



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

ZIENTZIA
ETA TEKNOLOGIA
FAKULTATEA
FACULTAD
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado
Ingenieritza Elektronikoko Gradua / Grado en Ingeniería Electrónica

Diseño, fabricación y evaluación de circuitos microfluídicos para el movimiento de bacterias magnetotácticas

Egilea/Autor/a:
Igor Isasi Sánchez

Zuzendaria/Director/a:
Alfredo García Arribas

Zuzendarikide/Codirector/a:
María Victoria Martínez González

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Resumen

Este trabajo está dirigido hacia el ámbito biomédico, entorno que se centra en buscar nuevos métodos para combatir enfermedades a partir del estudio de aspectos biológicos relacionados con la medicina. El objetivo principal de este TFG es construir sistemas microfluídicos que puedan simular venas y arterias, dotando al equipo investigador de una plataforma para estudiar el comportamiento de las bacterias magnetotácticas (MTB) como bio-robots. La función que tienen estos microorganismos es la de transportar medicamentos y realizar tratamientos de hipertermia en zonas concretas del cuerpo. Se han fabricado tres tipos de microcanales simples, de una recta, con diferentes dimensiones, 1.5, 1 y 0.5 mm de ancho, 3 cm de largo y 100 μm de alto con reservorios de 8 mm de diámetro. Del mismo modo se han creado otros canales más complejos, con mayor dificultad para guiar las bacterias. Estos circuitos han sido creados en polidimetilsiloxano (PDMS), un polímero cada vez más utilizado en este tipo de investigaciones debido a sus propiedades de transparencia y biocompatibilidad. Asimismo, para la elaboración de los canales en PDMS se han utilizado moldes de SU-8 patronados por fotolitografía. A pesar de las dificultades surgidas a lo largo del proceso los resultados obtenidos son buenos. Se ha podido comprobar que es posible la creación de sistemas microfluídicos para el estudio del movimiento de las bacterias magnetotácticas, aunque se puede mejorar y avanzar más en la fabricación de estos dispositivos.

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Índice

Resumen	3
1 Introducción y objetivos	7
1.1 Contexto del trabajo	7
1.2 Objetivos del trabajo	7
2 Bacteria magnetotáctica	9
2.1 ¿Por qué bacterias magnetotácticas?.....	10
2.2 Magnetospirillum Gryphiswaldense	10
3 Desarrollo experimental	12
3.1 Materiales y dispositivos	12
3.1.1 Resina SU-8 100.....	12
3.1.2 Polidimetilsiloxano (PDMS).....	12
3.1.3 Plasma de oxígeno	14
3.1.4 Máscaras o fotomáscaras.....	15
3.1.5 Fotolitografía	16
3.1.6 Sala blanca.....	17
3.2 Fabricación de moldes en SU-8.....	18
3.2.1 Preparación del sustrato	18
3.2.2 Deposición de la resina	19
3.2.3 Procesado de la resina	20
3.2.4 Limpieza y secado	24
3.2.5 <i>Hardbake</i>	24
3.3 Proceso estampado PDMS	25
3.3.1 Mezcla de componentes	26
3.3.2 Eliminación de burbujas de aire	26
3.3.3 Curado del PDMS.....	27
3.3.4 Extracción del PDMS	28
3.4 Proceso de pegado	28
4 Resultados y discusión	31
4.1 Moldes SU-8.....	31
4.2 Réplicas PDMS.....	32
4.3 Pegado de vidrio y PDMS	32
4.4 Evaluación circuitos microfluídicos	33
4.5 Evaluación de las bacterias magnetotácticas en los canales	35
5 Conclusiones.....	37
Bibliografía.....	39

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



1 Introducción y objetivos

En la actualidad son muchas las técnicas que se estudian para mejorar los tratamientos médicos. Hacer frente a enfermedades como el cáncer de una forma efectiva y con los mínimos efectos secundarios es una de los objetivos más investigados. En este trabajo no se investiga ningún método con esta finalidad, pero si se desarrolla un sistema que ayude a lograr una nueva técnica terapéutica. Consiste en crear circuitos microfluídicos por los que se hará navegar a bacterias magnetotácticas.

1.1 Contexto del trabajo

El trabajo que se describe a largo de este documento forma parte de un proyecto más general en el que trabajan de manera conjunta investigadores de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU), de la Universidad de Cantabria (UC) y del Centro de Excelencia de la red Ikerbasque BCMaterials. Son investigadores de diferentes ramas de la ciencia de materiales, física, microbiología, ingeniería electrónica y medicina.

Es un proyecto ambicioso en el que la principal protagonista es la bacteria magnetotáctica, ya que mediante este tipo de bacterias se quieren desarrollar aplicaciones biomédicas como terapias contra el cáncer. El objetivo del proyecto es utilizar las bacterias vivas como bio-robots dirigidos mediante campos magnéticos a las zonas cancerígenas que se quieran tratar de una forma menos invasiva y más eficaz que los tratamientos que se conocen hoy en día. Estos tratamientos se basan en la liberación de calor (hipertermia) y en la dispensación de fármacos en las zonas tumorales actuando específicamente en el foco del problema.

1.2 Objetivos del trabajo

Como se ha comentado, este trabajo de fin de grado forma parte de un proyecto mucho mayor. La finalidad de este estudio es la de poder dotar de una plataforma experimental al grupo de investigación, construyendo canales microfluídicos que simulen los vasos sanguíneos donde las bacterias puedan ser controladas y dirigidas mediante un sistema tridimensional de campos magnéticos.

No solo se busca fabricar estructuras microfluídicas sino encontrar la forma más apropiada de crearlas, optimizando los procesos y materiales utilizados, solucionando los diferentes problemas que pueden presentarse durante la investigación. De esta forma se puede hacer una lista de objetivos más concretos, donde la consecución de cada una de ellos conlleva a lograr el objetivo principal de crear circuitos microfluídicos para el movimiento de las bacterias:

- Crear moldes de SU-8.
- Fabricar los canales en PDMS.
- Establecer las condiciones de pegado para unir el PDMS y los soportes de vidrio.



- Comprobar el funcionamiento adecuado de los canales (que no haya fugas).
- Evaluación del movimiento de las bacterias en los canales.

Otra de las metas propuestas es conocer el mundo científico e investigador, realizando un trabajo en equipo, compartiendo opiniones y aprender del resto de profesionales que forman parte el proyecto. Es una gran oportunidad de adquirir una buena experiencia con un objetivo interesante y motivador.

2 Bacteria magnetotáctica

Las bacterias magnetotácticas (MTB) son una clase de bacterias gram-negativas, flageladas y procariontas que tienen la habilidad de viajar a lo largo de las líneas del campo geomagnético. A este comportamiento se le conoce como magnetotaxis y es la capacidad que tienen las bacterias de poder orientarse y alinearse de forma pasiva bajo la acción de un campo magnético. Esto es posible debido a que las bacterias contienen unos orgánulos magnéticos especiales llamados magnetosomas que se encuentran organizados en estructuras de cadenas en las células [1] [2]. Los magnetosomas, en la mayoría de las bacterias magnetotácticas, están formados por cristales de magnetita (Fe_3O_4) o greigita (Fe_3S_4), unidos a la membrana y organizados en cadenas a través de un citoesqueleto. Debido a las propiedades especiales de los magnetosomas, estas bacterias son de gran interés para el paleomagnetismo, el magnetismo ambiental, los biomarcadores en rocas, los materiales magnéticos y la biomineralización en organismos. Las magnetitas bacterianas han sido explotadas para aplicaciones en las ciencias biológicas y médicas [3].

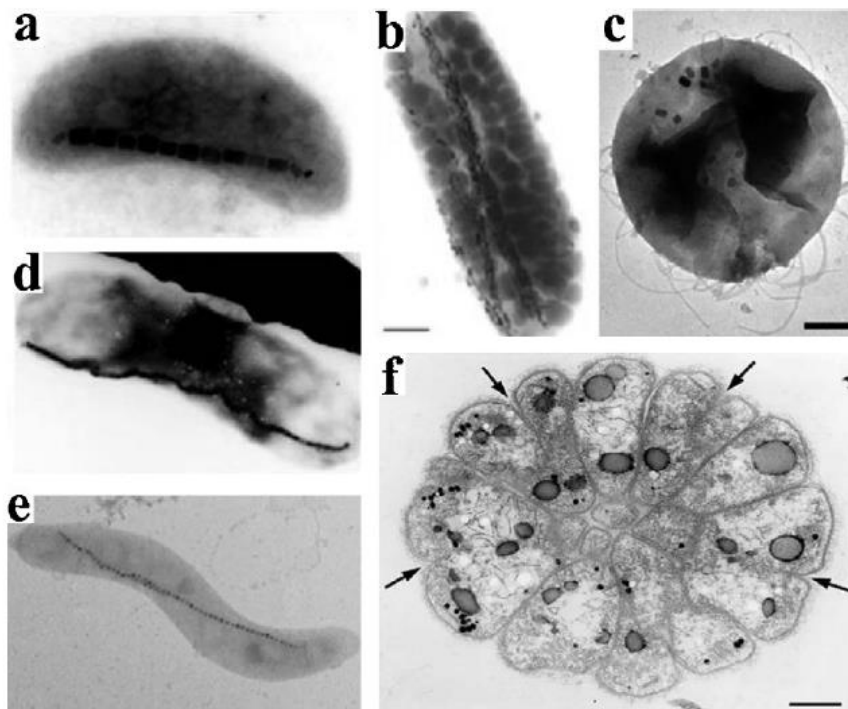


Figura 2.1: Diversas morfologías de MTB. a) vibrios; b) y d) rods; c) coccoid; e) spirilla; f) organismo multicelular [3].

Las MTB se pueden encontrar en hábitats acuosos, tanto en agua dulce como salada e incluso en zonas de tierra húmeda. Estos microorganismos juegan un importante papel en los procesos biogeoquímicos transportando minerales, siguiendo las líneas de campo magnético de la tierra, a zonas de baja concentración de oxígeno [1]. Tienen un tamaño aproximado de $5\ \mu\text{m}$ y se mueven hacia la posición de referencia utilizando la fuerza generada por sus flagelos [4]. En la **Figura 2.1** se muestran diversas morfologías de las MTB.

2.1 ¿Por qué bacterias magnetotácticas?

Las propiedades y características que tienen las MTB posibilitan un amplio campo de aplicaciones biomédicas. Entre estas aplicaciones se encuentran los dos tipos de tratamientos ya mencionados en la introducción, la hipertermia y el transporte de medicamentos.

Ambos tratamientos pueden ser combinados y complementarse entre ellos. Por un lado, el método de hipertermia que consiste en exponer la zona del cuerpo a tratar a altas temperaturas, logrando un calentamiento sin efectos secundarios. Para ello se dirigen las nanopartículas magnéticas al tejido tumoral, y mediante un campo magnético alterno externo se induce el calentamiento. Está demostrado que la necrosis de las células cancerígenas se produce a 43°C ya que son más sensibles que las de los tejidos sanos las cuales no se ven afectadas por esa temperatura. Además, se han encontrado respuestas biológicas inesperadas, tales como respuestas inmunes de tumores específicos como resultado de la expresión de la proteína de choque térmico. Esto significa que la hipertermia puede eliminar no solo tumores locales, sino tumores en lugares distantes, incluidas las células cancerígenas metastásicas [5].

