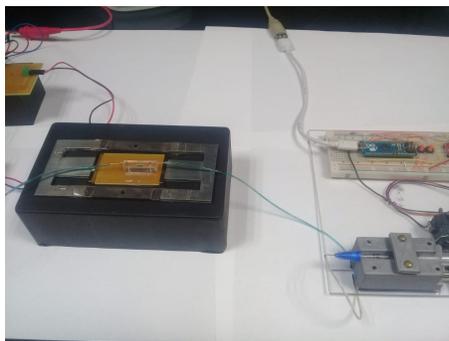


Figura 5.9: Canal microfluídico conectado a la bomba de microinyección (La bomba fue diseñada y fabricada con un motor a pasos y controlada por PWM.)

Los datos para cada muestra se presentan en la Tabla 5.2

Nº de beads	S1 [mV]	S2 [mV]	S3 [mV]	S4 [mV]	S5 [mV]	Promedio [mV]	std [mV]
100x10 ³	-2	-2.1	-2	-2	-2.1	2.04	0.0756
200x10 ³	-2.2	-2.1	-2.1	-2	-2.1	2.1	0.0433
300x10 ³	2	2	2.2	2.2	2	2.16	0.0867
400x10 ³	2.1	2	2	2	2.2	2.1	0.0894
500x10 ³	2.3	2.1	2.2	2.1	2.1	2.16	0.0894
600x10 ³	-65.2	-67.2	-67.9	-65.25	-66.2	66.35	1.191
700x10 ³	-82.65	-82.75	-84.00	-83.3	-82.50	83.04	0.615
800x10 ³	-144.25	-141.65	-141.45	-143.23	-144.12	142.94	1.33
900x10 ³	-299.50	-257.15	-258.90	-259.30	-267.23	268.41	4.325
1000x10 ³	-558.10	-560.70	-556.7	-558.65	-557.2	558.27	1.556

Tabla 5.2: Mediciones realizadas con el sistema de detección, el voltaje máximo registrado es de 561.70 mV, para 100x10³ beads disueltas en 50 μ l.



Para cada dato se calculó la desviación estandar, obteniendo valores pequeños de desviación. La gráfica de respuesta del sistema de detección para diferente número de partículas se presenta en la Figura 5.10, se aplicó una línea de ajuste por mínimos cuadrados obteniendo una función

$$v = 2,3102e^{5x10^{-6}n} \quad (5.1)$$

Donde n es el número de partículas. La resolución, es decir la mínima cantidad de partículas detectables por el sensor fue de 60×10^3 dynabeads disueltas en $50 \mu\text{l}$.

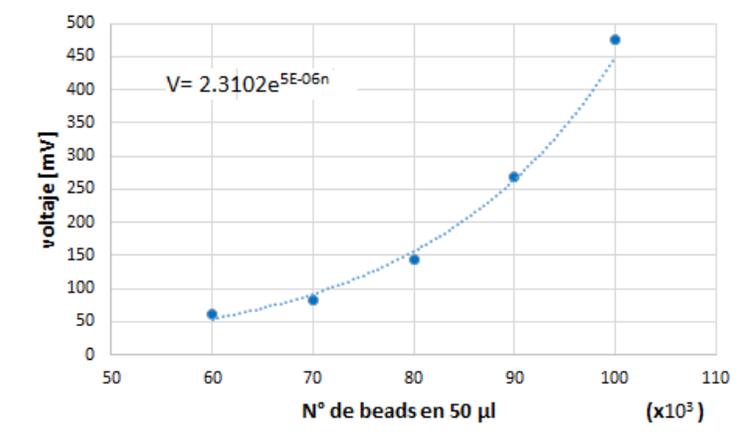


Figura 5.10: Curva de calibración para diferentes cantidades de Dynabeads.

El sistema detecto la señal al paso de partículas por el microcanal en 600×10^3 Dynabeads disueltas en $50 \mu\text{l}$ de PBS, la señal que se está detectando es la emitida por la cantidad de partículas que se encuentran en la región del microcanal encima del sensor.

La concentración de 600×10^3 partículas disueltas en $50 \mu\text{l}$ de PBS es 12×10^3 beads/ μl .

Las dimensiones del volumen del microcanal que está encima del sensor son $500 \mu\text{m}$ de ancho, $60 \mu\text{m}$ de alto y 4.2 mm de largo, por tanto el volumen de la muestra que circula a través del microcanal en la zona del sensor es $V = 0.126 \mu\text{l}$

Por tanto la cantidad de partículas detectables por el sensor bajo las condiciones



anteriores

$$n = 1512 \quad \text{Beads detectables por el sistema.}$$

El sistema responde de manera no lineal, sin embargo su comportamiento tiene un tendencia exponencial, esto puede deberse a que al someter el sensor al campo magnético de los imanes permanentes se lleva al sensor a nivel de voltaje cerca de la saturación.

Aplicando una escala semilogarítmica a la gráfica 5.10, se observa un comportamiento lineal (Figura 5.11), en este caso al sistema se le puede implementar una etapa más a la cadena de medida para linealizar el sistema.

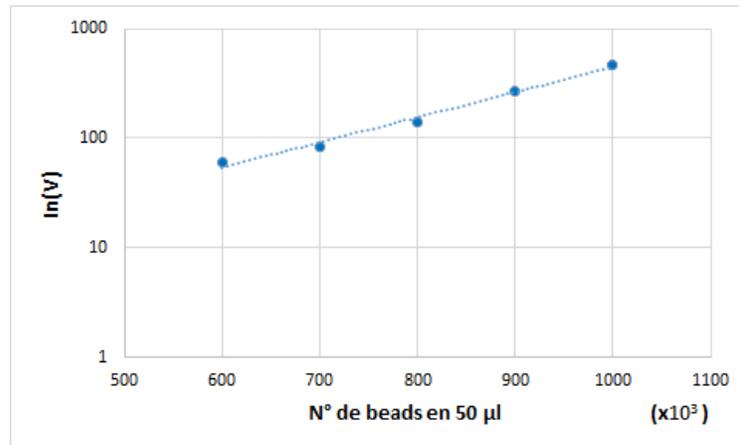


Figura 5.11: Escala semilogarítmica de la respuesta del sistema para diferentes concentraciones, se observa un comportamiento lineal.