Por otro lado, está el tratamiento mediante el transporte de medicamento. Como se ha comentado las bacterias magnetotácticas tienen una labor muy importante en la naturaleza, se encargan de trasladar minerales. Por tanto, el objetivo es cargar las bacterias con medicamentos y dirigir las a las áreas de células tumorales haciendo uso de campos magnéticos para realizar el tratamiento de una forma precisa. Una vez alcanzadas estas zonas los fármacos serían liberados por medio de un estímulo termal similar al utilizado para la hipertermia.

2.2 Magnetospirillum Gryphiswaldense

La bacteria *Magnetospirillum gryphiswaldense* (**Figura 2.2**) es una especie de MTB que tiene la capacidad de biomineralizar nanopartículas de magnetita (magnetosomas) organizadas en una cadena y que se comporta como una brújula magnética. Las células de *Magnetospirillum* son helicoidales y contienen entre 20 y 25 magnetosomas de magnetita (Fe_3O_4) con forma cubo-octaédrica y un diámetro aproximado de 40-45 nm dispuestos en una cadena [6]. Se utiliza este tipo de bacteria por la facilidad de cultivo en el laboratorio.

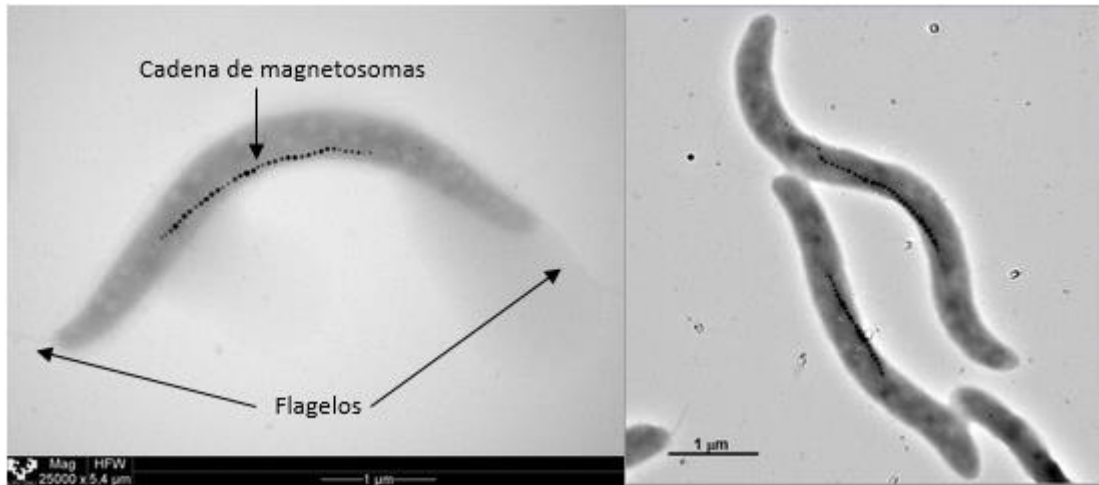


Figura 2.2: Bacteria Magnetospirillum Gryphiswaldense.

3 Desarrollo experimental

En este apartado se describen los diferentes materiales, dispositivos y procesos que se han llevado a cabo para poder construir los canales microfluídicos que puedan simular los vasos sanguíneos en los que introducir las bacterias y estudiar su comportamiento.

3.1 Materiales y dispositivos

3.1.1 Resina SU-8 100

La resina SU-8 100 pertenece al grupo de resinas epoxi de MicroChem, concretamente a la serie SU-8. Son resinas negativas basadas en epoxi químicamente amplificadas que son altamente funcionales, ópticamente transparentes y con un procesamiento de imagen cercano a la radiación UV (365 nm). Las películas o microestructuras curadas son muy resistentes a los solventes, ácidos y bases y tienen una excelente estabilidad térmica y mecánica. Esto las hace muy adecuadas para la fabricación de estructuras permanentes tales como paredes de píxeles, canales y boquillas de fluidos [7].

Este tipo de resinas se utilizan en aplicaciones de sistemas microelectromecánicos (MEMS), boquillas de inyección, sistemas microfluídicos y como en este trabajo para el moldeo de PDMS. Se pueden obtener imágenes con alta relación de aspecto con espesores en el intervalo de 2 a 200 μm con un simple proceso de centrifugado [8]. Esta resina puede alcanzar un espesor mínimo de 100 μm , de ahí su nombre SU-8 100 (**Figura 3.1**) y un espesor máximo de aproximadamente 250 μm dependiendo del proceso de centrifugado que se utilice, a mayor velocidad (rpm) menor espesor y viceversa [8]. Es posible realizar estructuras con espesores aún más finos utilizando, por ejemplo, las resinas SU-8 50, SU-8 25 y SU-8 2 [8].

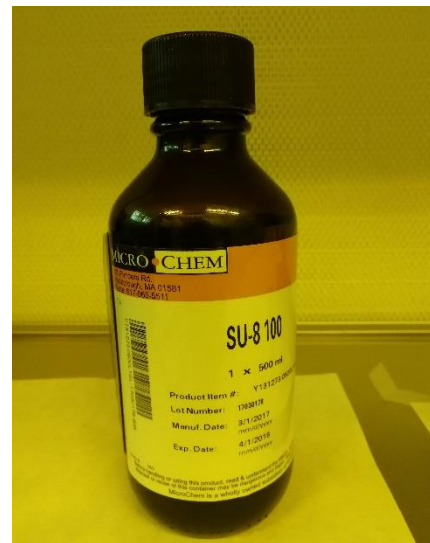


Figura 3.1: Resina SU-8 100.

3.1.2 Polidimetilsiloxano (PDMS)

El PDMS es uno de los polímeros orgánicos basados en silicio más utilizados, perteneciente al grupo de los organosilicios. El PDMS es ópticamente transparente y, en general, inerte, no tóxico, no inflamable, hidrófobo y biocompatible. También es conocido como dimeticona. Sus aplicaciones van desde lentes de contacto y dispositivos médicos hasta elastómeros. Además está presente en múltiples productos como champús, alimentos, cremas, lubricantes y cosmética [9].

PROPIEDADES	CARACTERÍSTICAS	CONSECUENCIAS
Química	<ul style="list-style-type: none"> • Peso molecular de unidad repetitiva 207.4 (g/mol). • Peso molecular numeral promedio de 27000. • Densidad de 0.982 g/mL y una viscosidad de 500 cSt. 	<ul style="list-style-type: none"> • Tamaño máximo de poro es de 80 μm^2. • Rugosidad de 550.87 nm.
Óptica	<ul style="list-style-type: none"> • Transparente. • UV longitud de onda de corte, 240 nm. Índice de refracción 1.4235. • Absorción del 0.04% y transmisión arriba del 95% en la región visible. 	<ul style="list-style-type: none"> • Detección óptica de 240 a 1100 nm. • Transparente en la región visible. Siendo homogéneo, lineal e isotrópico.
Eléctrica	<ul style="list-style-type: none"> • Aislante • Voltaje de colapso o falla de 2×10^7 V/m 	<ul style="list-style-type: none"> • Permite acoplamiento de circuitos. • No presenta defectos al abrir conexiones.
Mecánica	<ul style="list-style-type: none"> • Módulo de Young 1.2 MPa. • Coeficiente de Poisson 0.46. • Módulo cortante 411 KPa • Límite de tracción 1.9 MPa. • Límite elástico 700 KPa. • Densidad 0.982 g/mL. 	<ul style="list-style-type: none"> • Adopta la forma de la superficie. • Facilidad de moldeado. • Reversible cuando se actúa sobre él al deformarlo.
Térmica	<ul style="list-style-type: none"> • Aislante. • Conductividad térmica, 0.2 W/(m·K). • Coeficiente de expansión térmica, 310 $\mu\text{m}/(\text{m}\cdot^\circ\text{C})$. 	<ul style="list-style-type: none"> • Aislante térmico. • No permite disipación de calor.
Interfacial	<ul style="list-style-type: none"> • Baja energía libre superficial $\sim 20/\text{erg}/\text{cm}^2$. • 100% de elongación. 	<ul style="list-style-type: none"> • Las réplicas se separan fácilmente del molde. • Sellado reversible en materiales que contienen soluciones acuosas en canales.
Permeabilidad	<ul style="list-style-type: none"> • Impermeable al agua (hidrófobo). • Permeable a gases y solventes orgánicos no polares (Hidrófilo). 	<ul style="list-style-type: none"> • Permite transportar gas a través de grandes cantidades de material. • Incompatible con muchos solventes orgánicos.
Reactividad	<ul style="list-style-type: none"> • Inerte • Puede ser oxidado por exposición a un plasma 	<ul style="list-style-type: none"> • No reactivo con muchas sustancias químicas. • La superficie puede ser grabada. • Puede ser modificado para ser hidrofílico y también reactivo con silicio e hidrógeno. • Grabado con (TBA)F puede alterar la topografía de la superficie.
Toxicidad	<ul style="list-style-type: none"> • No toxico. 	<ul style="list-style-type: none"> • Puede ser implantado en vivo. • Soporta células mamíferas en crecimiento.

Tabla 3.1: Propiedades físico-químicas del PDMS [10].

Se trata de un material barato y de fácil manejo que no requiere de sistemas complejos para su proceso de fabricación. Por este motivo y gracias a sus propiedades de transparencia, biocompatibilidad y su adaptación a la superficie es, a priori, el mejor material para la creación de los canales microfluídicos.

En la **Tabla 3.1** se describen las características y las consecuencias que tienen las diferentes propiedades del PDMS.

El tipo de PDMS usado para este trabajo es el PDMS Sylgard 184 provisto por Dow Corning [11]. Es uno de los elastómeros transparentes más utilizados en aplicaciones biomédicas y sistemas microfluídicos.

3.1.3 Plasma de oxígeno

El plasma es un gas parcialmente ionizado altamente energético consistente en átomos o moléculas neutras, átomos o moléculas ionizadas y electrones libres. Puede ser inducido de varias formas, en un gas mediante la aplicación de un campo electromagnético DC o AC de alta energía, o bien por bombardeo de los átomos o moléculas del gas con alguna fuente de electrones.

Existen diferentes tipos de plasma y se clasifican en función de su temperatura [12]:

- **No térmicos o fríos:** son los que tienen una baja densidad de electrones, es decir, tienen una pequeña fracción de sus átomos ionizados. Se utilizan en la industria a bajas temperaturas. *Ejemplos:* lámparas fluorescentes, señales de neón, etc.
- **Calientes:** se crean calentando un gas hasta que sus electrones tienen la energía suficiente para poder liberarse de los átomos. Se relacionan con la astronomía o astrofísica. *Ejemplo:* el sol.

Uno de sus usos más habituales en la industria es el del tratamiento de superficies. El plasma posibilita modificar las superficies de distintos materiales, como vidrio, metales, metaloides, hule y polímeros de cualquier tamaño. Dentro del tratamiento de superficies se puede hacer una clasificación de las aplicaciones que tiene esta tecnología [13]:

- **Limpieza de superficies:** el tratamiento mediante plasma permite realizar limpiezas dejando la superficie libre de residuos.
- **Activación de superficies:** se utiliza en los casos en los que se quiere realizar un pegado o una unión química de un material inerte. Con la activación se crean radicales que favorecen las adhesiones.
- **Grabado de superficies:** es uno de los métodos más utilizados para la transferencia de microestructuras. De esta forma se pueden construir dispositivos nanoestructurados.
- **Recubrimiento de superficies:** añadiendo un monómero se pueden depositar capas muy finas de polímeros en las superficies tratadas con el plasma, así, se generan capas con distintas propiedades a las originales. *Ejemplo:* Convertir una superficie hidrofóbica en una hidrofílica.

En este trabajo se utiliza el plasma para la unión de las réplicas de PDMS, obtenidas a partir de los moldes de SU-8, con portaobjetos de vidrio. Para ese proceso de adhesión se utiliza plasma de oxígeno para la activación de las superficies que se quieren unir.

Se trata de un tipo de plasma frío con el que se crean radicales libres en las superficies tratadas mejorando el pegado interfacial.

3.1.4 Máscaras o fotomáscaras

Las máscaras contienen los diseños con los que se quieren fabricar los chips o como en este trabajo los canales microfluídicos y se utilizan para transferir esos patrones al sustrato. Son láminas de superficie plana y pulida fabricadas con un material con alto índice de transparencia óptica y bajo coeficiente de expansión térmica.

El diseño de las máscaras se puede hacer mediante un software CAD como, por ejemplo, AutoCAD, Inkscape o CorelDraw. Es importante que la impresión sea de alta resolución para que sean lo más opacas posible y no pueda traspasar la luz UV.

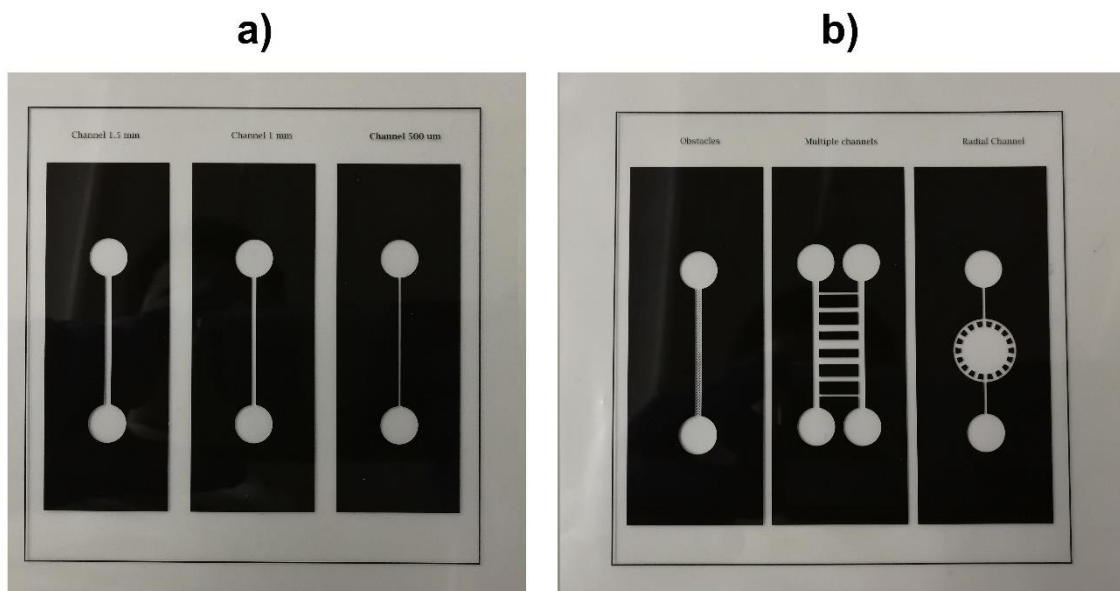


Figura 3.2: Máscaras de acetato. a) Rectas simples de diferentes anchuras de canal. b) Diseños de mayor complejidad.

Después de crear los diseños no ha sido posible fabricar las fotomáscaras con los recursos disponibles por lo que ha sido necesario pedir que las hicieran. La empresa encargada de la fabricación de las máscaras ha sido JD PHOTO DATA que está especializada en servicios fotográficos para la industria de circuitos impresos [14].

En la **Figura 3.2** se muestran los diferentes diseños imprimidos sobre acetato. Los primeros son simples líneas rectas con diferentes anchuras de canal, 1.5, 1 y 0.5 mm respectivamente y con una largura de 3 cm que conectan dos reservorios de 8 mm de diámetro. Por otro parte, se han realizado otros tres diseños algo más complejos para poder ver la respuesta de las bacterias en diferentes circuitos bajo la acción de campos magnéticos. De esta forma se puede ir avanzando en la investigación simulando cada vez situaciones más reales.

3.1.5 Fotolitografía

El proceso de fotolitografía consiste en transferir patrones que contienen las fotomáscaras a la superficie del sustrato mediante radiación ultravioleta (UV) como se muestra en la **Figura 3.3**. Por lo general, en la fabricación de circuitos integrados el sustrato es una oblea de material semiconductor. En este caso se utilizan portaobjetos de vidrio estándar (76 × 26 mm y espesor < 1mm) como base donde dispensar la resina y crear los moldes para los microcanales.

Las etapas básicas de un proceso de fotolitografía son:

- Preparación de la superficie del sustrato (limpieza, eliminar contaminantes).
- Distribución de la resina en el sustrato mediante centrifugado.
- Evaporar disolvente de la resina sobre una placa calefactora, *soft-baking*.
- Exponer la resina a la luz UV transfiriendo el patrón de la máscara.
- Revelado, polimerización de la resina.
- Eliminar por evaporación, sobre una placa calefactora, los restos de disolvente, *hard-baking*.

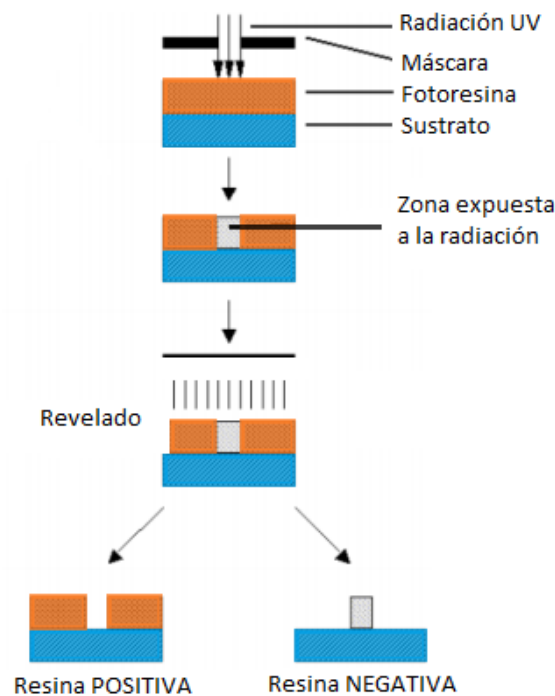


Figura 3.3: Proceso de transferencia, fotolitografía.

Es importante saber qué tipo de resina se está utilizando, negativa o positiva, ya que al realizar el proceso de fotolitografía la zona expuesta a la luz UV no se comporta igual. La positiva que recibe la radiación se hace más soluble en el revelador mientras que la negativa se hace más resistente al efecto del revelador. En este caso, el SU-8 100 al ser resina negativa, la zona expuesta es la que se queda adherida en el sustrato, lo que ha de tenerse en cuenta a la hora de diseñar las máscaras.

En los procesos de litografía óptica se utilizan fuentes que emiten en el espectro ultravioleta, el cual se solapa en un pequeño tramo con el espectro visible. Las resinas reaccionan a las longitudes de onda UV por lo que durante la fotolitografía es necesario tener una iluminación que no afecte a las resinas antes de su exposición y las estropee. Para ello los laboratorios donde se trabajan estas técnicas suelen estar iluminados con luz amarilla que evita el revelado de la resina.

Los pasos mencionados en este apartado son generales para cualquier desarrollo de este estilo, luego dependiendo de la finalidad y de los materiales utilizados el procedimiento puede variar en función del resultado deseado. En el apartado **3.2** se describe detalladamente el proceso utilizado en este trabajo.

3.1.6 Sala blanca

En la industria de semiconductores para controlar la contaminación comenzaron utilizando tecnología del sector espacial, pero a medida que se fueron reduciendo las dimensiones de los dispositivos en los circuitos integrados aumentaron las exigencias de control de la contaminación, la más mínima partícula podía estropear el chip. Por ello se crearon recintos especiales como las salas blancas para evitar este tipo de problemas.

Las salas blancas son laboratorios donde la limpieza es muy importante. Para trabajar en este laboratorio es necesario ir vestido con la indumentaria adecuada: bata, guantes, gorros, cubre-calzado, etc.

El equipamiento y condiciones (humedad, temperatura, luz amarilla, filtrado de aire, campanas de flujo laminar, etc.) necesarias para realizar los procesos de fotolitografía se encuentran en la sala blanca. El laboratorio donde se ha realizado el trabajo es el que se ve en la **Figura 3.4**.

Los equipos que se encuentran en la sala blanca y que se han utilizado en este trabajo son:

- **Spinner:** se utiliza para depositar la resina por todo el sustrato mediante centrifugado.
- **Alineadora de máscara:** equipo con el que se realiza la fotolitografía.
- **Horno:** sirve para acelerar el curado del PDMS.
- **Equipo de ultrasonidos:** ayuda a que el revelado de la resina tras la fotolitografía sea más efectivo.
- **Placas calefactoras:** importantes para evaporar los solventes durante el proceso de fotolitografía. También se utilizan para mejorar la adhesión final del sistema microfluídico.
- **Balanzas:** para controlar las cantidades de resina y PDMS que se utilizan.
- **Campana de vacío:** trascendental para eliminar las burbujas de aire del PDMS.



Figura 3.4: Vista general de la sala blanca o sala de fotolitografía.

3.2 Fabricación de moldes en SU-8

En este apartado se describe el proceso completo (**Figura 3.5**) que se ha utilizado durante este trabajo para la creación de moldes de SU-8, y así poder obtener réplicas en PDMS que posteriormente se utilizarán como canales microfluídicos. La resina utilizada ha sido la SU-8 100 de MicroChem permitiendo tener un espesor mínimo de 100 μm . El método utilizado es la litografía y cada uno de los pasos del proceso influye de una forma muy significativa en los resultados finales, por lo que es importante detallar de manera precisa cada una de las fases [17].

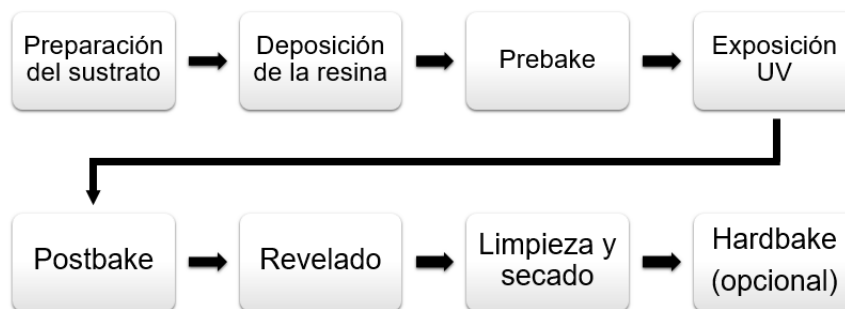


Figura 3.5: Fases del procesado de SU-8.