Finalmente se precipitaron las Dynabeads de cada muestra y se hicieron circular las diferentes concentraciones de dynabeads a través del microcanal, el gasto volumétrico al que se inyectó fue $Q = 1$ ml/h, los eventos al paso de Dynabeads a través del microcanal se presentan en la figura 5.12

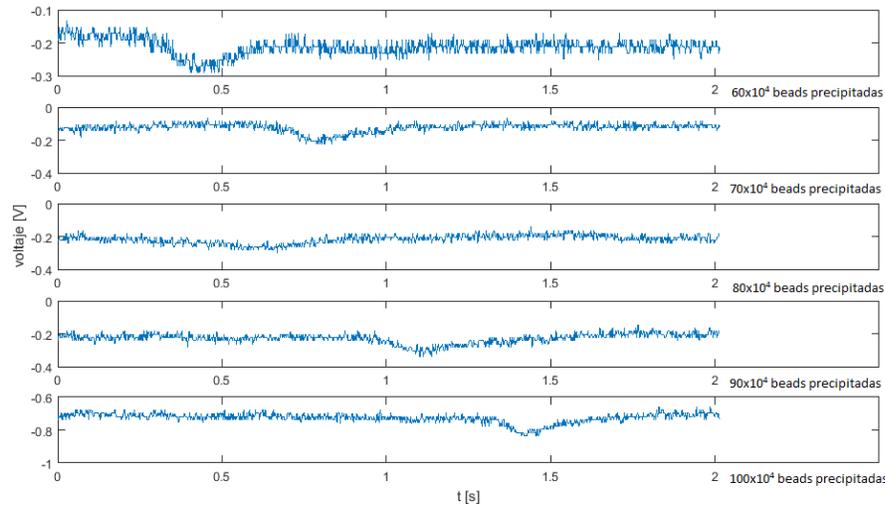


Figura 5.12: Gráficas de respuesta para diferentes concentraciones de Dynabeads M-270

5.3.2. Observaciones

Para garantizar las reproducibilidad de las mediciones se tienen que tomar en cuenta las siguientes.

1. El sistema resulto se es muy susceptible a interferencia magnética generada por equipos electrónicos y metales, los metales por ejemplo de cierres en chamarras, anillos, pulseras, audífonos, etc, generan ruido por interferencia.
2. El sistema no debe colocarse en mesas metálicas ya que esto eleva el nivel de voltaje de referencia.
3. El sistema resulto también ser muy susceptible a vibraciones mecánicas en el sensor y en los imanes, estas perturbaciones generan fluctuaciones de campo magnético alterando la señal de salida del sensor

Estas observaciones se deben aplicar para garantizar la repetibilidad y reproducibilidad del sistema de detección.



5.4. Sistema con líneas de corriente

En la Figura 4.27 se describió el arreglo experimental para realizar las pruebas pertinentes al sistema con líneas de corriente.

El sensor trabaja linealmente en un rango de 0.6 a 3 Oe, con una saturación en 6 Oe. Por lo tanto, la fuente de campo magnético para magnetizar las Dynabeads debe ser menor a 6 Oe, en este caso se fijó la corriente a 400 mA. Tomando en cuenta el espesor del sustrato de 100 μm y el encapsulado del sensor, tenemos una distancia aproximada de 400 μm , a esa distancia el campo generado tiene un valor de 2×10^{-4} T igual 0.2 mT igual a 2 Gs.

Las pruebas se realizaron con una corriente DC a 400 mA

Para generar la corriente directa sobre la línea se utilizó una fuente de voltaje de 8 V y una resistencia de 20 Ω a 3.2 W.

El canal microfluídico es fijado encima del sensor (Figura ??), la distancia del sensor al microcanal es de 400 μm , se conecta la bomba de microinyección a la entrada del microcanal. Se toma medición de la señal de referencia del sistema sin partículas 4.3 mV.

Se activó la línea de corriente llevando al sensor a nivel de voltaje de 0.98 V (Figura 5.13) se utilizó la tarjeta de adquisición de NATIONAL INSTRUMENTS NI9219 para adquirir las señales.



Figura 5.13: El sensor detecta la señal magnética de la línea de corriente.

Las muestras utilizadas para las pruebas y caracterización son las mismas que la Tabla 5.1, se hicieron pasar las partículas a una gasto volumétrico $Q = 1$ ml/h.

Las mediciones se realizaron bajo las siguientes condiciones:

- Temperatura 25 °C.
- Gasto volumétrico $Q = 1$ ml/h.
- No objetos metálicos en por lo menos a un metro de distancia.
- Durante las mediciones se procuró no provocar vibraciones mecánicas en el sistema.
- La bomba de microinyección, la fuente y el osciloscopio se colocaron a una distancia relativamente alejada del sistema de detección.

Desafortunadamente el sistema no respondió a la señal magnética de las Dynabeads para ninguna concentración por que su explicación se deja a discusiones.



5.5. Discusiones

Tras analizar los modelos de la distribución de MNPs y los experimentos con los sistemas desarrollados se observaron los siguientes fenómenos.

1. La validación de los modelos de la distribución puede realizarse de manera geométrica comparando imágenes al microscopio de la distrución de MNPs bajo las condiciones del modelo.
2. El sistema con imanes presenta una curva de calibración no lineal, sin embargo, cambiando la escala a semilogarítmica observamos un comportamiento lineal por lo que se podría linealizar el sistema.
3. El sistema con líneas de corriente bajo las mismas condiciones no presento variaciones en la señal, por lo que solo se dejo a discusiones, Aunque el campo generado por la línea de corriente es intenso cerca de la linea, la magnetización de las partículas no es suficiente para ser detectable por el sensor, esto puede deberse que la distancia entre el canal y el sensor, a pesar de ser solo $400 \mu\text{m}$ parece es demasiado grande para detectar la señal magnética de las Dynabeads, tomando en cuenta que el campo decae en el cuadrado de la distancia.

Conclusiones

Como recapitulación de los resultados obtenidos, resumimos a continuación las principales aportaciones conseguidas durante el desarrollo de esta tesis.

1. Se describieron los principios físicos de la microfluídica, los principios físicos y propiedades de las MNPs que se desarrollan actualmente para aplicaciones biomédicas.
2. Se propuso un modelo computacional mediante el método FEM de la distribución de MNPs a través de un microcanal recto bajo la influencia de un campo magnético externo, el modelo se realizó para dos casos, el primero para una fuente magnética constante generada por imanes permanentes, el segundo para una fuente de campo magnético generado por una línea de corriente. De estos modelos se pueden obtener estimaciones teóricas de velocidad a la que moverá una nanopartícula magnética; dato fundamental para lograr la separación mediante la implementación de un sistema de magnetoforesis en trabajos futuros.
3. Se describió detalladamente el método de fabricación de canales microfluídicos por litografía suave, los principales equipos, materiales, tecnologías y ambientes necesarios en la fabricación. También se describió detalladamente la técnica de fabricación por deposición de películas delgadas de oro y titanio para la generación de pistas de corriente en sustratos.
4. Se propusieron e implementaron dos sistemas de detección para detectar la señal magnética de las MNPs, el primero con una fuente de campo magnético generado por imanes permanentes de Neodimio, el segundo con una fuente de campo magnético generado con una línea de corriente. En el caso del sistema con líneas de corriente



no se logró la repetibilidad de las mediciones por lo que solo se dejó en discusiones. En el caso del sistema con imanes permanentes se obtuvo la curva de calibración y el mínimo de Dynabeads detectables en la región del sensor, en este caso 1512 partículas aproximadamente.