3.2.1 Preparación del sustrato

Como ya se ha comentado en el apartado **3.1.5** los sustratos utilizados para la fabricación de microestructuras SU-8 son portaobjetos de vidrio estándar para microscopios. Las razones por las que se utilizan estas láminas de cristal como base son varias. Su bajo coste, alta transparencia y su tamaño permiten realizar chips microfluídicos compatibles con sistemas ópticos.

En todos los procesos de fabricación de estas características la limpieza es trascendental, ya que el resultado final puede verse afectado negativamente por un mal lavado de la superficie. Por tanto, antes de utilizar los vidrios lo primero que se hace es un buen saneamiento utilizando disolventes como el isopropanol, un posterior

secado con gas de nitrógeno y finalmente deshidratar las superficies en una placa calefactora a 200°C durante 5 min. De esta forma se favorece que la resina tenga una mejor adherencia lo cual es de gran importancia, teniendo en cuenta la finalidad para la que se crean estas microestructuras. Todo este proceso de preparación del sustrato es trascendental para el espesor final de la microestructura que servirá de molde para el PDMS. Que la altura sea igual en todo el canal permitirá un mejor estudio de las bacterias a lo largo de él, estando siempre en las mismas condiciones.

3.2.2 Deposición de la resina

Tras la limpieza de las superficies de los vidrios que se van a utilizar como sustrato se pasa a depositar la resina en ellos. La fotoresina reacciona al espectro UV por lo que es totalmente necesario que la luz del laboratorio durante el proceso sea amarilla. Al ser muy espesa es necesario ayudarse de un par de espátulas para distribuirla en el sustrato, que estará en una balanza, **Figura 3.6 (a)**, para controlar la cantidad vertida. Tras varias pruebas, se ha determinado que la cantidad apropiada para poder cubrir el portaobjetos por completo y de forma uniforme es de aproximadamente 1,2 g.

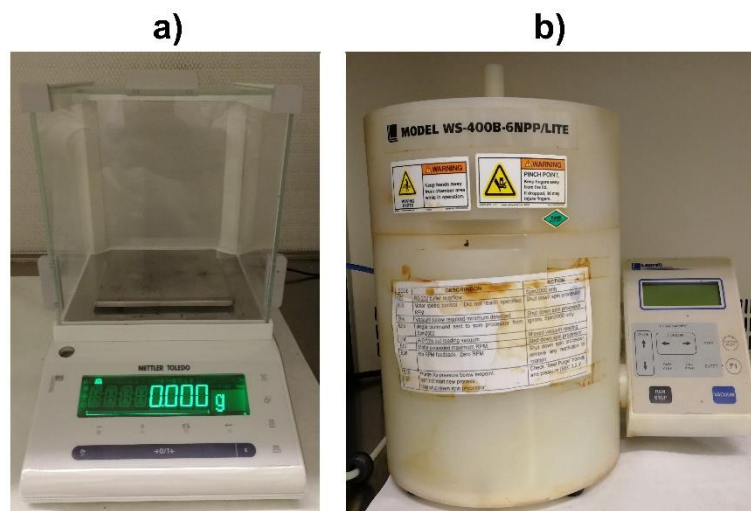
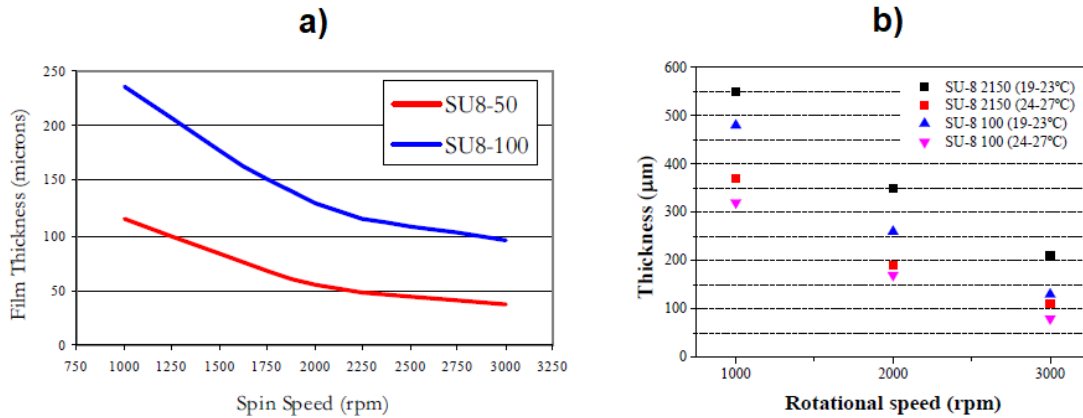


Figura 3.6: a) Báscula de precisión. b) Spinner.

Una vez esté el portaobjetos con la resina se lleva al *spinner* (*spin-coater*), **Figura 3.6 (b)**, que es el dispositivo con el que se realiza el centrifugado (*spin-coating*) de manera que distribuye la resina de un modo uniforme. El espesor viene determinado por la velocidad rotacional que se aplique en el centrifugado que está especificada en las hojas de características del fabricante. Aunque para el caso de la resina SU-8 100 hay que tener en cuenta otros parámetros, como la temperatura ambiental, a la hora de elegir los diferentes ciclos del centrifugado porque esto afecta al comportamiento de la resina pudiendo obtener un rango mayor de grosores. En la **Gráfica 3.1** se pueden ver las diferentes gráficas donde se especifican los valores de los espesores en función de la velocidad rotacional y de dos rangos de temperatura.



Gráfica 3.1: Esesor en función de la velocidad de rotación. a) Gráfica fabricante [8]. b) Gráfica artículo con los rangos de temperatura [15].

El programa de centrifugado se ha configurado en tres ciclos (guardado en la memoria del *spinner*, programa R). El primer ciclo es de 500 rpm durante 7 s para iniciar el centrifugado. El segundo se utiliza para hacer un cambio progresivo entre el primero y el tercero y son 12 s a 3000 rpm. Por último, está el ciclo que determina el esesor que tendrá la resina en el portaobjetos y que está programado a 3000 rpm durante 30 s. Al acabar el programa con el portaobjetos ya cubierto se puede pasar a la siguiente fase.

3.2.3 Procesado de la resina

I. *Prebake*

El *prebake* es un horneado previo a la fase de exposición UV y transferencia del patrón de la máscara. La finalidad de este tratamiento térmico es, por un lado, la de evaporar el solvente del SU-8 y por otro la de seguir mejorando la adhesión al sustrato. El proceso está dividido en dos etapas. La primera consiste en colocar la muestra en una placa calefactora a 65°C durante 25 min con lo que se consigue una evaporación lenta del solvente y se optimiza el pegado de la resina. En la segunda también se utiliza una placa calefactora, pero se aumenta la temperatura hasta los 95°C en la que el sustrato permanecerá 45 min con el objetivo de densificar la resina y reducir tensiones. Los tiempos de horneado dependen del tipo de resina utilizada y del esesor que se quiere obtener.

a)				b)			
Product Name	Thickness (µms)	Pre-bake @ 65°C	Softbake @ 95°C	SU-8 type	Final thickness (µm)	Prebake time (min)	
						65 °C	95 °C
	40	5	15		130 ± 10	25	45
SU-8 50	50	6	20	SU-8 100 (RT 19–23 °C)	260 ± 15	35	80
	100	10	30		480 ± 20	50	180
SU-8 100	100	10	30		80 ± 10	15	35
	150	20	50	SU-8 100 (RT 24–27 °C)	170 ± 15	30	60
	250	30	90		320 ± 20	40	120

Tabla 3.2: Parámetros óptimos para las etapas del *prebake*. a) Tabla del fabricante [8]. b) Tabla del artículo [15].

El fabricante facilita los valores para estas etapas (**Tabla 3.2 (a)**) [8] al igual que para el proceso de deposición, hay que tener en cuenta la temperatura ambiente del laboratorio por lo que estos parámetros pueden variar (**Tabla 3.2 (b)**) [15].

Tanto un calentamiento rápido como un corto periodo de tiempo de horneado pueden ocasionar una evaporación incompleta del solvente. Si eso ocurre, puede que la microestructura se contraiga tras la exposición y se separe del sustrato después del revelado debido a la formación de una película en la superficie de la capa de SU-8 y a la existencia de resina no polimerizada en el fondo.

Finalizado el tratamiento se dejan enfriar las láminas de vidrio con la resina a temperatura ambiente antes de exponerlas a la luz ultravioleta.

II. Exposición a la luz UV

La exposición de la resina a la luz UV permite la transferencia de los patrones que contienen las fotomáscaras. La luz provoca la polimerización del SU-8, es decir, cura la resina provocando que pase de un estado líquido a uno sólido de forma relativamente rápida. La rapidez depende de la intensidad que tenga la lámpara, a mayor intensidad menor tiempo de exposición será necesario. Para calcular el tiempo adecuado se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{Tiempo de exposición (s)} = \frac{\text{Energía de exposición } \left(\frac{\text{mJ}}{\text{cm}^2}\right)}{\text{Intensidad de la luz } \left(\frac{\text{mW}}{\text{cm}^2}\right)}$$

El equipo utilizado es un alineador de máscara como el que se presenta en la **Figura 3.7 (a)**. La energía de exposición la determina el fabricante con un valor aproximado de 540 (mJ/cm²) para un espesor de 100 μm. En lo que se refiere a la intensidad de la luz, en este caso se mide cada vez que se utiliza el dispositivo. Es necesario encender la lámpara al menos una hora antes de utilizarla para que se establezca su punto máximo de intensidad. Transcurrido ese período y haciendo uso de un sensor, **Figura 3.7 (b)** se realiza un test para saber la intensidad proporcionada por la lámpara.

Todas las fases del proceso son importantes, pero puede que esta sea la más crítica de todas. Una buena alineación y el período óptimo de exposición son las claves de una buena transferencia del patrón, que contiene la máscara, al sustrato con la resina. Calcular el tiempo necesario es muy significativo porque tanto si es superior o inferior al adecuado conlleva consecuencias irreparables y no deseadas para lograr el objetivo final. Una exposición excesiva a la luz UV puede endurecer la resina que no está siendo tratada debido a la difusión de ácido. Por el contrario, si no se alcanza el tiempo óptimo la microestructura creada tendrá imperfecciones.

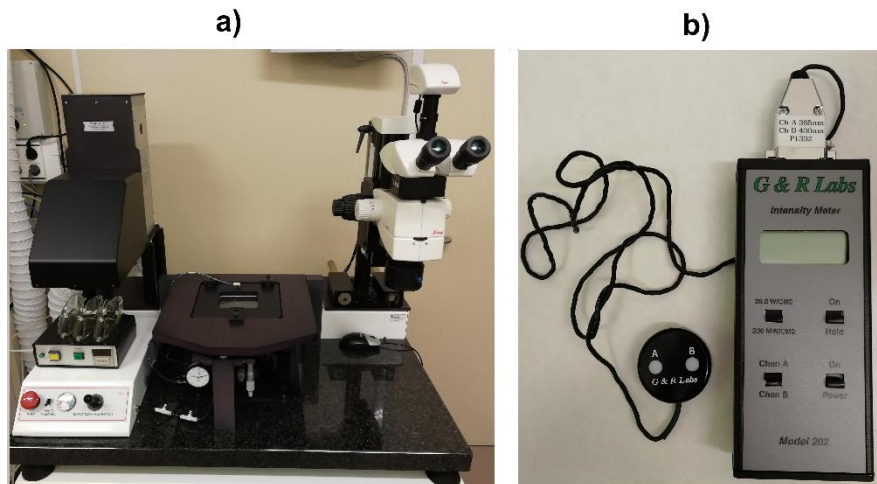


Figura 3.7: a) Alineadora de máscara. b) Sensor de intensidad luminosa.

Los pasos a seguir para el proceso de fotolitografía son:

- Encender la lámpara con una hora de antelación.
- Transcurrido la hora medir la intensidad con la que va a iluminar la lámpara.
- Calcular el tiempo óptimo de exposición.
- Colocar la máscara en el soporte y fijarla mediante vacío.
- Ubicar el sustrato con la resina en la base de la alineadora.
- Alinear el sustrato con el patrón que se quiera transferir de la máscara.
- Activar la luz UV durante el tiempo necesario.
- Terminada la exposición, retirar el vidrio y pasar a la siguiente fase del proceso.

III. *Postbake*

El *postbake* es el tratamiento térmico tras la fotolitografía y sirve para crear los enlaces cruzados y así contribuir a la diferencia de las propiedades físicas de la resina. Esto hace que la zona irradiada de SU-8 se vuelva resistente al solvente a la hora de realizar el revelado.

Los pasos a seguir son similares a los del *prebake*. Se divide en dos etapas utilizando placas calefactoras a 65°C y 95°C respectivamente. Las temperaturas son iguales que en el tratamiento seguido en el *prebake*, la única diferencia son los tiempos que tienen que estar las muestras en cada una de las placas. Los parámetros vienen determinados en la hoja de características proporcionadas por el fabricante MicroChem (**Tabla 3.3 (a)**) [8], pero del mismo modo que para los procesos de deposición y pre horneado esos valores difieren un poco dependiendo de la temperatura ambiente del laboratorio donde se trabaja. Por ello se tienen en cuenta los valores que se deberían escoger en cada una de las circunstancias (**Tabla 3.3 (b)**) [17].

a)

Product Name	Thickness (µm)	PEB 1 @65°C	PEB 2 @95°C
	40	1	4
SU-8 50	50	1	5
	100	1	10
	100	1	10
SU-8 100	150	1	12
	250	1	20

b)

SU-8 type	Final thickness (µm)	Postbake time (min)	
		65 °C	95 °C
SU-8 100 (RT 19–23 °C)	130 ± 10	5	10
	260 ± 15	10	15
	480 ± 20	20	25
SU-8 100 (RT 24–27 °C)	80 ± 10	5	10
	170 ± 15	10	12
	320 ± 20	15	20

Tabla 3.3: Parámetros óptimos para las etapas del *postbake*. a) Tabla del fabricante [8]. b) Tabla del artículo [15].

Después de la última etapa es recomendable enfriar el sustrato lentamente para evitar que se fracture por una brusca diferencia de temperatura.

IV. Revelado

Para concluir con la fabricación de los moldes de SU-8 se tiene que realizar el revelado del sustrato para eliminar la resina no polimerizada. Con la ayuda de un recipiente de vidrio como el que se muestra en la **Figura 3.8 (a)** específico para sumergir portaobjetos en soluciones y un dispositivo de ultrasonidos, como el de la **Figura 3.8 (b)**, se hace el revelado de forma sencilla. El sistema de ultrasonidos se ha utilizado para mejorar la eficiencia en la eliminación del SU-8 no expuesto.

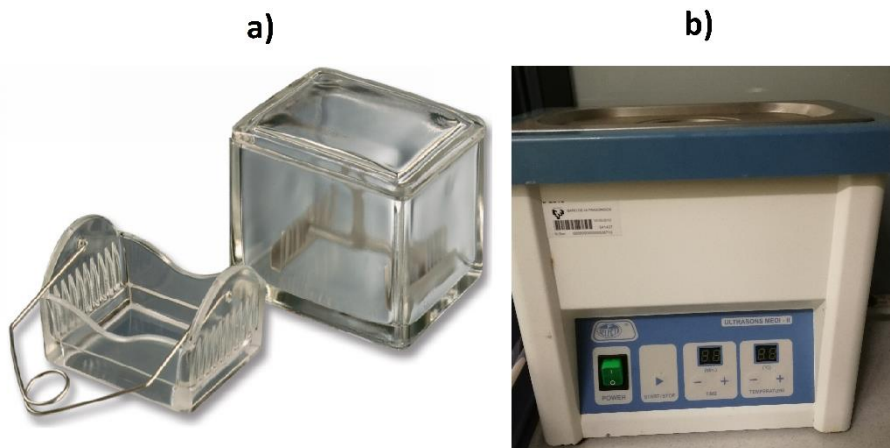


Figura 3.8: a) Cubeta de vidrio para portaobjetos. b) Dispositivo de ultrasonidos.

Se rellena la cubeta con el revelador provisto por MicroChem hasta que los portaobjetos queden cubiertos. El soporte permite sumergir hasta 8 portaobjetos a la vez lo que facilita la fabricación de varias estructuras al mismo tiempo. Para que el revelado sea eficaz se introduce la caja en el dispositivo de ultrasonidos donde se puede establecer el tiempo del tratamiento. En este caso, al igual que en fases anteriores, el fabricante facilita los parámetros a utilizar para el proceso y análogamente también se tiene en

cuenta las condiciones en las que se trabaja en el laboratorio. Los valores recomendados tanto por MicroChem como por el estudio en el que se basa todo el procedimiento son:

a)			b)		
Product Name	Thickness (µms)	Development (minutes)	SU-8 type	Final thickness (µm)	Development time (min)
	40	6		130 ± 10	10
SU-8 50	50	6	SU-8 100 (RT 19–23 °C)	260 ± 15	20
	100	10		480 ± 20	35
	100	10		80 ± 10	7
SU-8 100	150	15	SU-8 100 (RT 24–27 °C)	170 ± 15	12
	250	20		320 ± 20	25

Tabla 3.4: Parámetros óptimos para el revelado. a) Tabla del fabricante [8]. b) Tabla del artículo [15].

3.2.4 Limpieza y secado

Terminado el revelado se pasa al lavado y secado de las estructuras. Previamente se sumergen las muestras en agua desionizada con el fin de detener la reacción. Para limpiar bien las superficies se utiliza isopropanol seguido de un secado por nitrógeno gaseoso. Si se observa una capa blanquecina en la superficie de la muestra durante el enjuagado con el alcohol significa que no se ha revelado bien por lo que será necesario volver a la fase anterior y repetirla hasta que desaparezca. Los motivos por los que no se haya eliminado bien toda la resina pueden ser: 1) que no ha estado el tiempo suficiente sumergida y agitándose. 2) al reutilizarse el revelador haya perdido las propiedades y no sea tan efectivo.

Al finalizar esta fase se obtienen las microestructuras de SU-8, **Figura 4.1**, que servirán de molde para la creación de los canales microfluídicos.

3.2.5 *Hardbake*

Es una fase opcional que se utiliza cuando el molde de la resina SU-8 se quiere utilizar como parte de un dispositivo. Se coloca la muestra en una placa calefactora a una temperatura entre 150 y 200°C, y los tiempos varían dependiendo del método de calentamiento y del espesor de la resina.

En este caso lo que interesa es que la resina se quede lo más adherida posible al vidrio, ya que la finalidad es poder hacer varias réplicas con el mismo molde y no tener que repetir el proceso de fabricación aquí descrito cada vez que se quiere crear un microcanal.

3.3 Proceso estampado PDMS

En este proceso se explica el camino que se ha seguido para realizar réplicas de PDMS a partir de los moldes de SU-8. La transparencia y la biocompatibilidad que ofrece el polidimetilsiloxano (PDMS) hace que sea el material adecuado para la creación de los canales microfluídicos además de su facilidad de manipulación.

El PDMS, comercialmente conocido como Sylgard 184, viene provisto en dos componentes líquidos: una base de monómero y un agente curador. La mezcla de ambos permite la formación de un polímero sólido y elástico. La proporción en la que se tienen que combinar es de 10:1 en peso (base : agente curador) según los parámetros marcados por la hoja de características. La solidificación no se produce de manera instantánea, requiere cierto tiempo que varía en función de la temperatura a la que se cure [14].

Temperatura de curado	Tiempo de curado
25°C	48 horas
100°C	35 minutos
125°C	20 minutos
150°C	10 minutos

Tabla 3.5: Valores de la hoja de características Sylgard 184 [11].

Con los recursos disponibles se han hecho diferentes pruebas para establecer una temperatura idónea con un tiempo razonable de curado. Viendo los valores de la **Tabla 3.5** como referencia se ha decidido fijarla en 80°C y a partir de ahí comprobar el curado de varias muestras en distintos tiempos. Se quiere conseguir un bloque sólido, elástico y transparente. Tras los ensayos realizados en un horno de mesa se ha llegado a la conclusión que para esa temperatura el tiempo óptimo de curado del PDMS es de aproximadamente 1 hora. Con un menor tiempo se observa que el polímero no se ha curado del todo, se encuentra todavía en un estado viscoso. Por el contrario, un tiempo excesivo lo deteriora dejándolo más rígido.

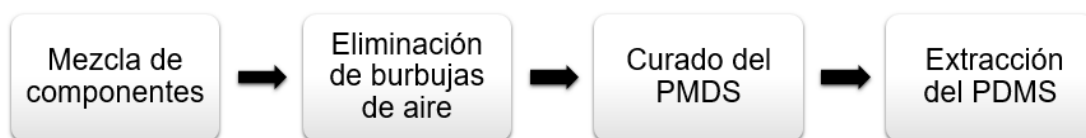


Figura 3.9: Fases del proceso de estampado de PDMS.

El estampado se divide en cuatro sencillas fases, **Figura 3.9**, las cuales no requieren sistemas complejos para su implementación.

3.3.1 Mezcla de componentes

El primer paso para crear las réplicas de PDMS es realizar la mezcla de los dos componentes. Con la ayuda de una báscula (**Figura 3.10 (b)**) se miden las cantidades necesarias de cada uno de ellos. Primero se vierte, con mucho cuidado, la base de monómero la cual resulta muy espesa y no es posible manipularla con pipetas. La cantidad necesaria ronda los 6 g para cubrir cuatro moldes de SU-8. Una vez precipitado el primer componente se procede a añadirle el agente curador. Este líquido no es tan espeso y al contrario que el anterior es posible hacer uso de pipetas para dispensarlo. Cumpliendo con la proporción, es necesario agregar 0,6 g de este elemento. Para terminar, se utiliza un palillo de plástico o cualquier elemento que no contamine ni ensucie el preparado y se remueve la mezcla hasta que sea homogénea.