Por otra parte, el sistema resulto muy susceptible a interferencia magnética generada por equipos electrónicos y metales, también resulto ser muy susceptible a vibraciones mecánicas en el sensor y en los imanes, estas perturbaciones generan fluctuaciones de campo magnético alterando la señal de salida del sensor. Estas observaciones permitieron desarrollar un protocolo de medición para garantizar la repetibilidad y reproducibilidad del sistema de detección.

Los resultados obtenidos en esta tesis sirven de base para experimentar con canales microfluídicos más complejos, con las observaciones y resultados obtenidos, principalmente el mínimo de partículas detectables para el sistema, se pueden optimizar el sistema y desarrollar un protocolo de medición y de funcionalización de Dynabeads para lograr la detección, separación y cuantificación de células cancerosas tomada de muestras aisladas.

Perspectivas futuras del tema

Modelado

De los modelos se puede obtener parámetros que sirven como referencia para diseñar sistemas microfluídicos más complejos.

- Realizar modelos de la distribución de MNPs tomando en cuenta la interacción entre partículas para obtener resultados más consistentes con la realidad.
- Realizar estudios paramétricos de velocidad de flujo y de intensidad de campo magnético, observar las diferentes distribuciones de MNPs y determinar la velocidad de



flujo y la intensidad de campo magnético óptima, basase en los parámetros para diseñar un nuevo sistema de magnetoforesis.

- Obtener estimaciones teóricas de velocidad de una partícula magnéticas a partir de los modelos, con estos datos se puede calcular la distancia entre pistas de corriente para llevar a las partículas de un punto a otros mediante gradientes magnéticos.

Sistema de detección

- Existen materiales que atenúan el campo magnético. En el caso del sistema con imanes permanentes, diseñar un blindaje para reducir el ruido por interferencia magnética.
- Optimizar la cadena de medida y digitalizar con un ADC las señales obtenidas.
- Desarrollar una interfaz por computadora para la visualización en tiempo real de la señal magnética emitida por las Dynabeads.
- En el caso del sistema con líneas de corriente disminuir la distancia entre el sensor y el canal microfluídico, realizar nuevas mediciones con corriente alterna y utilizar un Lock in amplifier para filtrar las señales obtenidas.
- Diseñar un sistema de magnetoforesis con líneas de corriente para llevar a las partículas mediante gradientes magnéticos de un punto a otro para lograr la separación.

Sistema de detección

- Investigar sobre el protocolo de funcionalización de Dynabeads para unir las células cancerosas a Dynabeads.
- Diseñar un sistema microfluídico con sensores GMR integrados y fabricados por deposición de películas delgadas.

Bibliografía

- [1] Tableling Patrik, 2005. Introduction to Microfluidics, Oxford University Press
- [2] B. H. Lapizco-Encinas, Aplicaciones de Microfluídica en Bioseparaciones, Revista Mexicana de Ingeniería Química, Vol 7, No 3 (2008) 205-014.
- [3] Smith E. Douglas and Chu Steven, 1998, Response of flexible polymers to a sudde elongational flow, Science, Vol 281, 1335-1340.
- [4] Younan Xia and George M. Whitesides, SOFT LITHOGRAPHY, Department of Chemistry and Chemical Biology, Harvard University, Cambridge, Massachusetts 02138
- [5] Indira, T.K.; Lakshmi, P.K. Magnetic nanoparticles-A review. Int. J. Pharm. Sci. Nanotechnol. 2010, 3, 1035–1042
- [6] Robert L. White, Giant Magnetoresistance Materials and Their Potential as Read Head Sensors, Department of Materials Science and Engineering Stanford University, Stanford, CA 94305, IEEE Transactions On Magnetism, vol. 30. No. 2, March 1994.
- [7] Austria - Georgios Kokkinis, Susana Cardoso, Microfluidic platform with integrated GMR sensors for quantification of cancer cells - Institute of Sensor and Actuator Systems, Vienna University of Technology, Gusshausstrasse 27-29/366-ISS, Vienna 1040.
- [8] Bruss Henrik, 2008. Theoretical Microfluidics, Oxford University Press
- [9] Cengel A. Yanus, Cimbala M. Jhon, 2006, Mecánica de Fluidos Fundamentos y Aplicaciones. McGraw-Hill



- [10] Cooper McDonald J., Duffy David C., Andersen Janelle R., Chiu Daniel T., Wu Hongkai, Schueller Oliver J., Whitesides George M., 2000, Fabrication of microfluidic system in poly(dimethylsiloxane), *Electrophoresis*, Vol. 21, 27-40)
- [11] Lobontiu Nicolae, Garcia Ephraim, 2005, *Mechanics of microelectromechanical systems*, Kluwer Academic Publishers, Cap. 6.
- [12] Duffy Davis C., McDonald Cooper J., Schueller J.A., Whitesides George M., 1998, Rapid prototyping of microfluidics system in poly(dimethylsiloxane) anal. chem. Vol. 70, 49744984.)
- [13] Jose Yeste, Marta arcía-Ramírez, Xavi Illa, Anton Guimerà, Cristina Hernández, Rafael Simó and Rosa Villa, A compartmentalized microfluidic chip with crisscross microgrooves and electrophysiological electrodes for modeling the blood–retinal barrier. DOI: 10.1039/C7LC00795G (Paper) *Lab Chip*, 2018, 18, 95-105
- [14] Fainman Yessaiahu, Lee P. Luke, Psaltis, Yang Changhuei, 2010, *Optofluidics fundamental, devices and applications*, McGraw-Hill serie Biophotonics cap 2.
- [15] Microfluidic Biosensing using Giant Magnetoresistance Sensors - Ao.Univ.Prof. Dr. Franz Keplinger - Dr. Ioanna Giouroudi - Dipl.-Ing. Georgios Kokkinis . Faculty of Electrical Engineering, Vienna University of Technology in partial fulfillment of the requirements for the degree of Biomedical Engineering
- [16] Jongwon Park, Kyungil University, 50 Gamasil-gil, Hayang-eup, Gyeongsan, Gyeongbuk 712-701, Republic of Korea presenta el artículo titulado Superparamagnetic nanoparticle quantification using a giant
- [17] Younggeun Jo, Young Ki Hahn · Je-Kyun Park, A magnetophoresis-based microfluidic detection platform under a static-fluid environment, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017
- [18] Quanliang Cao, Xiaotao Han, Numerical analysis of magnetic nanoparticle transport in microfluidic systems under the influence of permanent magnets, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 45 (2012) 465001.



- [19] David Tim Grob, Naomi Wise, Olayinka Oduwole, Magnetic susceptibility characterisation of superparamagnetic microspheres, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 452 (2018) 134-140.