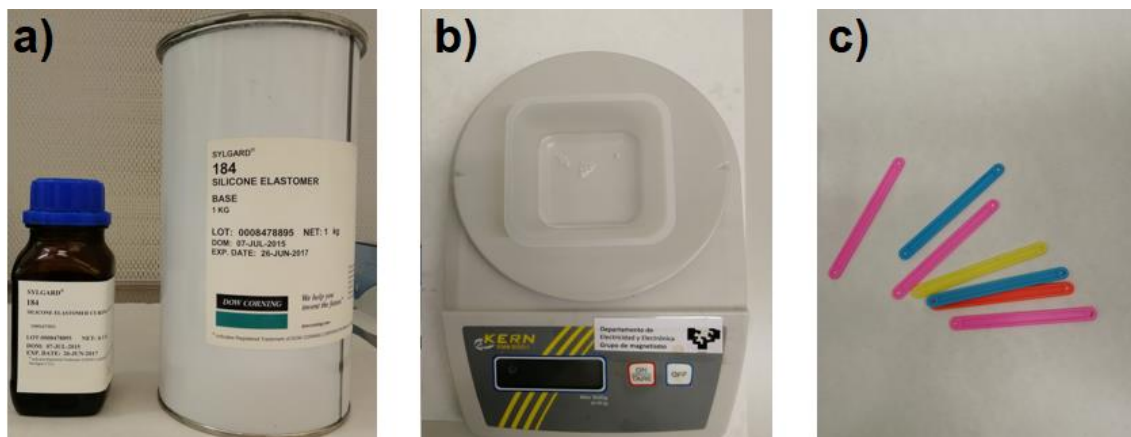


Figura 3.10: a) PDMS Sylgard 184 en dos componentes, agente curador y base respectivamente. b) Báscula y recipiente para la mezcla. c) Palillos para remover la mezcla.

3.3.2 Eliminación de burbujas de aire

Después de haber mezclado bien los dos componentes, se observa que se han creado una gran cantidad de burbujas de aire. Como se quiere que el resultado final sea un bloque de polímero sólido y uniformemente transparente es necesario eliminarlas. Para quitar estas burbujas se utiliza la campana de vacío que se presenta en la **Figura 3.11** y es aconsejable meter el recipiente en la campana antes de verter la mezcla en los diferentes moldes, así, será más sencillo que las burbujas desaparezcan en un menor tiempo. Al ser la superficie más grande las burbujas salen más fácilmente. Cuando ya no se ven se puede echar la mezcla sobre las microestructuras de SU-8. Es posible



Figura 3.11: Campana de vacío.

que al pasar de un lado al otro se vuelva a crear alguna burbuja o que simplemente no se eliminaran todas, por tanto, será necesario volver a repetir el proceso.

3.3.3 Curado del PDMS

La etapa de curado se efectúa en un horno (**Figura 3.12**) de sobremesa convencional y es más rápido cuanto mayor sea la temperatura. Se ha decidido establecer la temperatura en 80°C ya que permite sacar las muestras al cabo de 1 hora. Son los valores con los que se ha trabajado, pero no tienen por qué ser siempre esos. Si es necesario acortar el tiempo se aumenta la temperatura, pero si por el contrario no se quiere curarlo tan rápido o no se tienen los medios para que la polimerización sea tan breve es posible hacerlo en entornos más fríos, aunque esto implica un mayor tiempo.

Para poder tener la temperatura constante en el horno durante el curado del PDMS se ha utilizado un controlador (ESM-7311-H Heating Controller) que utiliza un termopar para medir la temperatura del interior del horno. Así, cuando el controlador detecta que se sobrepasan los 80°C deja de suministrar corriente y si es inferior lo mantiene activo. También se han introducido 4 bloques de aluminio que ayudan a homogeneizar lo máximo posible la temperatura, evitando cambios bruscos.

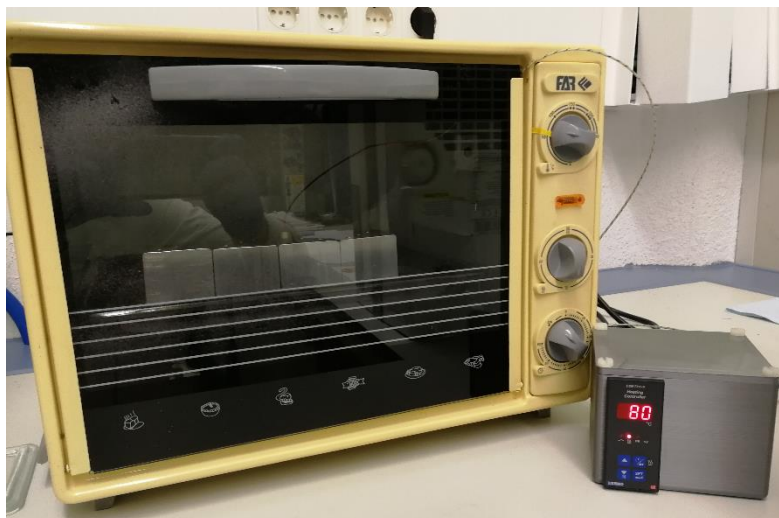


Figura 3.12: Horno y controlador de temperatura.

Tras haber eliminado todas las burbujas, se vierte la mezcla sobre los moldes de SU-8 cubriéndolos con la mínima cantidad necesaria, de 1 a 2 mm a lo sumo para que se puedan ver las bacterias a lo largo del canal en el microscopio. Para que el polímero no se extienda más de lo debido se han construido cuatro estructuras de teflón en forma de marco. Estas molduras se colocan encima de las muestras con la resina sujetándolas con cinta kapton por sus extremos como se muestra en la **Figura 3.13**.



Figura 3.13: Molde de SU-8 con marcos de teflón sujetos con kapton.

3.3.4 Extracción del PDMS

Por último, se separa la réplica de PDMS del molde de SU-8. Es una de las etapas más delicadas, ya que además de tener cuidado con no romper y ensuciar el polímero, se comprueba cómo de adherida está la microestructura de resina al sustrato y si será posible volver a reutilizarla. Cuando ya se tiene el duplicado de PDMS aislado se cortan los bordes con una cuchilla para que quede una lámina uniforme.

3.4 Proceso de pegado

Para concluir el fabricado de los canales microfluídicos se realiza el pegado entre el PDMS y un portaobjetos de vidrio. Tiene que ser una unión eficaz donde le canal formado no tenga fugas.

El método que se emplea es la activación de superficies mediante plasma, y el equipo utilizado para su creación es el de la **Figura 3.14**, el RIE NRE-4000 de Nanomaster. Se exponen ambas superficies, la de vidrio y la del PDMS, a un tratamiento con plasma de oxígeno favoreciendo la creación de radicales que permiten una adherencia prácticamente instantánea entre los dos materiales.



Figura 3.14: RIE NRE-4000.

El RIE posee dos cámaras conectadas que permiten un trabajo más sencillo y rápido. La cámara principal es donde se realizan los tratamientos con el plasma. Se puede controlar la presión, la potencia RF y la cantidad de gas que se mete en ella. Por otro lado, está la pre-cámara con la que se pueden introducir y extraer a la cámara principal los objetos pudiendo manipularlos mejor.

El NRE-4000 tiene un programa de LabVIEW instalado en el que solo hay que configurar los valores con los que se va a trabajar, y seguir los pasos de su funcionamiento de forma ordenada.

Los parámetros para la creación y tratamiento de plasma han sido:

- Presión de la cámara → 0.05 torr
- Potencia RF → 30 W
- Tiempo de deposición → 60 s
- Gas de oxígeno → 20 sccm
- Gas de argón → 5 sccm

sccm: standard cubic centimeters per minute.

Cuando se haya establecido todo de forma correcta y el vacío de la cámara principal, donde están los objetos a tratar, haya alcanzado el valor indicado, 0.05 torr, se puede habilitar la entrada de los gases. Tras esperar a que la presión en el interior se establezca se activa la potencia RF. El programa de LabVIEW que se muestra en la **Figura 3.15** tiene ventanas donde se puede comprobar en tiempo real como varía o se mantiene la presión dentro de la cámara.



Figura 3.15: Ventanas del LabView que se utilizan para la creación del plasma en le RIE.

Es sencillo ver a través de una pequeña ventana circular, como las de la **Figura 3.16**, colocada en la cámara principal, si se crea el plasma y si las superficies de ambos materiales están siendo tratadas.

Una vez terminado el tiempo de exposición hay que unir el vidrio y el PDMS lo antes posible porque las superficies oxidadas van perdiendo los radicales OH que se han generado volviendo al estado inicial. Lo ideal es acoplar las dos partes a la primera sin

intentar modificar la posición, de lo contrario el pegado no será exitoso. Para favorecer la adhesión se coloca el conjunto en una placa calefactora a 80°C durante 20 min mientras se presiona suavemente por toda la zona superior. De esta forma ya tenemos el canal microfluídico listo para ser utilizado.

Para este trabajo lo ideal es utilizar la pre-cámara que tiene el RIE ya que permite cargar y descargar las muestras más rápido que si se hace directamente con la cámara principal. En el caso de no poder utilizar la pre-cámara es necesario fijar las muestras a dos masas para que en el momento de deshacer el vacío no se muevan y se eche a perder el proceso.

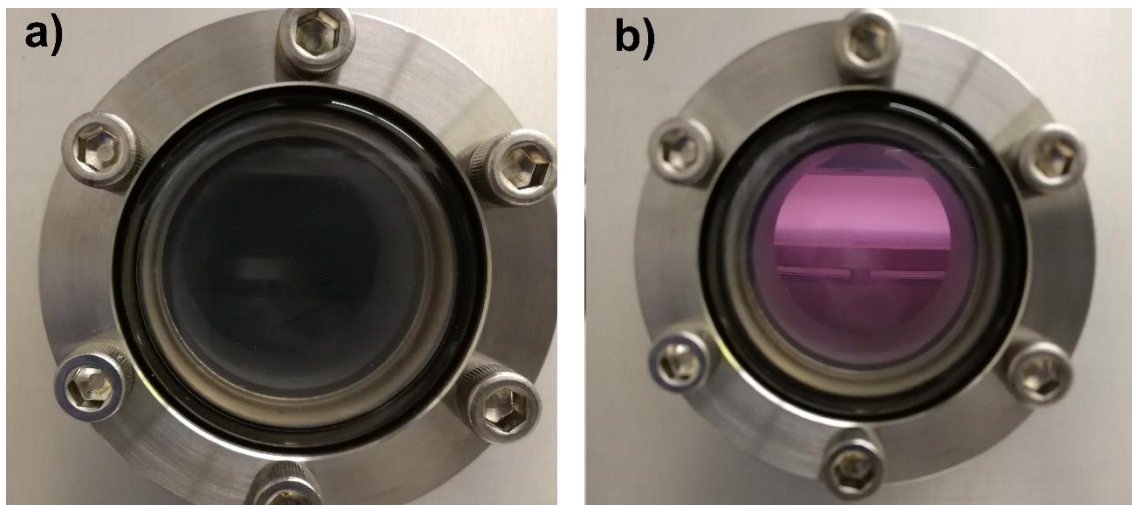


Figura 3.16: a) Vista del interior de la cámara sin plasma. b) Vista del interior de la cámara durante el tratamiento con plasma.

4 Resultados y discusión

Después de realizar los tres procesos que conforman el desarrollo experimental se pueden clasificar los resultados de cada uno de ellos hasta llegar al objetivo final, los canales microfluídicos y su estudio.

4.1 Moldes SU-8

El procedimiento llevado a cabo para la formación de los moldes es efectivo y cumple su cometido. Las estructuras obtenidas corresponden a los diseños utilizados en las máscaras y el espesor que luego pasará a ser la altura de los microcanales es el deseado, 100 μm . Para comprobar este dato se ha utilizado el perfilómetro KLA Tencor D-100. Las medidas realizadas en dos puntos a lo largo de la microestructura se muestran en las **Gráfica 4.1**.

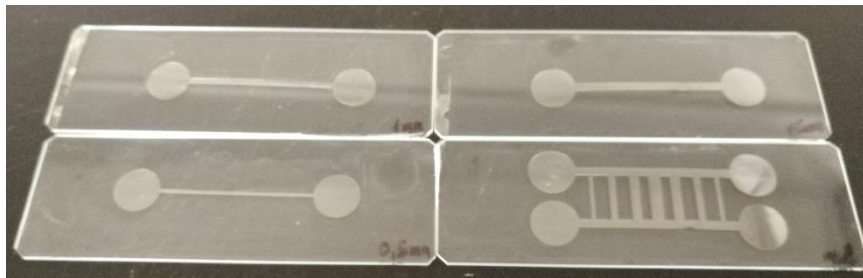
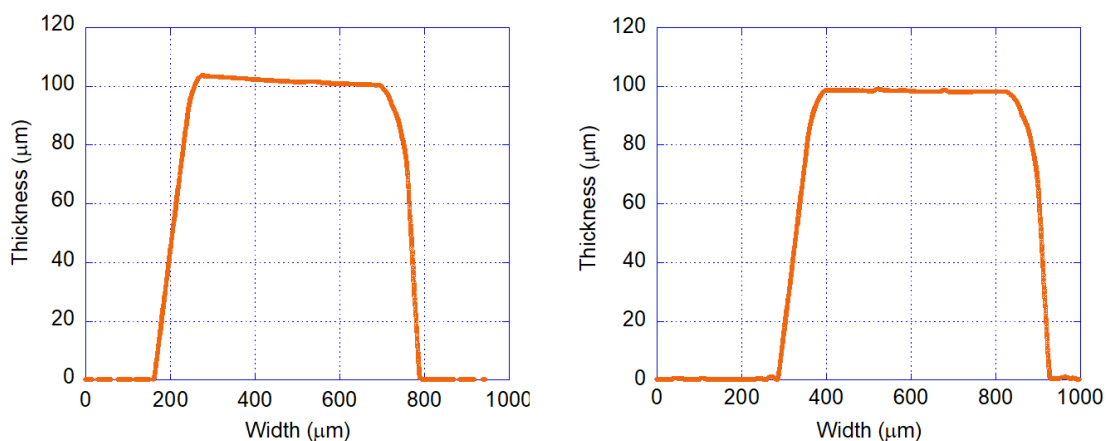


Figura 4.1: Moldes de SU-8 obtenidos.



Gráfica 4.1: Medidas realizadas con el perfilómetro en dos puntos diferentes del molde de SU-8 de la recta con 0,5 mm de ancho.

Como puede observarse en las gráficas adquiridas el espesor que tienen las estructuras es muy próximo al deseado, por tanto, se puede concluir que el procedimiento llevado a cabo ha resultado satisfactorio.



En la **Figura 4.1** se muestran cuatro de los moldes de SU-8 creados a partir de los patrones que contenían las máscaras.

4.2 Réplicas PDMS

Las réplicas de PDMS obtenidas tras el curado tienen un espesor de 1 a 2 mm, es complicado fijar un grosor constante con el método utilizado. Es necesario que cubran la estructura de SU-8 y sean lo más finas posibles para poder lograr buenas imágenes y videos de las bacterias con el microscopio. El aspecto del polímero es adecuado y cumple, entre otras, con la principal característica por la que ha sido elegido, la transparencia.

El principal problema surge al separar el polímero de la resina ya que esta última tiende a desprenderse del sustrato. Lo ideal sería que se mantuviera en el sustrato y que se pudiera reutilizar más veces por lo tanto hay que buscar la forma de corregir esta situación. La solución puede ser la combinación de dos medidas. Por un lado, limpiar el vidrio con un tratamiento de plasma y mejorar la unión del SU-8 a la base mediante un promotor de adherencia como el HDMS. Por otro lado, estudiar qué momento es el adecuado para retirar el PDMS del molde para que este último sufra lo menos posible, mientras está caliente nada más salir del horno o en algún instante posterior según se va enfriando.

4.3 Pegado de vidrio y PDMS

Es el punto más crítico e importante de todo el proceso. El tratamiento de plasma utilizado hace que las superficies de vidrio y PDMS se unan de tal forma que no se puedan separar a no ser que el conjunto se rompa. La mejor manera de adherirlas es nada más terminar la exposición de plasma antes de perder las propiedades adquiridas y acto seguido colocarlas en una placa calefactora.

A pesar de los problemas mecánicos sufridos con el RIE ha sido posible realizar diferentes pegados, algunos con éxito y otros no tanto (**Figura 4.2**), aunque de los que no se han unido correctamente se ha deducido cual debe ser la técnica para hacerlo de forma más eficaz. Tras varias pruebas fallidas colocando el vidrio sobre el PDMS se invirtió el orden poniendo el PDMS sobre el portaobjetos logrando mejores resultados.

Aunque el proceso ha funcionado con los parámetros utilizados y mencionados en el apartado 3.4 sería aconsejable poder estudiar cuales serían los valores realmente óptimos para efectuar una unión más eficaz.

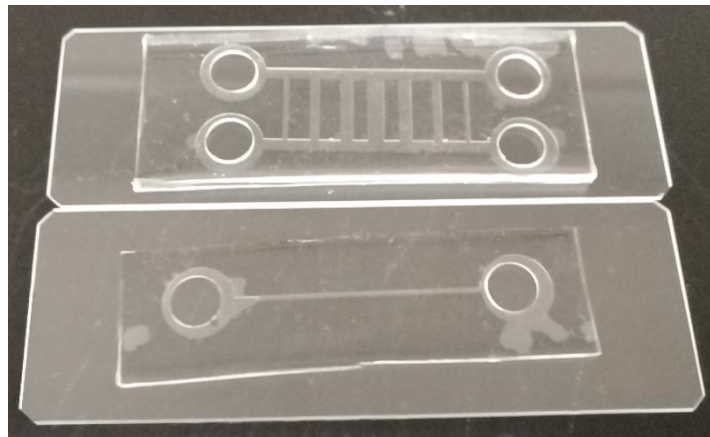


Figura 4.2: Pegados fallidos. Se observan zonas con aire, despegadas.

4.4 Evaluación circuitos microfluídicos

Con canales fabricados correctamente se han realizado pruebas para ver la calidad de la unión, observando si hay fugas haciendo uso de colorante como se muestra en la **Figura 4.3**. Por otra parte, también se han introducido bacterias magnetotácticas visualizándolas con el microscopio con resultados esperanzadores. Una vez introducidas las MTB se ha visto como nadaban por el canal y como se orientaban según se aplicaba campo magnético en una dirección.



Figura 4.3: Prueba para ver si había fugas. La forma del canal pertenece al diseño de máscaras prestadas por Cristian Mendes perteneciente al departamento de Química y al BCMaterials para hacer la prueba antes de diseñar las nuestras.

Por la dificultad de ver con claridad las bacterias en los microscopios a los que se tiene acceso, debido a su distancia de trabajo, es posible crear microcanales con portaobjetos de vidrio más finos (60×24 mm y espesor < 1 mm) que los convencionales (76×26 mm y espesor < 1 mm). Así, haciendo uso de estas laminas más finas es posible utilizar otro tipo de microscopios, los invertidos, y obtener mejores imágenes.

Sin embargo, también se han encontrado ciertos problemas a la hora de meter las bacterias debido al carácter hidrófobo del PDMS y aunque el vidrio es hidrófilo, al limpiar el circuito microfluídico con isopropanol hace que restos del polímero se queden en el portaobjetos convirtiéndolo hidrófobo. Para solucionar este inconveniente se presentan diferentes opciones:

- Realizar un tratamiento de plasma que limpie y active las superficies. Debería realizarse justo antes del estudio con las bacterias ya que el efecto desaparece con el paso del tiempo.
- Meter las bacterias mediante una pipeta para que se rellene el canal.
- Construir un sistema de flujo continuo que realimente el circuito.
- Sumergir los microcanales en agua desionizada hasta su uso [16].

Para ver cómo afecta el tratamiento de plasma a la superficie del PDMS se han hecho pruebas midiendo el ángulo de contacto con diferentes tiempos de exposición. Realmente estos ensayos no se han realizado mediante el tipo de plasma creado por el RIE, sino que el equipo que se ha utilizado ha sido el Ossila UV Ozone Cleaner, **Figura 4.4 (a)**. Este dispositivo utiliza una fuente de luz ultravioleta de alta potencia generando ozono. El tiempo que el PDMS tiene que estar tratándose con este sistema es mayor que con el plasma de oxígeno ya que es menos agresivo. Realizar estas pruebas no solo permite ver cómo cambian las condiciones de la superficie del polímero, sino que pueden ser de gran ayuda para determinar el tiempo óptimo que tienen que estar el vidrio y el PDMS expuestos al plasma. Un corto periodo puede que no sea suficiente para efectuar un buen pegado y, por el contrario, si es excesivo puede deteriorar los materiales utilizados.

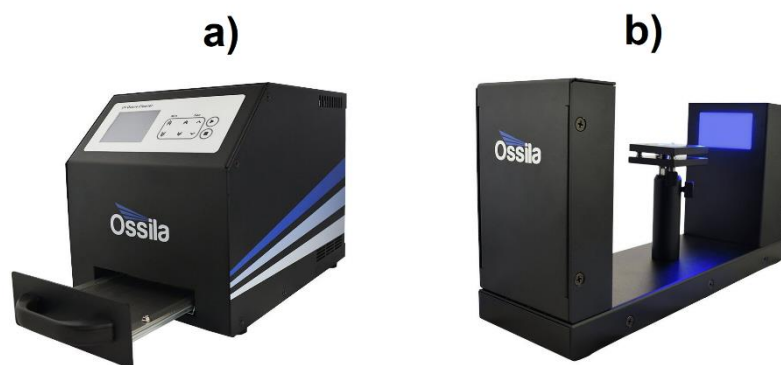


Figura 4.4: a) Ossila UV Ozone Cleaner. b) Ossila Contact Angle.

Los resultados obtenidos son una prueba de cómo varía el estado de la superficie del polímero, mostrar una posible forma con la que mejorar y optimizar el proceso de pegado en un futuro. Las imágenes que pueden verse en la **Figura 4.5 (a)** corresponden a ángulos de contacto formados por gotas de agua después de que el PDMS estuviera en exposición al ozono durante 10, 20 y 30 min respectivamente. Análogamente se consiguen los mostrados en la **Figura 4.5 (b)** pero con gotas pertenecientes al medio de cultivo de las bacterias que difiere ligeramente a las del agua. Como puede observarse

en ambos casos, a medida que el tiempo de tratamiento aumenta, la superficie se vuelve más hidrófila disminuyendo el ángulo de contacto. Al no ser los dos medios iguales también se aprecia diferencia entre ellos en los ángulos de contacto siendo mayores en todos los casos para el medio de cultivo.