Apéndice

Artículos publicados en congresos internacionales

A Proposal to Develop a Microfluidic Platform with GMR Sensors and the Use of Magnetic Nanoparticles in Order to Detect Cancerous Cells: Preliminary experimentation

C. López¹, G. Oza², J.R. Casanova², L.G Arriaga², L. Leija¹ and A. Vera¹

¹Department of Electrical Engineering, Bioelectronics Section, CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico

²National Laboratory for Microfluidics and Nanofluidics, CIDETEQ, Querétaro, Mexico

Email: carlos.lopeza@cinvestav.mx, goza@cideteq.mx, jcasanova@cideteq.mx, larriaga@cideteq.mx, arvera@cinvestav.mx, lleija@cinvestav.mx

Abstract — In this paper, the experimentation and the preliminary results in the development of a microfluidic device are presented with giant magnetoresistance sensors GMR; by using functionalized magnetic nanoparticles, the system must detect, separate and quantify cancer cells from isolated samples.

The first advance was to experiment with a straight microchannel manufactured with the soft lithography technique, of dimensions; width 500 μm , depth 60 μm and 1.2 cm long, Through the microchannel circulate magnetic nanoparticles (Fe_3O_4 of Neem oil) dissolved in methanol, injected with an infusion pump, the channel is placed on top of commercial sensor GMR AAH002-02 from NVE Corporation. Finally, the voltage signal of the sensor is observed in the oscilloscope when the nanoparticles pass through the microchannel.

Keywords — Microfluidics, GMR sensors, magnetic nanoparticles, laminar flow, diffusion, magnetophoresis.

I. INTRODUCTION

Cellular quantification is significant in several areas of biomedical research and clinical pathology, to diagnose patients or approach hypotheses about the development of pathological processes [1]. Currently the techniques for cell separation and counting as flow cytometry, or the techniques activated by fluorescence are efficient, but sometimes it is inaccessible due to the high costs of the equipment and its maintenance [2].

The advances of microelectronics allowed in the 90s the development of microsystems for analysis of liquid samples based on microfluidics [3]; this is responsible for the study and development of systems to manipulate very small amounts of fluid, of the order of 10^{-9} a 10^{-18} liters through channels whose size is between tens and hundreds of micrometer. At present, the main technique for manufacturing microfluidic channels is "soft lithography", and the main material for manufacturing is PDMS (polydimethylsiloxane); a transparent elastomer similar to silicone. The PDMS is poured onto molds in silicon or glass wafers normally made with "photolithography" [4].

The first applications of microfluidics were carried out in analysis systems with the idea of achieving sample separations; taking advantage of the small dimensions and

the laminar flow regime that is established within the channels. The movement of fluids along the microchannels is done by pressure difference using pumps, or, by electroosmotic flow applying high voltages to the samples within the channels [2].

The technique to achieve separations of liquid samples and the small amount of samples, it made the microfluidic devices attractive to analyze biological samples taking advantage of the results of different fields of study, Like those of bionanotechnology: That currently has managed to functionalize magnetic nanoparticles (MNP) with bioactive ligands, for example the antibodies, In this way it is possible to label with the MNPs some biological entities such as: viruses, bacteria, cells, genes [5]. The magnetic nature of the MNPs makes them attractive for multiple applications in biodetection and bioseparations; this is because MNPs bound to biological entities are diffused into microfluidic channels and can be manipulated by means of magnetic gradients [1]. All these implementations gave rise since 2000 to the so-called "Lab on a chips" that perform the functions of a conventional laboratory equipment on a single chip [2].

These devices can be developed by implementing a "magnetophoresis" system to achieve bioseparation, also using the new technologies in magnetic sensors such as GMR, they can be implemented in a microfluidic platform as a "detection" and "quantification" system.

In this article we present the preliminary experimentation in the development of a microfluidic platform whose general objective is: "Detect", "separate" and "quantify" cancerous cells using GMR sensors and MNPs manipulated by magnetic gradients.

II. THEORETICAL BASIS

The movement of microfluids can be studied numerically by using the equations of fluid mechanics under the hypothesis of the continuous medium, thus establishing the hydrodynamic regime with which our microfluidic device will work, and the boundary conditions with which solves the Navier-Stokes and continuity equations [6].

The relationship between the inertial forces and the viscous forces a fluid is given by the Reynolds number

which is defined as

$$R_s = \frac{Lv\rho}{\mu}, \quad (1)$$

where v is the average speed of the fluid flow, ρ is the density, μ is the viscosity and L is the characteristic distance of the microchannel.

Since in most cases the flow velocity is small and the dimensions of the microchannel are small, the Reynolds number is usually less than 100 and on occasions less than one, under these conditions a laminar flow regime is established [6].

On the other hand, given the manufacturing technique of the microfluidic devices, in most cases these have rectangular cross sections, for a flow manipulated by pressure, where the pressure drop Δp acts on a length L , the velocity profile through the microchannel is parabolic and is given by the following equation [7]

$$v(y) = \frac{\Delta p}{2\mu L} \left[\left(\frac{h}{2}\right)^2 - y^2 \right], \quad (2)$$

where, $v(y)$ is the velocity profile within the microchannel, y is the transverse coordinate and h is the height of the channel, the parabolic velocity profile has a significant effect of the particles that are transported within the microchannel [2].

In this way, theoretical approximation of the speed can be made, together with the response of the so-called GMR sensors, a comparison can be made with the experimental results, with this it can be verified if the microfluidic devices comply with the efficiency and functions for what they were designed and manufactured.

III. METHODOLOGY

A straight microchannel was manufacturing with the following dimensions: 500 μm wide, 60 μm deep and 1.2 cm long with the soft lithography technique, see Fig. 1. Subsequently, an electronic circuit was implemented with commercial GMR sensors from NVE Corporation, The experiment consisted of observing the response of the GMR sensor to the passage of magnetic nanoparticles through the channel at constant speed.

The manufacture of the channel and the implementation of the electronic circuit are described below

A. Manufacturing of the microchannels

The manufacturing technique used to manufacture the microchannel was by soft lithography [7], the molds were

manufactured on a substrate with photolithography with the geometry of Fig. 2.

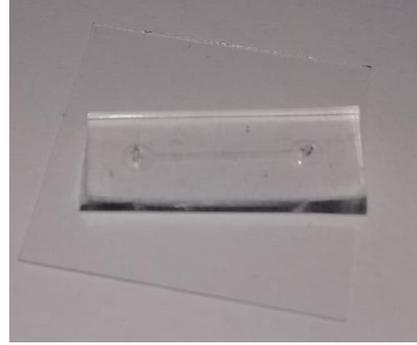


Fig. 1. Straight microchannel manufactured with soft lithography.

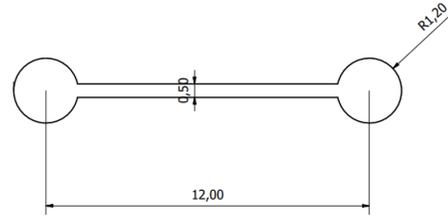


Fig. 2. Geometry designed in AUTOCAD for the manufacturing of the mold in a substrate with photolithophy.

Subsequently, the PDMS was prepared and poured on the molds; the mixture was made with 1 ml of curing agent (catalyst) for every 10 ml of PDMS, then it was placed inside the vacuum chamber for about an hour to extract the bubbles that are formed. Finally, to accelerate the drying of the PDMS, it was placed inside the INOVATECH laboratory oven at a temperature of 90 ° C for 20 min.

Once the PDMS has dried, it is separated from the mold and the respective perforations are made at the entrance and exit of the channel where the infusion pump will be connected, the perforations were made with a precision driller of the SYNEO brand.

Finally the PDMS channel is sealed to the substrate with the plasma technique, for this, they are both placed inside the plasma generator Fig. 3 for 15 s. Fig. 4 shows the microchannel already manufactured with its respective connectors for the infusion pump and put to the test

B. Implementation of the electronic circuit

The GMR AAH002-02 sensor from NVE Corporation is mounted on a Wheatstone bridge with differential output and SOC8 encapsulation for surface mounting. The proposed circuit to implement the GMR sensor is shown in Fig. 5.



Fig. 3. Plasma generator Expanded tabletop plasma cleaner model PDC-001-LD



Fig. 4. Microchannel already manufactured with their respective connectors.

Basically, the output signal of the GMR sensor is directed to an amplifier with differential input and a single output with a gain of 20; for this stage, an operational amplifier TLV271 of monopolar source was used. The output signal of this stage presents high frequency noise, so that a second order active low pass filter was implemented at a cutoff frequency of 1 kHz, in this stage an operational amplifier TL081 was used.

The oscilloscope used to observe the GMR sensor signal was a LeCroy Wave 6100A rumer.

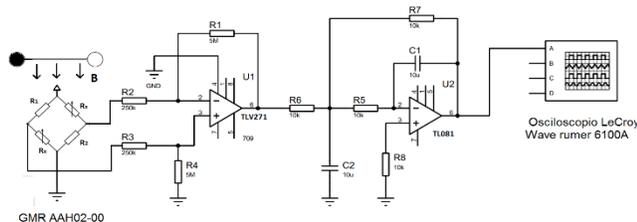


Fig. 5. Electronic circuit implemented to record the magnetic signal emitted by the MNP that traverse the channel.

IV. RESULTS AND DISCUSSIONS

In the first set of experiments performed, 1 ml of magnetic fluid was circulated through the channel; consisting of magnetic nanoparticles of Fe_3O_4 neem oil

dissolved in 300 μ l of methanol, a SINGLE SYRINGE CAT 7490 infusion pump Fig. 6, was used at a volumetric flow rate of 1 ml / hour



Fig. 6. Infusion pump SINGLE SYRINGE CAT 7490.

The objective of the experiment was to observe if the GMR sensor AAH002-02 of NVE Corporation is able to detect the magnetic signal of the nanoparticles that cross the channel, from which the following observations were obtained.

- The system has an offset voltage of 4.2 mV; this voltage may be due to a magnetic interference signal or to the amplifier itself.
- The connectors of the pump to the microchannel are metallic; when placing the channel on the GMR sensor the voltage rose to 80 mV. The sensitivity of the sensor is enough to detect the magnetization of any metal
- The sensor does not detect any signal from the particles that traverse the microchannel.

In the second set of experiments, a magnetic field with magnetite magnet was applied at a distance of 15 cm to the MNP before circulating through the microchannel, with which the following result was obtained.

- We take 80 mV as a reference. When the nanoparticles cross through the channel, the voltage increases to 98.5 mV while maintaining a DC signal, this is consistent since the flow within the microchannel is laminar and at a constant speed. The output signal of the sensor is presented in Fig. 7.

With this, we verify that the GMR commercial sensor AAH002-02 responds to the passage of MNPs through the channel, however, given the need for the application of a magnetic field to the MNP to obtain a detectable signal, implies in future experiments the implementation of a magnetophoresis system for the generation of magnetic

gradients, with this implementation the characterization of the system will be carried out, and the minimum sensitivity of the GMR sensor will be obtained depending on the concentration of MNPs that pass through the channel.

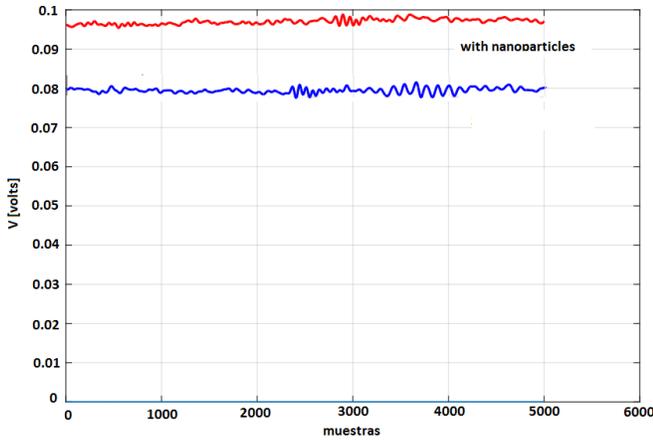


Fig. 7. Response of the sensor to the passage of magnetic nanoparticles that pass through the microchannel. The signal rose to 98.5 mV compared to 80 mV base.

A. Future studies and experiments

- Characterization of the microfluidic platform with straight channel, since the MNPs need a magnetic field so that the signal emitted by the MNPs is detectable by the GMR sensor, two future work will be carried out: the implementation of a magnetophoresis system, and, Determine the minimum sensitivity of the GMR sensor for different concentrations of MNP.
- Development of models in COMSOL to observe the diffusion of magnetic nanoparticles within the microchannel in a dynamic fluid, under the interaction of magnetic gradients
- Manufacturing and experimentation of more complex microfluidic channels. Since the overall goal is to develop a device that is capable of "detecting", "separating" and "quantifying" cancerous cells, detection and quantification can be achieved with the straight channel and processing the signals of the GMR sensor; implementing one channel for detection and another for reference. But nevertheless, achieving separation requires magnetic gradients and using a Y-type separator in the microchannels, Fig. 7 shows the design of the microfluidic platform that will be implemented in future work,

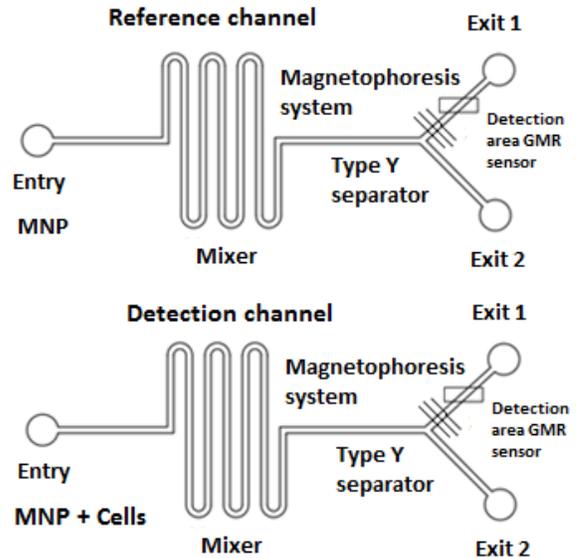


Fig. 8. In this design you have a reference channel and a detection channel, the two serpentine act as mixers. Taking advantage of the bifurcation of the separator type Y and the dynamic regime of laminar fluid, you can separate the cancer cells adhered to the MNP by applying a magnetic gradient to take them to the exit 1, In both cases the MNPs pass through the detection area where the GMR sensors will be implemented, it is expected to observe events in the sensor signals that allow the detection and quantification of cancer cells.

VI. CONCLUSION

The experiment with commercial GMR sensors and the fabrication of microchannels allowed us to enter this interdisciplinary field of science. With the experiments carried out, it was verified that the GMR sensors detect the signal of the nanoparticles that cross the channel whenever a magnetic field is applied to the MNPs.

On the other hand, this is only preliminary experimentation in the development of a more complex microfluidic device. Determine the minimum sensitivity of the GMR sensor as a function of the concentration of MNPs traversing the channel, it requires a magnetophoresis system, which has not yet been implemented given its manufacturing complexity, so it will be presented in future work.

ACKNOWLEDGMENT

We thank M. C. José Hugo Zepeda Peralta and Ing. Aldo Zaúl Zuñiga Álvarez for the technical support provided for the preparation of this work.

We appreciate the funding for the development of the

work presented project: ERAnet-EMHE 200022, CYTED-DITECROD-218RT0545 and Proyecto IV-8 call Amexcid-Auci 2018-2020

REFERENCES

- [1] Georgios Kokkinis, Susana Cardoso, Franz Keplinger, Ioanna Giouroudi, Microfluidic platform with integrated GMR sensors for quantification of cancer cells, *Sensors and Actuators B* 241 (2017) 438–445.
- [2] B. H. Lapizco-Encinas, Aplicaciones de Microfluídica en Bioseparaciones, *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, Vol 7, No 3 (2008) 205-014.
- [3] Bruss Henrik, 2008. *Theoretical Microfluidics*, Oxford University Press
- [4] Younan Xia and George M. Whitesides, *SOFT LITHOGRAPHY*, *Annu. Rev. Mater. Sci.* 1998. 28:153–84
- [5] Indira, T.K.; Lakshmi, P.K. Magnetic nanoparticles-A review. *Int. J. Pharm. Sci. Nanotechnol.* 2010, 3, 1035-1042
- [6] Cengel A. Yanus, Cimbala M. Jhon, 2006, *Mecánica de Fluidos Fundamentos y Aplicaciones*. McGraw-Hill
- [7] Lee, H., & Ham, D. (2007). *CMOS biotechnology*. R. M. Westervelt (Ed.). New York: Springer

A Study by Finite Elements of the Transport of Magnetic Nanoparticles in a Straight Microchannel under the Influence of a Magnetic Field Generated by a Current Line

C. López¹, M. I. Gutiérrez², C. Trujillo³, G. Oza⁴, J.R. Casanova⁴, A. Vera¹ and L. Leija¹

¹Department of Electrical Engineering, Bioelectronics Section, CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico

²CONACYT-Instituto Nacional de Rehabilitación, SIB, DIIM, Mexico City, Mexico

³Instituto Nacional de Rehabilitación, Subdir. Invest. Biotecnológica, DIIM, Mexico City, Mexico

⁴National Laboratory for Microfluidics and Nanofluidics, CIDETEQ, Querétaro, Mexico

Email: carlos.lopeza@cinvestav.mx

Abstract — Some microfluidic devices for the analysis of biological samples use magnetic nanoparticles as markers of bioactive agents. When they circulate through the microchannels, they diffuse depending on the forces acting in the MNP. In this article a model of the distribution of magnetic nanoparticle concentration in a straight microchannel is present. The distribution of MNP is affected by the influence of a magnetic field generated by a current line and the dynamics of the fluid that transports them. To model the dynamic behavior of the nanoparticles, the Navier-Stokes equation and the convection-diffusion equation were combined with the magnetic field equation.

The concentration of MNP was distributed evenly in the region near the current line. The simulations performed are used as a tool for the design of a microfluidic system for the detection and quantification of cancer cells.

Keywords — Microfluidics, magnetic nanoparticles, concentration, convection-diffusion, gradient magnetics.

I. INTRODUCTION

CURRENTLY it is possible to detect some biological entities, such as cancer cells by labeling with magnetic nanoparticles (MNP) functionalized with antibodies [1-2]. Detection is performed with the small magnetic signal emitted by a certain concentration of MNP that binds to a cell. Due to the magnetic nature of MNP, they can be manipulated by magnetic gradients in so-called microfluidic devices. A microfluidic based sample analyzer can offer multiple advantages over a macroscale system. For example, small sample volume, portability and low manufacturing costs compared to the costs of commercial equipment such as the flow cytometer [1].

Nowadays, microfluidic chips have been developed for

different applications in biosensors and for the separation of samples using MNP [1]. In order to verify the adequate operation of the microfluidic devices, theoretical foundations of the behavior of the fluids and the transport of MNP in confined spaces of micrometric dimensions are required. The magnetic particles have magnetic susceptibility so they can interact with external magnetic fields [3]. Computational models can be used as a tool for the design of microfluidic devices, which can improve the efficiency and the functions for which they are manufactured.

Microfluidics is studied in the macroscopic sense with the equations of fluid mechanics; however, the fluid that crosses the microchannels transports matter. Therefore, it is necessary to make theoretical models that allow us to know the distribution of the concentration of MNP in a moving fluid. This distribution depends on two main forces: the fluidic force and the magnetic force with which the MNP are excited. The magnetic source can be: A permanent magnet or current lines to direct the MNP to a certain region [4].

The distribution model of the concentration of MNP was analyzed and calculated theoretically by the finite element method [4-5]. The flow conditions and the magnetic field generated by a current line determine the behavior of the MNP transport in the microchannel.

This model is inspired by a microfluidic system that is currently being developed for the detection and quantification of cancer cells [5], to detect the magnetic field emitted by a concentration of MNP, GMR sensors [5] are used. This model works as a reference for the behavior of the concentration of MNP in the sensor region.

II. METHODOLOGY

The flow and magnetic field conditions generated by the current line determine the behavior of the distribution of MNP along the microchannel. There are two forces that act on the

magnetic particle: the fluidic force (Fs) and the magnetic force (Fm); forces such as gravity were not taken into account in the model.

The fluidic force with which a spherical particle is transported by a fluid is obtained with Stokes's law [6]

$$\vec{F}_s = -6\pi\eta r_p(\vec{v}_p - \vec{u}), \quad (1)$$

where r_p is the radius of the particle [m], η it is the viscosity [Ns/m²], and \vec{u} is the speed of the fluid [m/s].

The magnetic force on a particle with magnetic susceptibility χ is given by the following expression [6]

$$\vec{F}_m = \mu_0 V_m \frac{3\chi}{\chi+3} (\nabla \cdot \vec{H}_a) \vec{H}_a, \quad (2)$$

where V_m is the particle volume [m³] and \vec{H}_a is the magnetic field strength.

A. Magnetic field equation

The distribution of the magnetic field \vec{B} [T] is obtained by solving the following equation [6]

$$\nabla \times \left(\frac{1}{\mu_0 \mu_r} (\nabla \times \vec{A} - \vec{B}_r) \right) = \vec{j} \quad (3)$$

$$\vec{B} = \nabla \times \vec{A} \quad (4)$$

where \vec{j} is the current density of the line [A / m²]; and Br, the remaining flux density that is equal to zero, \vec{A} is the vector potential magnetic and μ_r is the relative permeability ($\mu_r = 1$) [6].

B. Fluid flow equation

To describe the behavior of the fluid velocity field within the microchannel, the continuity equation and the modified Navier-Stokes equation are solved [6]

$$\nabla \cdot \vec{u} = 0 \quad (5)$$

$$\rho \left(\frac{\partial \vec{u}}{\partial t} + (\nabla \cdot \vec{u}) \vec{u} \right) = \nabla P + \eta \nabla^2 \vec{u} + \vec{F}_{vol} \quad (6)$$

where P is the pressure [Pa], \vec{u} is the fluid velocity field [m/s], ρ is the fluid density [kg/m³], and η is the viscosity of the fluid [Ns/m²].

\vec{F}_{vol} It is the force of the volume. it is related to the magnetic force of a single particle with the following relation [6]

$$\begin{aligned} \vec{F}_{vol} &= n \vec{F}_m = \mu_0 \eta V_m \frac{3\chi}{\chi+3} (\nabla \cdot \vec{H}_a) \vec{H}_a \\ &= C_v \mu_0 \frac{3\chi}{\chi+3} (\nabla \cdot \vec{H}_a) \vec{H}_a \end{aligned} \quad (7)$$

where C_v is the volume concentration [mol/m³].

C. Convection–diffusion equation

To the concentration of the dimensionless volume c is given by [6]

$$C_v = c C_{v0} \quad (8)$$

where C_{v0} is the initial volume concentration [mol / m³]

To describe the transport of MNP within the microfluidic channel, the diffusion convection equation, which is given by [6]

$$\frac{\partial c}{\partial t} + (\nabla c) \cdot \vec{v}_p = D \nabla^2 c \quad (9)$$

where D is the diffusion coefficient [m²/s]

\vec{v}_p is the velocity of the particle. It is given by the following relationship [6]

$$\vec{v}_p = \vec{u} + \frac{\vec{F}_m}{6\pi\eta r_p} \quad (10)$$

where \vec{u} is the fluid velocity field from Eqs. (5) y (6) and \vec{F}_m it is the magnetic force of the particle.

D. Implementation and domains

The microchannel was modeled with a two-dimensional rectangle of 20 mm x 500 μ m. To numerically solve the partial differential equations in two dimensions described earlier in this geometry, the COMSOL Multiphysics software was used.

The magnetic field was produced by a current line, which is 20 mm long and 0.3 mm wide. Between the current line and the channel, an aerial region was defined. External limits were defined as magnetic insulation. The mesh element size for the current line and the air region was 0.1 mm. The mesh size in the microchannel region was 0.005 mm.

The complete simulation consisted of three parts, the magnetic model, the modeling of the flow through the microchannel and the convection-diffusion of the MNP through the channel. They were resolved sequentially with a time-dependent study.

The magnetic model was calculated in the microfluidic channel and in the air region.

The modeling of the flow through the microchannel depends on the volumetric force, which is well defined with the intensity of the magnetic field obtained from the magnetic

model. At the entrance of the channel, the speed was set as $u_0 = 0.004 \text{ m/s}$. At the exit of the channel, the pressure is zero. The boundary conditions are zero speed on the walls of the channel. To know the distribution of the MNP concentration, the convection and diffusion model was used, it was calculated only in the microfluidic channel.

The speed of the particle depends on the flow velocity profile and the magnetic force of the particle according to equation (10). The parameters used during the simulation are presented in Table I.

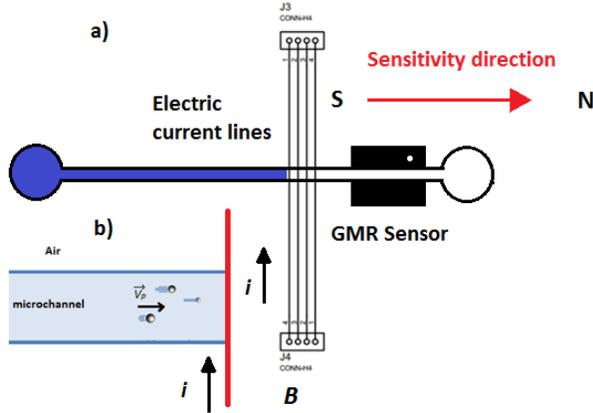


Fig. 1. a) Representation of the microfluidic channel implemented, before the detection region, four current lines were implemented to manipulate the MNP. However, the model is made with a single current line. b) Expansion of the microfluidic channel before the current line. The liquid flows in laminar conditions [6].

TABLE I
 SIMULATION CONSTANTS.

Symbol	Parameter	Value
r_p	Radius of the particle	$150 \times 10^{-8} \text{ m}$
χ	susceptibility magnetic	1
η	Viscosity	0.001 Ns/m^2
D	Diffusion coefficient	$1 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$
u_0	Entry speed	$1 \times 10^{-4} \text{ m/s}$
Cv_0	Initial concentration	0.001
ρ	Fluid density	1000 kg/m^3

III. RESULTS AND DISCUSSIONS

In the region of 10 mm to 20 mm, the magnetic field density is more intense, the results of the concentration distribution for different instants of time ($t = 0.5 \text{ s}$, $t = 2 \text{ s}$ and $t = 3 \text{ s}$) are explained below.

In Fig. 2 it is shown (the diffusion of the MNP for $t = 0.5 \text{ s}$). The concentration region is highly distributed in the channel, where the magnetic magnetic field is relatively large, that is, 0.35 mT to 13 mm of the channel; On the other hand, the speeds are small. In this case, we can consider a situation in which the magnetic force is greater than the drag force of the fluid.

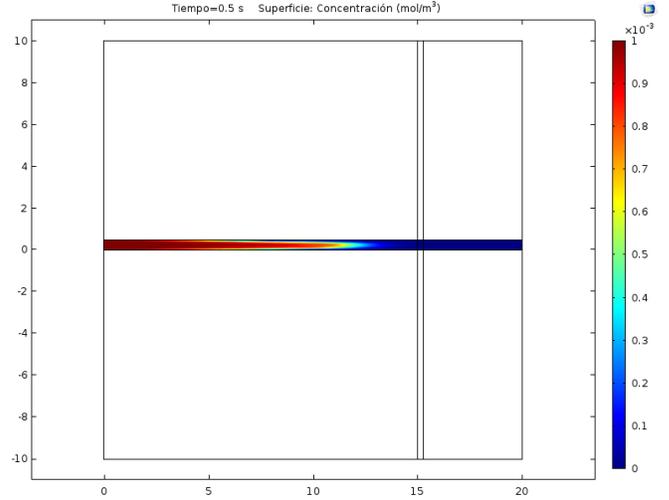


Fig. 2. Distribution of MNP concentration at $t = 0.5 \text{ s}$. In this case, we can consider a situation in which the magnetic force is greater than the drag force of the fluid.

In Fig. 3 it is shown (the diffusion of the MNP for $t = 2 \text{ s}$). A region of high concentration is observed in the current line where the magnetic field is more intense and uniform, in this case the MNP have been concentrated uniformly in the region of the current line.

In Fig. 4 is shown (the diffusion of the MNP for $t = 3 \text{ s}$). The distribution of the concentration of MNP has moved almost outside the current line, the particles have some resistance to the flow of the fluid due to the magnetic field given the elapsed time.

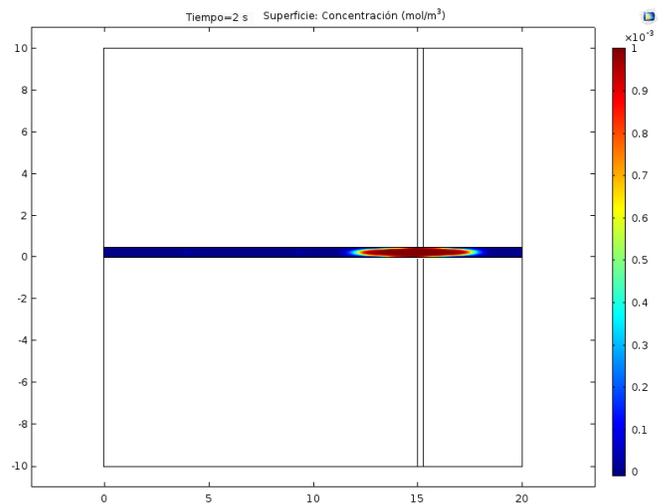


Fig. 3. Distribution of the MNP concentration at $t = 2 \text{ s}$, the concentration is evenly distributed in the region of the current line where the magnetic field is constant.

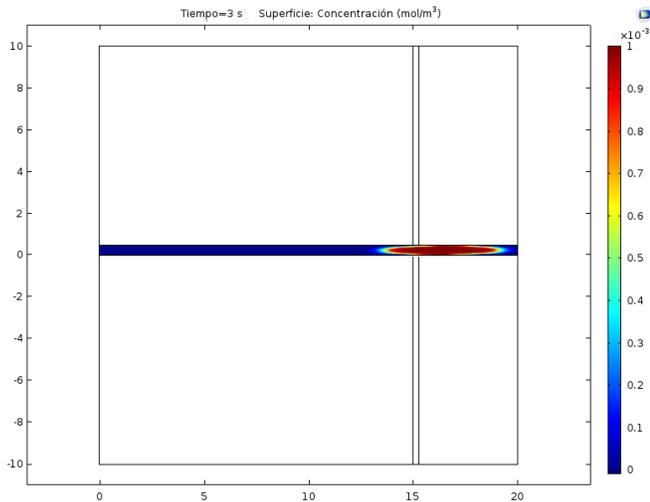


Fig. 4. Distribution of MNP concentration at $t = 3$ s, the particles have some resistance to fluid flow due to the magnetic field.

This model under ideal conditions is consistent with what would intuitively be expected from the distribution of magnetic nanoparticle concentration. However, the model can be improved by varying the current of the line and observing the distribution for different magnetic fields. On the other hand, a parametric study can be implemented by varying the flow velocity to observe the concentration of MNP. What can be useful to have a reference to the minimum excitation field of the MNP and the optimal flow velocity.

IV. CONCLUSION

This model was made using the finite element method, combining Navier-Stokes nonlinear equations and convection diffusion with the magnetic field equation to obtain the distribution of the concentration of MNP in a frontal microchannel under the influence of the two forces, namely, the drag force of the fluid and the magnetic force generated by a current line. The results appear to be intuitively consistent with the concentration distribution in the region near the current line. On the contrary, to validate the model, it is necessary to carry out experiments that allow the visualization of the MNP in a specific region of the channel. However, the model serves as a reference to design microfluidic systems.

ACKNOWLEDGMENT

We appreciate the funding for the development of the work presented project: ERAnet-EMHE 200022, CYTED-DITECROD-218RT0545 and Proyecto IV-8 call Amexcid-Auci 2018-2020.

REFERENCES

[1] Georgios Kokkinis, Susana Cardoso, Franz Keplinger, Ioanna Giouroudi, Microfluidic platform with integrated GMR sensors for

quantification of cancer cells, *Sensors and Actuators B* 241 (2017) 438–445.

[2] Szita N, Polizzi K, Jaccard N and Baganz F 2010 Microfluidic approaches for systems and synthetic biology *Curr. Opin. Biotechnol.* **21** 517–23 Bruss Henrik, 2008. *Theoretical Microfluidics*, Oxford University Press

[3] Warnke W C 2003 Finite-element modeling of the separation magnetic microparticles in fluid *IEEE Trans. Magn.* Cengel A. Yanus, Cimbala M. Jhon, 2006, *Mecánica de Fluidos Fundamentos y Aplicaciones*. McGraw Hill

[4] Matthews B D, LaVan D A, Overby D R, Karavitis J and Ingber D E 2004 Electromagnetic needles with submicron pole tip radii for nanomanipulation of biomolecules and living cells *Appl. Phys. Lett.* **85** 2968–70

[5] C. López, Goldie Oza 2019 A Proposal to Develop a Microfluidic Platform with GMR Sensors and the Use of Magnetic Nanoparticles in Order to Detect Cancerous Cells: Preliminary experimentation Global Medical Engineering Physics Exchanges (GMEPE) & Pan American Health Care Exchanges (PAHCE)

[6] Quanliang Cao, Xiaotao Han, Numerical analysis of magnetic nanoparticle transport in microfluidic systems under the influence of permanent magnets, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 45 (2012) 465001.