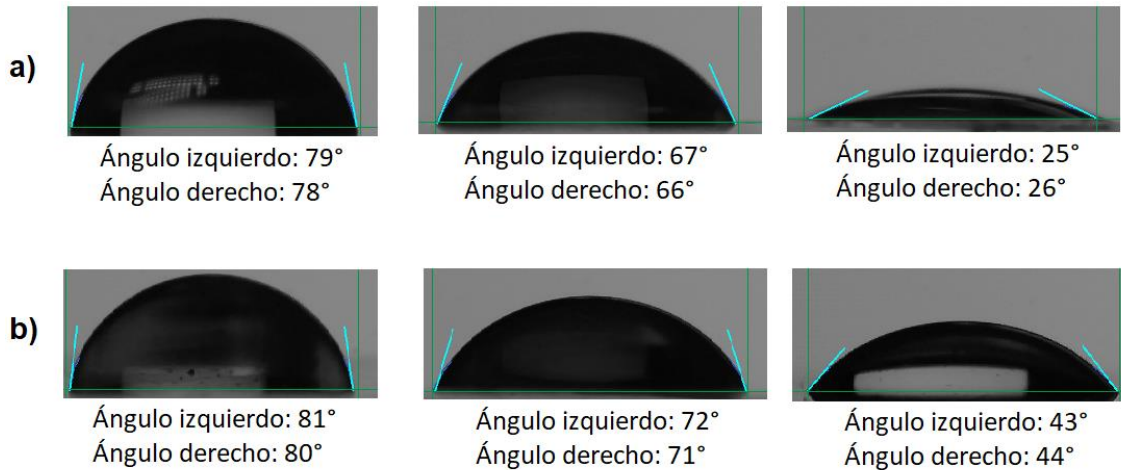


Figura 4.5: a) Ángulos de contacto de agua sobre PDMS con tratamientos de ozono de 10, 20 y 30 min respectivamente. b) Ángulos de contacto de medio de medio de cultivo sobre PDMS con tratamientos de ozono de 10, 20 y 30 min respectivamente.

4.5 Evaluación de las bacterias magnetotácticas en los canales

En la última fase del trabajo se examinan las bacterias magnetotácticas dentro de los canales microfluídicos. Esta etapa no se ha podido llevar a cabo con el mismo éxito que las demás. Las complicaciones surgidas durante el proceso de pegado y la poca nitidez obtenida en las imágenes con el microscopio impiden presentar resultados adecuados con los microcanales fabricados. A pesar de ello sí se han podido observar las MTB en otro tipo de canales previamente comprados. Estos canales, **Figura 4.6**, de la empresa IBIDI tienen unas dimensiones de: 100 μm de alto, 1 mm de ancho y 17 mm de largo [17]. Son medidas similares a las que se han utilizado durante este trabajo por lo que el resultado con ellos se puede asemejar al que se debería haber obtenido con los aquí fabricados.

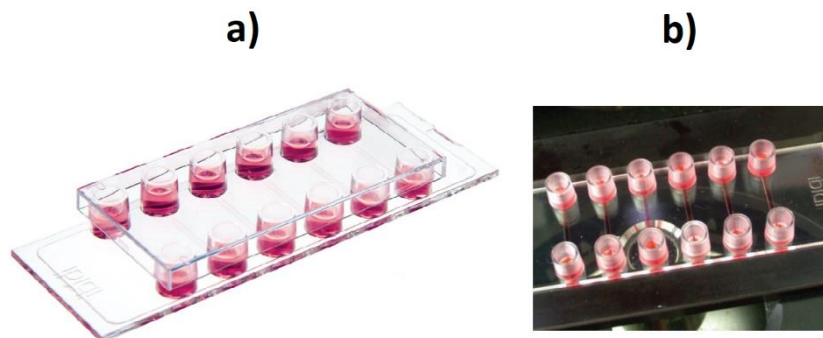


Figura 4.6: a) Seis canales microfluídicos en una base de IBIDI. b) Los canales microfluídicos con colorante [17].

En la **Figura 4.7 (a) y 4.7 (b)** se presenta la imagen capturada con el microscopio invertido haciendo uso de los microcanales antes mencionados. La primera es la imagen original y la segunda está tratada con el software ImageJ. Es un programa para el procesamiento científico de imágenes. En este caso puede ser una buena herramienta para el análisis del movimiento de las bacterias que sean grabadas con los microscopios, determinando la velocidad y dirección dependiendo de los campos magnéticos aplicados.

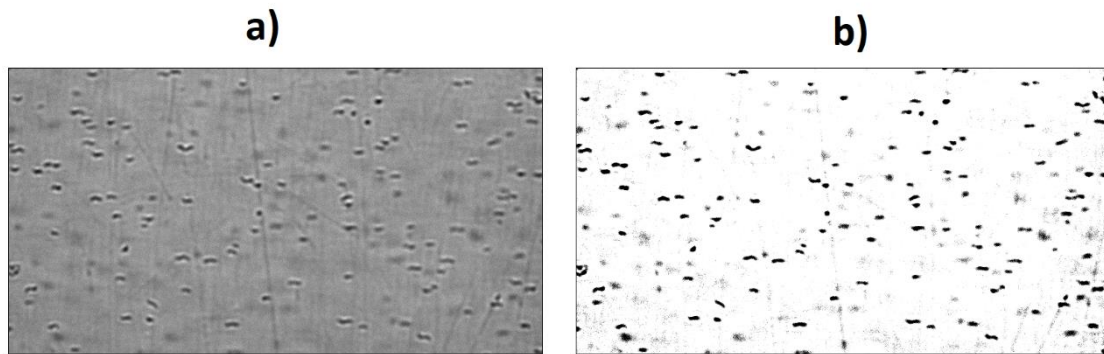


Figura 4.7: Imágenes de las bacterias en los microcanales de IBIDI cedidas por, David Gandia, estudiante de doctorado del departamento de Electricidad y Electrónica y del BCMaterials, y que forma parte de este proyecto. a) Imagen original captada con el microscopio invertido y ampliada. b) Imagen tratada con el software ImageJ.



5 Conclusiones

En este trabajo se desarrolla el proceso de cómo fabricar circuitos microfluídicos para el estudio del movimiento de bacterias magnetotácticas con la intención de utilizarlas en forma de bio-robots para combatir enfermedades como el cáncer.

Durante el transcurso de esta labor se han investigado cuales serían los mejores valores y técnicas para obtener los canales. También se han evaluado los canales creados y el movimiento de las bacterias, aunque en estos dos casos los resultados obtenidos no han sido del todo satisfactorios. Han surgidos problemas que se han tratado de solventar con los recursos disponibles para poder continuar.

Los parámetros más importantes de todo el desarrollo son los utilizados durante la etapa de procesado del SU-8 y del pegado del PDMS con el portaobjetos. Son dos situaciones críticas que requieren tiempo y dedicación y si no se realizan bien hay que repetir las desde el inicio.

En general se han cumplido los diferentes objetivos que se mencionaban al inicio del trabajo y a pesar de los inconvenientes se han podido fabricar los microcanales por completo, consiguiendo el objetivo principal del trabajo. A pesar de que la valoración y los resultados de los circuitos no han sido los esperados, se ha creado una vía para avanzar con la investigación.

Como futura línea de investigación se propone el perfeccionamiento de las técnicas y los parámetros utilizados en ellas, añadiéndole el aumento de la complejidad de los canales microfluídicos. También sería interesante disminuir la altura de los canales, para ello, se necesitaría utilizar otro tipo de resina como por ejemplo la SU-8 50 o la SU-8 10 que permiten construir estructuras con espesores menores a los 100 μm que se han utilizado en este trabajo.

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Bibliografía

- [1] S. R. Yazdi, R. Nosrati, C. A. Stevens, D. Vogel, P. L. Davies, y C. Escobedo, «Magnetotaxis Enables Magnetotactic Bacteria to Navigate in Flow», *Small*, vol. 14, n.º 5, p. 1702982.
- [2] S. Klumpp, B. Kiani, P. Vach, y D. Faivre, «Navigation with magnetic nanoparticles: magnetotactic bacteria and magnetic micro-robots», *Phys. Scr.*, vol. T165, p. 014044, oct. 2015.
- [3] L. Yan, S. Zhang, P. Chen, H. Liu, H. Yin, y H. Li, «Magnetotactic bacteria, magnetosomes and their application», *Microbiol. Res.*, vol. 167, n.º 9, pp. 507-519, oct. 2012.
- [4] I. S. M. Khalil, V. Magdanz, S. Sanchez, O. G. Schmidt, L. Abelmann, y S. Misra, «Magnetic Control of Potential Microrobotic Drug Delivery Systems: Nanoparticles, Magnetotactic Bacteria and Self-Propelled Microjets», *Conf. Proc. Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. Conf.*, vol. 2013, jul. 2013.
- [5] T. Kobayashi, «Cancer hyperthermia using magnetic nanoparticles», *Biotechnol. J.*, vol. 6, n.º 11, pp. 1342-1347.
- [6] M. L. Fdez-Gubieda *et al.*, «Magnetite Biomineralization in *Magnetospirillum gryphiswaldense* : Time-Resolved Magnetic and Structural Studies», *ACS Nano*, vol. 7, n.º 4, pp. 3297-3305, abr. 2013.
- [7] «SU-8 Negative Epoxy Series Resists - MicroChem». [En línea]. Disponible en: http://www.microchem.com/Prod-SU8_KMPR.htm. [Accedido: 03-jul-2018].
- [8] «SU-8 :: MicroChem». [En línea]. Disponible en: <http://www.microchem.com/Prod-SU8.htm>. [Accedido: 03-jul-2018].
- [9] T. E. Polímeros, «El Polidimetilsiloxano», *Todo En Polímeros*, 09-oct-2017.
- [10] A. Santiago-Alvarado y S. Vázquez-Montiel, «Propiedades físico-químicas de membranas PDMS empleadas en lentes líquidas», p. 6, 2009.
- [11] T. D. C. Company, «SYLGARD 184 Silicone Elastomer», n.º 11, p. 4, 2017.
- [12] <http://www.areaciencias.com>, «estado plasma». [En línea]. Disponible en: <http://www.areaciencias.com/fisica/plasma.html>. [Accedido: 05-jul-2018].
- [13] «La tecnología de plasma superficie | Tecnología de Plasma | Thierry Corp», 12-feb-2016. [En línea]. Disponible en: <https://www.thierry-corp.com/mx/plasma/aplicaciones/>. [Accedido: 05-jul-2018].
- [14] «Home page». [En línea]. Disponible en: <http://www.jd-photodata.co.uk/>. [Accedido: 16-jul-2018].
- [15] V. C. Pinto, P. J. Sousa, V. F. Cardoso, y G. Minas, «Optimized SU-8 Processing for Low-Cost Microstructures Fabrication without Cleanroom Facilities», *Micromachines*, vol. 5, n.º 3, pp. 738-755, sep. 2014.
- [16] S. H. Tan, N.-T. Nguyen, Y. C. Chua, y T. G. Kang, «Oxygen plasma treatment for reducing hydrophobicity of a sealed polydimethylsiloxane microchannel», *Biomicrofluidics*, vol. 4, n.º 3, sep. 2010.
- [17] «µ-Slide VI 0.1 | Channel Slide for Parallel Flow Assays | ibidi». [En línea]. Disponible en: <https://ibidi.com/channel-slides/56--slide-vi-01.html>. [Accedido: 18-jul-2018].

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología