

# Proyecto Final de Carrera:

# Desarrollo de una nueva técnica para la microfabricación de dispositivos microfluídicos basados en el fenómeno dielectroforético

<u>Tutor:</u> Dra. Mercedes Consuelo Morales Mail: mcmorales@itba.edu.ar

<u>Alumno:</u> Sr. Ignacio Pastore Benaim Legajo: 52110 Mail: ipastore@itba.edu.ar

Fecha de entrega: 21 de Agosto de 2017.

# Indice

1.	Res	umen	3
2.	Intr	oducción	3
3.	Die	lectroforesis	4
	3.1.	Modelos matemáticos	4
		3.1.1. Dielectroforesis convencional	4
		3.1.2. Modelos celulares	8
	3.2.	Análisis de diseños y fabricación de plataformas microfluídicas	
		para generación de DEP	9
		3.2.1. Electrodos metálicos 2D	10
		3.2.2. Electrodos metálicos 3D	11
		3.2.3. PCB	12
		3.2.4. Costos de microfabricación de electrodos metálicos	13
		3.2.5. Doped Silicon	14
		3.2.6. "Insulator-based DEP" (iDEP)	14
		3.2.7. "contactless DEP" $(cDEP)$	16
		3.2.8. Electrodos líquidos	17
		3.2.9. Tweezers optoelectrónicos (opDEP)	19
		3.2.10. Electrodos de carbono vítreo (carbonDEP)	20
		3.2.11. Inyección metálica y co-fabricación	21
		3.2.12. Doped PDMS	22
	3.3.	Aplicaciones biotecnológicas	23
		$3.3.1.$ "Trapping" $\ldots$	23
		3.3.2. "Focusing"	24
		3.3.3. Separación celular	24
	3.4.	Analisis de la preparación de la muestra celular	25
		3.4.1. Efectos del campo eléctrico	25
		3.4.2. Efectos del medio conductivo	26
4.	Téc	nica de microfabriación propuesta	28
	4.1.	Microfabricación de electrodos y canal microfluídico	28
	4.2.	Análisis de ventajas y desventajas	30
	4.3.	Diseño propuesto	32

5.	Mat	teriales y Métodos	<b>32</b>
	5.1.	Microfabricacion	32
		5.1.1. PDMS	32
		5.1.2. PCB	33
		5.1.3. Capa plástica y agujereado del dispositivo	36
		5.1.4. Ensamblaje y conexiones microfluídicas	37
	5.2.	Preparación de la muestra	41
	5.3.	Seteado del experimento	42
6.	Res	ultados y discusión	43
	6.1.	Optimizacion de la técnica de microfabricación	44
		6.1.1. Sellado del canal	44
		6.1.2. Análisis bajo microscopio	51
		6.1.3. Conexiones eléctricas	52
		6.1.4. Resolución	53
		6.1.5. Diseño final y dispositivo	54
	6.2.	Tratamiento de muestra	57
		6.2.1. Especies celulares	57
		$6.2.2. Tintas \ldots \ldots$	57
		6.2.3. Elección del medio para el experimento dielectroforético	62
	6.3.	Aplicación del campo eléctrico	63
		6.3.1. Mejoras a futuro	65
7.	Con	nclusión	66
8.	Ane	exo	67

# 1. Resumen

En los últimos años se han diseñado distintos dispositivos microfluídicos para el manejo celular. Los diseños que utilizan al fenómeno de dielectroforesis (DEP) emergen como los más prometedores debido a su versatilidad. Sin embargo, las técnicas existentes de microfabricación de dispositivos DEP requieren de un alto costo de inversión en infraestructura y materiales imposibilitando su producción a nivel comercial.

En este trabajo se propone una nueva técnica de microfabricación para dispositivos DEP. La misma se basa en la técnica de "toner-transfer" utilizada para construir circuitos impresos (PCB). Las plataformas microfluídicas basadas en PCB ("Lab-on-a-PCB") aprovechan tecnología ampliamente utilizada en la microelectrónica permitiendo el escalado en la producción. Además ofrecen una solución directa a uno de los desafíos más importantes que presenta la microfluídica: la integración entre circuitos electrónicos y redes microfluídicas.

Para aplicar la técnica de microfabricación se diseñó un dispositivo para separación celular. A lo largo del trabajo se realizó la optimización de la técnica iterando alrededor de este diseño hasta obtener un prototipo funcional. Como resultados se muestran los obstáculos y decisiones que se tomaron en este proceso.

Para evaluar el rendimiento de los dispositivos fabricados se realizó un experimento dielectroforético utilizando el último prototipo. Los resultados fueron analizados bajo microscopía óptica.

Finalmente se proponen mejoras que se podrían aplicar tanto a la técnica de microfabricación propuesta como a las condiciones del experimento dielectroforético.

# 2. Introducción

La microfluídica es la ciencia y tecnología que estudia y controla fluídos a baja escala ( $10^{-6}$  a  $10^{-18}$  litros) mediante la fabricación de canales cuyas dimensiones varían desde los 1 a 500 micrómetros. Esta actividad interdisciplinaria, que combina los campos de la ingeniería, física, química, bioquímica, nanotecnología y biotecnología, ha experimentado grandes avances en las últimas dos décadas [1].

Una de las aplicaciones más importantes de la microfluídica es el desa-

rrollo de sistemas "lab-on-a-chip" (LOC). Estos dispositivos han demostrado sus potenciales beneficios en diversas aplicaciones, incluyendo "point-ofcare" (POC), diagnóstico, genómica, proteómica, química analítica y monitoreo medioambiental. En comparación con los sistemas tradicionales, los dispositivos LOC presentan diferentes ventajas: control preciso del fluido en régimen laminar, minimización del volumen de la muestra y reactivos a utilizar, tiempos de procesamiento más cortos, menor potencia de operación, portabilidad y menor costo de fabricación [2].

Generalmente un dispositivo LOC incluye tres módulos funcionales: módulo de transportación y preparación de la muestra, módulo de separación y módulo de detección y análisis.

# 3. Dielectroforesis

# 3.1. Modelos matemáticos

En esta sección se desarrollarán los modelos matemáticos para el estudio de la dielectroforesis.

#### 3.1.1. Dielectroforesis convencional

Bajo la aplicación de un campo elétrico uniforme en un medio acuoso, una partícula cargada se comporta de manera diferente que una partícula neutra. En el primer caso, la partícula se rodea de una capa difusa de iones de carga opuesta generando el fenómeno de doble capa eléctrica y se mueve hacia el electrodo de carga opuesta debido a la fuerza de Coulomb (efecto electroforético). En el segundo caso, se redistribuyen las cargas eléctricas tanto en la partícula como en la interfase con el medio que la rodea, generando un dipolo. Como los momentos dipolares son de igual magnitud y de dirección opuesta, la partícula no experimenta movimiento.

Sin embargo, cuando una partícula neutra es posicionada bajo un campo eléctrico no uniforme, los momentos dipolares pueden ser diferentes, resultando en una fuerza neta conocida como fuerza dielectroforética. La dirección de la fuerza depende de las permitividades y conductividades de la partícula y del medio, haciendo que la partícula se mueva hacia o en contra del máximo del campo eléctrico (ver figura 1). Este fenómeno es llamado dielectroforesis [3, 4].



Figura 1: Principio dielectroforético. (a) Comportamiento de partícula cargada (izquierda) y neutra (derecha) en un campo eléctrico uniforme. (b) Comportamiento de partícula neutra bajo un campo eléctrico no uniforme. Imagen tomada de [5].

El momento dipolar de una partícula esférica está dado por [6]:

$$\vec{p} = 4\pi\epsilon_m r^3 f_{CM} \vec{E} \tag{1}$$

donde  $\epsilon_m$  es la permitividad absoluta del medio, r representa el radio de la partícula y  $f_{CM}$  es el factor de Clausius-Mossotti:

$$f_{CM} = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* - 2\epsilon_m^*} \quad , \qquad \epsilon^* = \epsilon - j\frac{\sigma}{\omega} \tag{2}$$

donde  $j = \sqrt{-1}$ ,  $\epsilon^*$  es la permitividad compleja,  $\epsilon$  es la permitividad absoluta,  $\sigma$  es la conductividad eléctrica y  $\omega$  es la frecuencia del campo eléctrico. Los subíndices  $p \ge m$  representan a la partícula y al medio respectivamente.

El promedio temporal de la fuerza dielectroforética actuando sobre una partícula esférica bajo un campo eléctrico no uniforme puede ser escrito como [6]:

$$\langle \vec{F_{DEP}} \rangle = \frac{1}{2} Re[(\vec{p} \cdot \nabla)\vec{E^*}]$$
(3)

donde  $\vec{E}^*$  es el conjugado del campo eléctrico. Reemplazando (1) en (3):

$$\langle \vec{F_{DEP}} \rangle = 2\pi\epsilon_m r^3 Re[f_{CM}] \nabla \vec{F_{rms}}^2$$
 (4)

donde  $\nabla \vec{E_{rms}}^2$  es el gradiente del cuadrado del campo eléctrico RMS. La parte real del factor de Clausius-Mossotti se puede reescribir como:

$$Re[f_{CM}] = \frac{(\sigma_p - \sigma_m)(\sigma_p + 2\sigma_m) + \omega^2(\epsilon_p - \epsilon_m)(\epsilon_p + 2\epsilon_m)}{(\sigma_p + 2\sigma_m)^2 + \omega^2(\epsilon_p + 2\epsilon_m)^2}$$
(5)

Este factor representa las propiedades dieléctricas del entorno y muestra que mediante el manejo de la frecuencia del campo eléctrico aplicado se puede manejar el efecto DEP. Si la partícula es más polarizable que el medio  $(Re[f_{CM}] > 0)$  la partícula es atraída hacia la región donde el campo eléctrico es mayor, fenómeno llamado dielectroforesis positiva (pDEP). En cambio, si el medio es más polarizable que la partícula  $(Re[f_{CM}] < 0)$  la partícula se aleja de la región con mayor campo eléctrico, fenómeno llamdo dielectroforesis negativa (nDEP, ver figura 2). El factor puede variar desde -0, 5 (i.e.  $\epsilon_p^* \ll \epsilon_m^*$ ) a 1 (i.e.  $\epsilon_p^* \gg \epsilon_m^*$ ).



Figura 2: Análisis de pDEP y nDEP bajo corriente alterna. Se observa que tanto en el hemiplano positivo como negativo, la partícula dieléctrica sufre una fuerza neta en la misma dirección. (a) Si la partícula es más polarizable que el medio, se acerca hacia el máximo del gradiente eléctrico. (b) Cuando la partícula es menos polarizable que el medio, se aleja del máximo del gradiente eléctrico.

Además como:

$$\left\{ \begin{array}{l} f_{CM} = \frac{\sigma_p - \sigma_m}{\sigma_p + 2\sigma_m} \quad , \quad \omega \to 0 \\ \\ f_{CM} = \frac{\epsilon_p - \epsilon_m}{\epsilon_p + 2\epsilon_m} \quad , \quad \omega \to \infty \end{array} \right\}$$

A bajas frecuencias la fuerza DEP depende de las propiedades conductivas mientras que a altas frecuencias gobiernan las permitividades.

Cuando las conductividades del entorno se fijan y se varía la frecuencia del campo aplicado, la partícula puede experimentar pDEP o nDEP. La frecuencia en donde  $Re[f_{CM}] = 0$  se llama frecuencia de "crossover". En este punto las permitividades complejas de la partícula y del medio se igualan y se anula la fuerza dielectroforética (analizar ecuación 2).

#### 3.1.2. Modelos celulares

Todas las ecuaciones anteriormente desarrolladas asumen homogeneidad de la partícula. Sin embargo, la mayoría de las biopartículas son heterogeneas con una membrana celular, citoplasma y núcleo. Cada una de estas capas tiene distintas propiedades eléctricas. Se han desarrollado modelos "singleshell", "double-shell" y "multiple-shell" (ver figura 3).



Figura 3: Esquema representando distintos modelos celulares. Cada fase tienen su propia permitividad ( $\epsilon$ ) y conductividad ( $\sigma$ ) eléctrica. En cada modelo se toman en cuenta los espesores (t) y radios (r) de las distintas capas.

El modelo "single-shell" viene dado por:

$$\epsilon_c^* = \epsilon_{mem}^* \frac{2(1-\gamma_1)\epsilon_{mem}^* + (1+2\gamma_1)\epsilon_{cit}^*}{(2+\gamma_1)\epsilon_{mem}^* + (1-\gamma_1)\epsilon_{cit}^*} \quad , \quad \gamma_1 = (1-\frac{t}{r})^3 \tag{6}$$

donde c, mem y cit denotan célula, membrana y citoplasma respectivamente. t es el espesor de la membrana celular y r el radio celular. El modelo "double-shell" viene dado por:

$$\epsilon_c^* = \epsilon_{mem}^* \frac{2(1-\gamma_1) + (1+2\gamma_1)E_1}{(2+\gamma_1) + (1-\gamma_1)E_1} \quad , \quad \gamma_1 = (1-\frac{t}{r})^3 \tag{7}$$

$$E_1 = \frac{\epsilon_{cit}^*}{\epsilon_{mem}^*} \frac{2(1-\gamma_2) + (1+2\gamma_2)E_2}{(2+\gamma_2) + (1-\gamma_2)E_2} \quad , \quad \gamma_2 = (\frac{r_n}{r-t})^3 \tag{8}$$

donde n denota núcleo

$$E_2 = \frac{\epsilon_{pn}^*}{\epsilon_{cit}^*} \frac{2(1-\gamma_3) + (1+2\gamma_3)E_3}{(2+\gamma_3) + (1-\gamma_3)E_3} \quad , \quad \gamma_3 = (1-\frac{t_{pn}}{r_n})^3 \quad , \quad E_3 = \frac{\epsilon_{np}^*}{\epsilon_{pn}^*}$$
(9)

donde pn, np representan pared nuclear y nucleoplasma respectivamente.Con esta lógica se pueden modelar células con más capas ("multiple-shell") [7], como por ejemplo las células vegetales.

Por último, no todas las células se pueden modelar como esféricas. Muchas, como por ejemplo los *Lactobacillus*, tienen forma elipsoidal. Yang *et al* ha desarrollado el modelado de la fuerza DEP para estos casos [8].

# 3.2. Análisis de diseños y fabricación de plataformas microfluídicas para generación de DEP

En esta sección se analizarán las diferentes técnicas de microfabricación de electrodos en base al costo de la infraestructura necesaria, tiempos y complejidad de fabricación, costo del material, resolución entre electrodos y la fabricación potencial de estructuras 3D. Todas las técnicas detalladas requieren de una sala limpia (una sala limpia nivel ISO 6 es suficiente para la fabricación de dispositivos DEP) [9].

Para garantizar un alto impacto en la utilización de estos dispositivos es necesario que las técnicas tengan bajos costos asociados, sobretodo para los dispositivos descartables. En industrias como la alimenticia o el monitoreo ambiental, los dispositivos pueden ser reutilizables mientras que en campos como la biomedicina, los instrumentos suelen ser descartables por cuestiones de contaminación.

Además del bajo costo, el dispositivo debe ser robusto, amigable para el usuario y tener una alta reproducibilidad en sus resultados. Otra limitación para la elección de la técnica de microfabricación de electrodos es la elección de la tensión de entrada aplicada necesaria para generar el efecto DEP. Salvo los electrodos metálicos, todas las otras ténicas utilizan tensiones por encima de los 10  $V_{pp}$ . Esto se debe a que en muchos de los diseños, sus electrodos se encuentra muy alejados entre si, o sus materiales no son conductores ideales o estan recubiertos por una capa aisladora. En estos casos se remarca la necesidad de utilizar un amplificador (de corriente directa o de radio frecuencia) ya que la mayoría de los generadores de onda entregan hasta 20  $V_{pp}$ .

En el anexo se encuentra una tabla con la información resumida.

#### 3.2.1. Electrodos metálicos 2D

Para la fabricación de electrodos planares metálicos se requiere esencialmente de tres pasos: deposición metálica, generación de un patrón con un polimero fotosensible y la remoción de las partes que no conforman el patron deseado. Existen dos alternativas : "lift-off" o "wet/dry etching". Para las dos alternativas se pueden depositar una variedad de metales mediante electron beam evaporation y sputtering.

En el caso de "lift-off", el patrón polimérico es depositado por debajo de la capa metálica (generalmente sobre vidrio o silicona) mediante fotolitografía estandard. El metal es vaporizado sobre el patrón para luego sumergirlo en una solución química capaz de disolver el polimero fotosensible. La remoción del polímero también remueve la capa metálica superior ("lift-off") dejando sobre el sustrato el patrón metálico deseado.

En el caso del "wet/dry etching", primero se deposita el metal sobre la totalidad de la superficie y, mediante la utilización de una máscara se imprime el patrón polimérico. Luego los claros metálicos son removidos por técnicas de "wet/dry etching" y finalmente se disuelve el polímero fotosensible con otra solución química para revelar el patrón metálico [9].

Alternativamente a estas dos técnicas, se puede depositar patrones metálicos con laser ablation o ion-milling mediante la utilización de una máscara o stencil. Así los costos asociados a la técnica disminuyen aunque el equipamiento es caro y requiere un mantenimiento constante y un entrenamiento técnico apropiado.

Una de las desventajas de la utilización de electrodos 2D es que el desempeño (procesamiento de células por unidad de tiempo) alcanzado no es suficiente para aplicaciones a nivel industrial o clínico. Una de las principales causas es que la polarización del electrodo se genera solamente en la superficie del mismo y como son generalmente depositados en la base del canal, partículas alejadas aproximadamente 30  $\mu m$  de la base no experimentaran el efecto DEP. Además, una de las estrategias más utilizadas en microfluídica para aumentar el desempeño es aumentar las sección del canal (aumentando el ancho o alto del canal). Generalmente es preferible aumentar el alto del canal para mantener un layout pequeño del diseño. La implementación de esta estrategia no es posible ya que los electrodos planares no tienen un buen desempeño en canales altos. Como solución a este problema Fiedler *et al.* han introducido electrodos planares en la base y en el techo del canal que luego deben ser alineados entre si [10].

### 3.2.2. Electrodos metálicos 3D

Voldman *et al.* utilizaron la técnica de galvanizado para fabricar electrodos de oro extrusados [11]. La galvanización es una técnica en donde iones metálicos son movidos a través de una solución por la aplicación de un campo eléctrico para ser depositados en otra capa metálica.

El proceso suele empezar mediante la impresión de una capa fina mediante fotolitofrafía como en los electrodos planares. Por encima de esta se deposita el modelo de los electrodos en donde será depositado el metal. Este modelo suele imprimirse por fotolitografía de capa gruesa y el material suele ser un polímero. Por último el metal será electrodepositado sobre el modelo. Con esta técnica Voldman *et al.* lograron microfabricar electrodos de oro de 60  $\mu m$  de alto (ver figura 4).



Figura 4: Imagen de microscopio electrónico que muestra cuatro electrodos de oro junto con sus interconexiones. La barra de escala representa 20  $\mu m$ . Imagen tomada de [11].

La principal desventaja de la utilización de electrodos metálicos, tanto 2D como 3D, es que estos pueden interactuar con la muestra pudiendo generar electrolisis de la muestra, generación de burbujas y arcos eléctricos entre electrodos [12].

#### 3.2.3. PCB

En búsqueda de la reutilización de los electrodos 3D Park *et al.* y Millet *et al.* han utilizado circuitos impresos (PCB) a modo de electrodos DEP [13, 14].

El canal microfluídico es posicionado sobre un cubreobjeto de 100  $\mu m$  de espesor que funciona como aislante entre el canal y los electrodos (ver figura 5). En este caso los electrodos son baratos y reutilizables, además se elimina la posible reacción electroquímica de los electrodos ya que estos no se encuentran embebidos en el microcanal en contacto con la muestra. Sin embargo, es necesario la aplicación de altas tensiones (76 – 80  $V_{pp}$ ) debido al decaimiento del campo a través del cubreobjeto.



Figura 5: (a) Enfoque tradicional para la implementación de DEP mediante un PCB. (b) Enforque propuesto por *Park et al.* Imagen tomada de [13].

Esta rama de la microfluídica es llamada "Lab-on-a-PCB" y se presenta como una estrategia de microfabricación que podría llevarse al plano comercial debido a sus bajos costos de fabricación [15].

#### 3.2.4. Costos de microfabricación de electrodos metálicos

El costo de un evaporador de metales o "sputter" rondan los 100.000 dólares mientras que los "E-beam writers" y los "ion-based millers" sobrepasan los 100.000 dólares. El equipo estandard para fotolitografía ("spin coater", "hotplates" y "chemical benches") puede costar alrededor de 2.000 dólares en conjunto. A este precio se le debe sumar el "mask ligner" que eleva la suma un par de cientos de miles de dólares.

En cuanto a los materiales, tanto el oro como el platino son caros. Esta variable no suele afectar para la microfabricación de electrodos 2D donde el espesor de los mismos rondan los 100 nm pero empieza a tomar importancia en la microfabricación de electrodos 3D cuyas alturas pueden estar en el orden de los micrómetros.

Además, en esta técnica se le tiene que sumar el costo de resinas fotosensitivas utilizadas para la generación del patrón y los químicos para el etching. Las resinas pueden ser positivas, relativamente baratas, o negativas (como la SU-8) que son un poco más caras [9].

En el caso de los PCB, el costo de los electrodos disminuye considerablemente pero se debe introducir un amplificador ya que el cubreobjeto disminuye el campo aplicado.

## 3.2.5. Doped Silicon

Como alternativa a los electrodos metálicos, Iliescu *et al.* fabriaron un dispositivo en donde los electrodos 3D conformaban también las paredes del canal microfluídico [16]. El dispositivo tiene tres partes: una gruesa capa de silicona dopada entre dos capas de vidrios unidas mediante unión anódica ("anodic bonding"). Los puertos de entrada y de salida son agujereados en una de las capas de vidrio (ver figura 6).



Figura 6: (a) Esquema de dispositivo doped silicon-based DEP. Imagen tomada de [16].

El proceso de fabricación es complejo y requiere de infraestructura cara. El proceso incluye técnicas de agujereado de vidrio, anodic bonding, deep reactive ion etching (DRIE), afinamiento del vidiro y fabricación de conexiones de plomo.

## 3.2.6. "Insulator-based DEP" (iDEP)

Esta técnica consiste en la distorsión de un campo uniforme mediante la inclusión de estructuras aislantes en el canal y el uso de macroelectrodos.

La principal ventaja es que se elimina la fabricación de microelectrodos y, por ende, disminuye considerablemente el costo asociado. Sin embargo es necesario la aplicación de alta tensión (100 V - 1000 V) debido a la separación entre electrodos. Existen diferentes enfoques para generar la distorsión del campo: inclusión de estructuras fabricadas en vidrio, polímeros o matrices porosas [9] (ver figuras 7 y 8).



Figura 7: Diferentes estrategias para distorsionar la uniformidad del campo eléctrico. Las zonas donde las partículas experimentan el máximo DEP están marcadas en rojo. Imagen tomada de [17].



Figura 8: Partículas dieléctricas empacadas entre electrodos formando una matriz porosa. Las células son atrapadas en las regiones con mayor gradiente eléctrico, en este caso particular, entre las partículas dieléctricas. Imagen tomada de [9].

### 3.2.7. "contactless DEP" (cDEP)

Esta es una reciente variante a la técnica iDEP. Mientras que iDEP los electrodos se encuentran en contacto con la muestra, en cDEP, los electrodos se encuentran por fuera del canal (ver figura 9). Además, no se utiliza electrodos en estado sólido sino un fluído conductivo. La idea es facilitar la fabricación del chip ya que se microfabrican los canales y luego se introducen los líquidos conductores a un canal separado a modo de electrodos. Un dispositivo típico contiene tres canales: el canal principal por donde viajará la muestra y dos canales adyacentes que albergan al líquido conductor[18]. Macroelectrodos, por lo general cables, son sumergidos en el líquido conductor para la aplicación de la tensión (alrededor de 100 V). La no uniformidad del campo está dada por las paredes que separan al canal principal con los canales adyacentes pero también pueden incluir estructuras aislantes como en iDEP.



Figura 9: Esquema 3D del diseño del dispositivo cDEP planteado por Shafiee *et al.* Imagen tomada de [19].

La fabricación del dispositivo se basa en la fabricación de un molde de silicio en donde se deposita una polímero (PDMS). Los canales fabricados en PDMS luego son pegados a un vidrio mediante la oxidación de ambas superficies con plasma de oxígeno.

Una de las principales ventajas de este método es que, una vez fabricado el molde de silicio, el costo y la complejidad de fabricación del dispositivo es bajo. Esto resulta conveniente para la etapa de producción pero puede generar problemas en etapas de diseño y optimización dado que un ligero cambio en el diseño significa la fabricación de otro molde.

#### 3.2.8. Electrodos líquidos

Está técnica utiliza la impresión de un patrón metálico y fotolitografía polimérica para crear electrodos virtuales en la pared del canal microfluídico [20]. Electrodos planares metálicos son incluidos en un extremo de los canales perpendiculares al canal principal. La inyección de corriente genera líneas de campo eléctrico que viajan entre electrodos sucesivos pasando por el canal principal. Así, la interfaz entre los canales perpendiculares y el canal principal funcionan como "electródos líquidos" verticales (ver figura 10).



Figura 10: Esquema 3D del dispositivo contenedor de "electródos líquidos" planteado por Demierre *et al.* Las flechas negras representan las líneas de campo eléctrico generadas por los electrodos adyacentes. Mediante la aplicación de dos diferentes campos eléctricos a las filas opuestas de electrodos en posiciones opuestas se puede manejar la posición lateral de las partículas. Imagen tomada de [21].

Mediante fotolitografía se imprimen los electrodos en vidrio y luego se generan los canales perpendiculares y principal con SU-8 a través de fotolitografía. Por último el vidrio se sella con una capa de PDMS que alberga los puertos de entrada y de salida de líquido.

Todavía no se ha demostrado un alto desempeño debido a la restringida sección del canal que se puede utilizar. El aumento de la altura del canal no es posible debido a la utilización de electrodos 2D metálicos y el aumento del ancho es perjudicial para el gradiente del campo ya que este se genera en la pared del mismo. Una de las principales ventajas es que se disminuye la resolución necesaria tanto para la fotolitografía metálica como polimérica. Sin embargo, en términos financieros, esto no incluye una gran ventaja ya que es necesaria la misma maquinaria que para los electrodos 2D metálicos.

## 3.2.9. Tweezers optoelectrónicos (opDEP)

Esta técnica utiliza luz para excitar una capa fotoconductora creando un gradiente de campo eléctrico que atraviesa a la muestra. La muestra se encuentra entre una capa conductora y otra fotoconductora que, a su vez, se encuentra por encima de otra capa conductora. Una corriente alterna se inyecta a través de las dos capas conductoras y mediante la proyección de imágenes en la capa fotoconductora se genera un campo no uniforme (ver figura 11).



Figura 11: Esquema 3D del dispositivo planteado por Chiou *et al.* Una capa fotoconductiva compuesta por silice amorfa se deposita sobre un electrodo transparente. Un segundo electrodo transparente es posicionado por encima. Mediante la inyección de corriente alterna entre los dos electrodos se genera un campo eléctrico uniforme. La no uniformidad del campo se logra cuando se proyecta una imagen (anillos concéntricos) hacia la capa fotoconductiva. Imagen tomada de [22].

Como fuentes de luz se pueden utilizar LEDs o lasers con longitudes de

onda en el rango de los 600 nm. El patrón lumínico se puede generar a través de procesador digital de luz o una pantalla de cristal líquido [23]. Además un objetivo de microscopio 10x es añadido entre la fuente de luz y la capa fotoconductora posibilitando una resolución de hasta 1,52  $\mu m$ .

El proceso de fabricación de estos dispositivos es simple ya que solo se necesita del depositado de capas conductivas o fotoconductivas, eliminando procesos complejos como la fotolitografía o el etching químico. En este caso, el costo más significativo es el sistema óptico y la fuente de luz.

#### 3.2.10. Electrodos de carbono vítreo (carbonDEP)

En la literatura consultada se han encontrado diseños que utilizan electrodos 3D de carbono para la generación de un campo eléctrico no uniforme [24, 25, 26]. Principalmente este material presenta tres ventajas: excelente biocompatibilidad, es inerte en la mayoría de los solventes y tiene excelentes propiedades mecánicas. Como desventaja frente a materiales como el oro o el platino, el carbón vítreo presenta una menor conductividad eléctrica. Sin embargo se ha demostrado que se puede generar un campo DEP mediante la aplicación de tensiones en el rango de los 20 V.

En esta técnica, los electrodos son fabricados por pirolización de un patrón polimérico previo. La pirolización comprende el calentamiento de la estructura hasta 2000 °C en una atmósfera inerte como nitrógeno o vacío. En un proceso típico el patrón polimérico es impreso en dos pasos mediante la utilización de SU-8. Primero se imprime el diseño planar de los electrodos sobre un sustrato de sílice fundida y luego se imprimen las estructuras volumétricas. Por último se piroliza la muestra y se deja enfriar a temperatura ambiente.

Los canales microfluídicos son generados en un proceso aparte y luego son alineados al arreglo de electrodos. Para la creación de estos se corta una lamina bifaz adhesiva ("double-sided adhesive") mediante un "cutter plotter" y se posiciona por encima de esta una placa de policarbonato que alberga los puertos de salida y entrada del canal. Luego de la alineación entre el canal y los electrodos, el canal es sellado mediante una laminadora en frío (ver figura 12).



Figura 12: Esquema del proceso de microfabricación de electrodos 3D en carbón vítreo. Imagen tomada de [25].

Esta técnica es relativamente simple y barata ya que solo necesita de fotolitografía polimérica y tratamiento térmico. Un horno pirolítico puede costar unas décimas de miles de dólares. Además, el costo de los materiales también se ve reducido ya que el carbono es significativamente más barato que metales como oro o platino. El mayor costo de esta técnica viene dado por el substrato.

#### 3.2.11. Inyección metálica y co-fabricación

La Co-fabricación es una estrategia utilizada para crear múltiples estructuras en un solo paso mediante la inyección de material en distintas cavidades. Este método ya se mencionó en la sección de carbonDEP (3.2.7) donde las cavidades son llenadas por un líquido conductor, en este caso se utilizan distintas aleaciones metálicas. Generalmente se utiliza una mezcla de Ga 75 %, In 25 % por peso debido a su baja viscosidad a temperatura ambiente. Sin embargo, también se ha demostrado que el galio (punto de fusión: 30 °C) y una aleción compuesta por In 51 % Bi 32, 5 % and Sn 16, 5 % por peso (punto de fusión: 60 °C) son materiales que se pueden utilizar en esta técnica. El flujo de los metales fundidos una vez inyectados en las cavidades pueden ser controlados por la microfabricación de estructuras en PDMS. Por ejemplo, So *et al.* utilizaron un arreglo de microcolumnas para evitar el traspaso del metal hacia el canal principal [27] (ver figura 13).



Figura 13: Resumen del proceso de co-fabricación con inyección metálica (no se ilustra la capa de PDMS superior que sella el canal). Imagen tomada de [27].

Las ventajas de este proceso son similares a las de cDEP con el agregado de que no se necesitan de pequeñas membranas de PDMS que separen los canales de los electrodos. La desventaja viene dada por el contacto de la muestra con los electrodos metálicos.

## 3.2.12. Doped PDMS

El PDMS ha sido ampliamente usado para la generación de canales microfluídicos. En este caso, este material es combinado con metales para generar electrodos basados en PDMS. Niu *et al.* lograron crear electrodos 3D de PDMS-carbono y PDMS-plata [28].

El proceso de fabricación inicia con la impresión del patrón de los canales microfluídicos mediante una resina negativa (SU-8). Dentro de este patrón se imprime un patrón en una fotoresina positiva (PR 4620) que albergará a los electrodos en base a PDMS. Las cavidades son llenadas con el PDMS dopado con metal y el exceso es limpiado con una cuchilla. Luego del curado de los electrodos se disuelve la fotoresina PR 4620 y se vuelve a volcar PDMS pero sin las partículas metálicas. El PDMS y el PDMS dopado se desmolda del sustrato y por último se une otra capa de PDMS mediante la aplicación de calor.



Figura 14: Resumen del proceso de electrodos de PDMS-plata. Imagen tomada de [28].

El costo de las partículas metálicas debe ser añadido al costo de fabricación basado en el "casting" del PDMS en moldes fabricados por fotolitografía. Una potencial desventaja de estos electrodos es la no uniformidad de sus paredes, posibilitando la concentración del campo eléctrico.

# 3.3. Aplicaciones biotecnológicas

En esta sección se detallarán algunas de las posibles aplicaciones para los dispositivos DEP.

# 3.3.1. "Trapping"

El atrapamiento de biopartículas es importante para la preparación de la muestra en los dispositivos LOC. El atrapamiento se puede lograr con distintas configuraciones de electrodos:

- Electrodos 2D: Khoshmanesh et al. han desarrollado un dispositivo capaz de atrapar levadura saccharomyces cerevisiae y lactobacillus mediante pDEP a partir de electrodos curvos en la base del canal [29]. Pethig et al. lograron atrapar levadura en distintas zonas del dispositivo mediante pDEP y nDEP con "interdigitated castellated microelectrodes" en la base del canal [30].
- iDEP: Moncada-Hernández *et al.* demostraron el atrapamiento de levadura *saccharomyces cerevisiae* y escherichia coli mediante nDEP entre microcolumnas de PDMS [31].

#### 3.3.2. "Focusing"

El direccionamiento controlado de biopartículas es una estrategia ampliamente utilizada en microfluídica y es fundamental para el módulo de transportación en dispositivos LOC. En base al fenómeno DEP existen diferentes diseños capaces de realizar "focusing":

- Electrodos 2D en base y techo del canal: Müller *et al.* han desarrollado un dispositivo capaz de direccionar hacia el centro del canal partículas de latex y células Jurkat, entre otras fucniones [32].
- iDEP: Zhu *et al.* han direccionado partículas de poliestireno generando un campo eléctrico no uniforme a partir de la constricción del canal de PDMS [33].
- Electrodo líquido: Demierre *et al.* han direccionado partículas de poliestireno y células de levadura en diferentes posiciones laterales del canal mediante el equilibrio de dos fuerzas DEP opuestas [21].

#### 3.3.3. Separación celular

Los dispositivos LOC utilizan esta estrategia para purificar el analito de otros espécimenes biológicos, así como también para concentrar la muestra para obtener una medición más precisa [34]. La separación celular mediante DEP se puede lograr con dos enfoques: separación temporal o espacial.

En la separación temporal una partícula es atrapada por pDEP mientras que la otra se encuentra en suspensión mediante nDEP. Li *et al.* demostraron la separación temporal de células *Listeria* vivas y muertas utilazndo electrodos 2D metálicos en la base del canal [35]. En la separación espacial, diferentes tipos de partículas pueden ser dirigidas a diferentes salidas al mismo tiempo, reduciendo el tiempo de contacto entre la muestra y los electrodos. Lin *et al.* han separado espacialmente eritrocitos y partículas de poliestieron mediante la utilización de nDEP y pDEP respectivamente [36].

# 3.4. Analisis de la preparación de la muestra celular

En esta sección se analizarán los distintos efectos causantes de stress celular en los experimentos dielectroforéticos.

#### 3.4.1. Efectos del campo eléctrico

A pesar de que el fenómeno DEP se ha utilizado ampliamente para la manipulación de biopartículas es necesario remarcar que puede tener un impacto negativo en la viabilidad celular (factor de células vivas sobre células totales por mililitro). Su impacto negativo depende básicamente de dos factores: la tensión aplicada y el calentamiento por efecto Joule .

Generalmente las células viven en un medioambiente libre de una interferencia significante con ondas electromagnéticas. La manipulación de ellas mediante la aplicación de un campo eléctrico afectará mecanismos naturales como la despolarización a través de la diferencia potencial transmembrana. Voldman *et al.* describieron la interacción entre un campo eléctrico externo y la diferencia potencial transmembrana. La tensión impuesta, por encima de la tensión transmembrana viene dado por [37]:

$$|V_{impuesta}| = \frac{1,5|\vec{E}|r}{\sqrt{1+(\omega\tau)^2}} \tag{10}$$

donde  $\tau$  es un tiempo característico determinado por propiedades dieléctricas del medio y de la célula. Fijando estas propiedades se puede vislumbrar que mediante la aplicación de una corriente directa (o corriente alterna a bajas frecuencias) se puede causar un stress celular fatal. Por ejemplo, la aplicación de un campo de corriente directa de 100 V/cm, parámetro normal en la manipulación celular, a una célula de 10  $\mu m$  de diámetro generará una tensión impuesta de 75 mV equivalente a la tensión transmembrana. De este ejemplo se deduce que se prefiere utilizar una corriente alterna frente a una directa para el manejo de biopartículas. Por otro lado, la variación de temperatura entre electrodos (análogo a un capacitor) puede ser aproximado como [38]:

$$\Delta T \approx \frac{\sigma \ V_{RMS}^2}{k} \tag{11}$$

donde k es la conductividad térmica y  $\sigma$  es la conductividad eléctrica. El efecto Joule se puede despreciar a bajas conductividades [39]. Sin embargo, para aplicaciones biológicas se suelen utilizar buffers de alta conductividad (entre 0, 1 y 1 S/m) y el riesgo de llegar a temperaturas mortales a nivel celular es alto. Para solucionar este inconveniente, Tay *et al.* han demostrado que es preferible utilizar electrodos 3D frente a electrodos planares debido al aumento de la distribución espacial del campo eléctrico [38].

#### 3.4.2. Efectos del medio conductivo

Más allá de que cada especie celular necesita de distintas condiciones medioambientales para sobrevivir y multiplicarse, los medios fisiológicos suelen tener algunos factores en común:

- PH: el PH fisiológico se encuentra alrededor de 7.
- Tonicidad: los medios biológicos tienden a ser isotónicos para preservar las membranas celulares.
- Conductividad: suele ser alta debido a la gran cantidad de iones presentes.
- Nutrientes: los medios celulares contienen aminoácidos, vitaminas y factores de crecimiento para estimular su metabolismo.

Por otro lado, como se ha descripto en la sección "Dielectroforesis convencional" (3.1.1), la elección del medio conductivo es fundamental para observar el fenómeno DEP deseado. La conductividad del medio determinará la frecuencia de crossover  $(f_c)$ . Para una célula con su membrana plasmática intacta,  $f_c$  se puede aproximar como [40]:

$$f_c = \frac{\sigma_m}{\sqrt{2}\pi r C_{mem}} \quad , \quad C_{mem} = \frac{\epsilon_{mem}\epsilon_0}{t_{mem}} \tag{12}$$

donde  $\epsilon_o$  es la permitividad del vacío. Asumiendo que la permitividad compleja de la célula no cambia significativamente con la conductividad del

medio [41], mediante la ecuación (12) se puede concluir que  $f_c \propto \sigma_m$ . En la figura 15 se puede ver que altas conductividades se puede experimentar nDEP, a bajas conductividades pDEP, mientras que a conductividades intermedias se puede experimentar tanto nDEP como pDEP.



Figura 15: Parte real de  $f_{CM}$  para células Jurkat en función de la frecuencia y a distintas conductividades del medio. Las unidades de conductividades son (S/m). Gráfico tomado de [41].

La elección de conductividades que permiten observar los fenómenos de pDEP y nDEP son excesivamente bajas en comparación a las conductividades fisiológicas (la conductividad de la sangre se encuentra en el rango de 1-2 S/m). Esto puede causar deformaciones morfológicas de la célula debido al intercambio de líquido entre el medio y la célula para equilibrar la concentración iónica [41].

Por otro lado, para evitar ruido en los experimentos dielectroforéticos, los medios no incluyen nutrientes para el crecimiento celular. Es por esto que una larga exposición de las células en estos medios provocan una abrupta caída en la viabilidad celular. Otro factor de stress celular viene dado por tintas y fluoróforos que pueden teñir el medio o a la célula. Estas tintas son utilizadas en algunos experimentos dielectroforéticos para el análsis óptico bajo microscopio.

Por último, como el PH y la tonicidad del medio no interfieren con el fenómeno DEP, los medios elegidos tienden a imitar los valores fisiológicos para generar las mejores condiciones medioambientales.

# 4. Técnica de microfabriación propuesta

En esta sección se desarrollará una nueva técnica de microfabricación de dipositivos DEP. Se analizarán ventajas, desventajas, costos asociados y posibles aplicaciones biotecnológicas.

# 4.1. Microfabricación de electrodos y canal microfluídico

Esta técnica está inmersa en la rama de "Lab-on-a-PCB" y se basa en una técnica popularmente utilizada para la creación de circuitos impresos a nivel académico, "toner-transfer". Esta se asemeja al método "wet etching" desarrollado en la sección "Electrodos metálicos 2D" (3.2.1) con la salvedad de que el patrón polimérico es depositado por una impresora comercial de tóner.

El proceso se inicia con la impresión del negativo del patrón deseado sobre un material de poca adherencia al tóner (se puede utilizar el material que recubre al laminado plástico autoadhesivo). El patrón es transferido ("tonertransfer") mediante la aplicación de calor a una placa de cobre utilizada para la impresión de circuitos impresos (PCB). Luego la placa es sumergida en una solución química capaz de disolver al cobre pero no al tóner. Por último se procede a remover la tinta con un solvente revelando así el patrón metálico deseado.

Las placas de cobres utilizada para estos propósitos se fabrican mediante el laminado de una capa de cobre sobre un sustrato no conductor. El sustrato puede estar compuesto por distintos materiales compuestos, uno de los más utilizados comercialmente es el FR-4 (compuesto por fibra de vidrio y resina epoxi). Por otro lado, el espesor de la lámina de cobre puede variar desde los 18  $\mu m$  hasta los 400  $\mu m$ . Las placas comercialmente más utilizadas están compuestas por una base de FR-4 y un espesor de cobre de 32  $\mu m$ .

El diseño del patrón de cobre permite crear los microelectrodos y al canal microfluídico simultaneamente. Mediante la creación de líneas divisoras se aislan los planos de cobre que conforman los electrodos, de los planos de cobre que conforman las paredes del canal microfluídico (ver figura 16).



Figura 16: (a) Esquema que ilustra un patrón de cobre que define a los electrodos y al canal microfluídico simultaneamente. (b) "Zoom-in" de los electrodos del esquema (a). Se puede observar el diseño de la morfología de los microelectrodos para generar un campo eléctrico no uniforme.  $E_1$  y  $E_2$ : electrodos.

Para el ensamblado del dispositivo se coloca una capa de PDMS junto con una capa de un plástico rigido por encima del canal microfluídico. La unión es asegurada mediante compresión usando tornillos y tuercas en puntos específicos (ver figura 17). Este sistema no solo permite sellar el techo del canal sino también las líneas divisorias mediante la elección de la posición de los tornillos y el torque ejercido.



Figura 17: Esquema que representa la sección del dispositivo microfluídico ensamblado con sus diferentes capas de material. Se puede observar el sistema de ensamblado conformado por los tornillos (tono gris) y las tuercas (tono negro).

Los puertos de entrada y de salida de fluido son generados mediante el agujereado de las capas de PDMS y plástico previo al ensamblado. Las conexiones eléctricas se realizan soldando con estaño pines conectores sobre los electrodos.

## 4.2. Análisis de ventajas y desventajas

La principal ventaja de esta técnica son sus bajos costos asociados que tienden a ser nulos en comparación con las técnicas desarrolladas en la sección "nálisis de diseños y fabricación de plataformas microfluídicas para generación de DEP" (3.2).

La infraestructura necesaria consiste en una computadora conectada a una impresora de tinta tóner comercial, sistema que se puede conseguir por unos 400 dólares, y el equipamiento necesario para trabajar con PDMS (balanza, bomba de vacío y estufa) que puede costar otros cientos de dólares. Cabe aclarar que a diferencia de la mayoría de las técnicas anteriomente descriptas no necesita de una sala limpia, hecho que baja considerablemente la inversión inicial para la aplicación de esta técnica.

En cuanto a los materiales, las placas para PCB de 5 x 5 cm cuestan algunos centavos de dolar por unidad, 0,5 Kg de PDMS (suficiente para

fabricar alrededor de 50 dispositivos) cuesta alrededor de 60 dólares y el resto de los materiales (tornillos, tuercas, reactivos químicos, plástico, etc) no conforman una suma considerable de dinero.

Los bajos costos y la simpleza de la técnica no solo son prometedores comercialmente sino también que permiten el prototipado rápido de distintos dispositivos para la etapa de diseño y optimización. Para cambiar el diseño solamente es necesario modificar digitalmente el patrón deseado. Por esta misma razón, estos dispositivos pueden plantearse como una alternativa descartable. Sin embargo, el método de ensamblaje permite la recuperación de los materiales por separado, permitiendo también la reutilización de los mismos.

En contraposición a su bajo costo, la técnica de "toner-transfer" no alcanza las resoluciones de las técnicas anteriormente descriptas. Sin embargo se pueden desarrollar una amplia variedad de diseños capaces de realizar diferentes tareas ("trapping", "focusing", separación celular, etc).

Como en otras técnicas de "Lab-on-a-PCB", se aprovecha tecnología existente ampliamente utilizada en la microelectrónica. Esto permite el escalado en la producción pero también ofrece una solución directa para la integración entre circuitos electrónicos y redes microfluídicas.

Al utilizar los electrodos 3D como pared del canal microfluídico, se eliminan los problemas de alineamiento que puede haber entre ellos. Esto también ofrece otras ventajas, como ya se analizó en la sección "Efectos del campo eléctrico" (3.4.1), se disminuye el calentamiento por efecto Joule. Además, mediante la utilización de distintos espesores de láminas de cobre, se puede variar la altura del canal aumentando el desempeño del dispositivo. Como en otros diseños con electrodos metálicos, los dispositivos DEP fabricados con esta técnica prescinden de un amplificador debido a la excelente conductividad del cobre y a que los electrodos actuan a lo alto de todo el canal.

Por otro lado, se presentan desventajas debido al contacto de los electrodos con la muestra. Reacciones electroquímicas pueden ocurrir en la pared de los electrodos modificando la morfología de los mismos y así la distribución del campo eléctrico. Además, el cobre no es un material biocompatible, presentando problemas citotóxicos que se deben tener en cuenta sobretodo en los módulos de preparación de muestra de los dispositivos LOC.

Finalmente, si se utiliza un plástico transparente como la última capa del dispositivo, se posibilita el análisis del funcionamiento del chip bajo un microscopio. Este es una variable fundamental para la optimización de su funcionamiento y para su uso en el ámbito académico.

# 4.3. Diseño propuesto

Para evaluar la técnica de microfabricación propuesta se fabricará un dispositivo DEP para separación celular. El patrón de cobre utilizado será el de la figura 16. Mediante la inyección de una corriente alterna entre los electrodos  $E_1$  y  $E_2$  se genera un campo eléctrico no uniforme cuyos máximos se encuentran cerca de los electrodos. Mediante la elección de la conductividad correcta del medio acuoso y basándose en la propiedades dieléctricas de cada célula, se puede elegir un rango de frecuencias para el que una célula experimente pDEP y la otra nDEP. Así, en la zona de los electrodos, la célula que experimente pDEP se acercará a los electrodos mientras que la que experimente nDEP se aproximará al centro del canal, permitiendo la separación espacial de las células (ver figura 18).



Figura 18: Principio de funcionamiento del dispositivo DEP propuesto.

# 5. Materiales y Métodos

# 5.1. Microfabricacion

(foto del chip terminado y esquema de la fab del chip)?

## 5.1.1. PDMS

Se fabricaron capas de PDMS de 2, 3, 4 y 5 mm de espesor mediante la aplicación del siguiente protocolo:

Durante la ejecución del protocolo deben usarse guantes de nitrilo y delantal.

- 1. Limpiar un vaso descartable y una tapa de caja petri de vidrio con alcohol 70° y agua destilada. El vaso se deja secar a temperatura ambiente y la tapa puede secarse en la estufa de esterelización y secado.
- Pesar el polímero base y el agente curante del kit de PDMS a una razón 10:1 en el vaso descartable.
- 3. Mezclar durante 5 minutos con una espátula-cuchara de laboratorio.
- 4. Volcar sobre una tapa de caja petri de vidrio.
- 5. Posicionar la tapa de caja petri de vidrio en el desecador y conectar a un aspirador a diafragma para generar vacío y remover las burbujas de aire generadas durante el mezclado del polímero base y el agente curante.
- 6. Apagar el aspirador y retirar del desecador para dejar curar a temperatura ambiente hasta el día siguiente.
- 7. Curar durante 1 hora a 70 °C en estufa de esterelización y secado.
- 8. Con la ayuda de una pinza de disección curva desmoldar el PDMS cuidadosamente.
- 9. Cubrir con papel aluminio.

Se utilizó una estufa de esterelización y secado de marca FAC, kit de PDMS (SYLGARD ®184 SILICONE ELASTOMER KIT, Dow Corning Corporation), aspirador a diafragma (modelo N33-A, SILFAB). La pinza de disección curva fue proveida por Instrumental Médico Lilis.

# 5.1.2. PCB

Los diseños fueron fabricados siguiendo el siguiete protocolo:

Los reactivos químicos se deben manipular bajo campana de extracción con guantes de seguridad con protección química, anteojos de seguridad y delantal.

1. Diseñar digitalmente el patrón sobre un lienzo de 5 x 5 cm en EAGLE (AUTODESK).

- 2. Exportar el negativo del diseño mediante la herramienta CAM PRO-CESSOR utilizando el protocolo PS\_INVERTED.
- 3. Imprimir el archivo ".ps" con una escala 100 % y calidad normal en una hoja A4 con una impresora laser (ver figura 19(a)).
- 4. Posicionar un trozo de 9 x 9 cm del recubirmiento del laminado plástico autoadhesivo ("contact") sobre la impresión del diseño y pegar con cinta scotch en las partes superior e inferior (ver figura 19(b)).
- 5. Imprimir el diseño con una calidad óptima sobre el recubirmiento del papel "contact" (ver figura 19(c)).
- 6. Limpiar una placa de cobre simple faz de 5 x 5 cm y 35  $\mu m$  de espesor con alcohol isopropílico 70°, centrarla sobre el diseño y se pegarla con cinta scotch (ver figura 19(d)).
- 7. Doblar la hoja A4 alrededor de la placa y aplicar calor de manera uniforme sobre la cara que contiene el diseño con una plancha a máxima potencia durante 2 minutos o hasta que el papel se torne levemente amarillo (ver figura 19(e) y (f)).
- 8. Enfriar la placa con la hoja doblada bajo agua corriente (ver figura 19(g)).
- 9. Retirar el recubrimiento del "contact" cuidadosamente y remarcar con marcador indeleble las zonas donde no se transifirió correctamente la tinta (ver figura 19(h) e (i)).
- 10. Sumergir la placa en una solución química compuesta por 30 ml de HCl 19%, 15 ml de  $H_2O_2$  100° y 45 ml de  $H_2O$  corriente.
- 11. Tapar el canal microfluídico con cinta scotch (ver figura 19(j)).
- 12. Remover con metil-etil-acetona (MEK) el tóner en donde se realizarán las conexiones eléctricas (ver figura 19(k)).



Figura 19: Protocolo de fabricación de PCB. (a) Se imprime diseño en hoja A4. (b) Se posiciona el recubrimiento del "contact" sobre el diseño. (c) Se imprime diseño sobre el recubrimiento del "contact". (d) Se posiciona placa de cobre sobre diseño. (e) Se envuelve la placa de cobre con la hoja A4. (f) Se transfiere el diseño a la placa de cobre mediante la aplicación de calor. (g) Se enfria baja agua corriente. (h) Se retira el recubrimiento del "contact". (i) Se corrige diseño con marcador indeleble. (j) Se tapa el canal microfluídico con cinta scotch. (k) Se remueve el tóner con MEK.
Se utilizó una impresora laser (Laserjet 1320n, HP), laminado plástico autoadhesivo (SELF ®), cinta scotch (Librerias Lavalle), plancha (Liliana). El alcohol isopropílico y la MEK fueron proveídos por Química Mapal. La placa de cobre fue proveída por Microelectrónica.

En el paso 10 se utilizaron dos técnicas de "wet-etching". En la primera se sumergió la placa entera hasta corroborar ópticamente que el cobre del canal microfluídico había sido removido. En la segunda se manipuló la placa para remover primero el cobre que cubre las salidas y las entradas (zonas externas a las líneas divisoras) y luego se removió el cobre en la zona de los electrodos. En esta última estrategia también se corroboró ópticamente la optimizacion del tiempo necesario para la finalizacion del proceso.

Luego de fabricar los agujeros que alojan los tornillos como se indica en la sección "Capa plástica y agujereado del dispositivo" (5.1.3) se procedió a realizar las conexiones eléctricas. Se soldaron dos pines 90° con estaño o pegamento epoxi conductivo (8331S-15G, MG Chemicals). Se utilizaron dos cables multifilares de 0,25  $mm^2$  y 15 cm de largo con terminal para alojamiento recto y un alojamiento mini para conectar el dispositivo con el generador de onda.

Las perforaciones en la placa de cobre para alojar los pines  $90^{\circ}$  se realizaron con un mini torno (3000 F013300052, DREMEL) y una mecha de 1 mm. Los materiales electrónicos fueron proveídos por Microelectrónica.

Se revisó continuidad entre los paneles de cobre y entre las conexiones eléctricas con un multímetro (UTR9C, UNI-T). Para esto es necesario retirar la cinta scotch que cubre al canal microfluídico. Cuando se encontró continuidad entre las líneas divisorias se procedió a remover las imperfecciones del patrón de cobre con un bisturí (Instrumental Médico Lilis) bajo una lupa binocular estereoscópica (St 30 2l, ARCANO) o una amoladora de banco (STGB3715-AR, STANLEY) ya que estas imperfecciones se encontraron en los extremos de la placa.

#### 5.1.3. Capa plástica y agujereado del dispositivo

Se utilizaron distintos materiales plásticos con variedad de espesores: polimetilmetacrilato (PMMA) de 1,65 mm, policarbonato (PC) de 1,5 mm y polietileno tereftalato (PET) (1 mm), proveídos por DG Acrílicos. Se cortaron placas de 6,5x5 cm y se agujerearon junto a las placas de cobre fabricadas en la sección "PCB" (5.1.2) con el siguiente protocolo:

Durante la ejecución de este protocolo es necesario utilizar anteojos de

protección.

- Alinear PCB con capa plástica con dos ganchos de librería (ver figura 20(a)).
- 2. Realizar 2 agujeros, retirar clips de librería y colocar 2 tornillos con la cabeza apoyada sobre la base de la taladradora y sus respectivas tuercas para asegurar la alineación (ver figura 20(b)).
- 3. Hacer los agujeros necesarios para el diseño.
- 4. Marcar con una trincheta los lugares donde se harán los agujeros para los puertos de entrada y salida de fluido (ver figura 20(c)).
- 5. Retirar los tornillos y hacer los agujeros donde se realizaron las marcas con la trincheta (ver figura 20(d)).
- Se realiza una marca sobre la capa plástica para conservar la orientación.

Los agujeros para los tornillos fueron realizados con una taladradora (ABM 13, BARBERO) y mechas de 3,25 mm 4 mm para metal. Los aguejeros para los puertos de entrada y salida de fluido se realizaron con un mini torno (3000 F013300052, DREMEL) y mecha 1 mm. Se utilizaron tornillos de 3 mm de diámetro con cabeza redonda y cónica y tornillos de 4 mm de díametro con sus respectivas tuercas. Las mechas, tornillos y tuercas fueron proveídos por Bulonera GATA. Los ganchos de librería fueron proveídos por Librerías Lavalle.

#### 5.1.4. Ensamblaje y conexiones microfluídicas

Se probó el ensamblado del dispositivo con ganchos de librería sobre el PDMS o sobre la capa plástica sin la realización de agujeros. También se probó el ensamblado sin la capa plástica mediante tornillos, tuercas y arandelas (3 mm de diámetro) sobre el PDMS. Alternativamente se probó sellar las salidas de las líneas divisorias con PDMS y con adhesivo epoxi (Parsecs).

Cuando se aplicó el protocolo detallado en la sección "Capa plástica y agujereado del dispositivo" (5.1.3), se procedió a ensamblar el dispositivo con el siguiente protocolo:

- Cortar con bisturí una capa de PDMS de igual superficie que la capa plástica (ver figura 21(a)).
- Alinear PDMS con PCB agujereado mediante clips de librería y realizar los agujeros necesarios sobre el PDMS con un punzón biopsia de 4 mm (ver figura 21(b)). Retirar el PDMS removido del punzón biopsia con la ayuda de un bisturí. Además de los agujeros para los tornillos se debe agujerear el PDMS donde se encuentra la soldadura de estaño.
- Retirar clips de librería y ensamblar las 3 capas colocando 2 tornillos con la cabeza apoyada sobre la capa plástica para asegurar la alineación (ver figura 21(c)).
- Introducir puntas agujereadoras (dispensing tips 20 gauge) por los agujeros realizados en la capa plástica. Atravesar el PDMS hasta tocar el PCB (ver figura 21(d)).
- Retirar tornillos y cuidadosamente remover el cilindro de PDMS. Para esto se puede aplicar presión del lado contrario que se introdujo la punta agujereadora con un dedo mientras se termina de atravesar el PDMS completamente (ver figura 21(e) y (f)).
- Retirar el PDMS removido de la punta agujereadora empujando con una aguja 27 gauge (ver figura 21(g)).
- Repetir pasos 4, 5 y 6 las veces que sea necesario.
- Ensamblar las 3 capas del dispositivo posicionando los tornillos y sus respectivas tuercas.
- Con la ayuda de una pinza de disección curva introducir las mangueras microfluídicas (ver figura 21(h)).



(c) (d)

Figura 20: Protocolo de perforado. (a) Se alinea el PCB con capa plástica y se hacen 2 agujeros. (b) Se alinea el PCB con 2 tornillos con sus respectivas tuercas y se hacen los agujeros que sea necesario (c) Se marca con una trincheta las posiciones de los agujeros de entrada y de salida. (d) Se realizan los agujeros de entrada y de salida.



Figura 21: Protocolo de ensamblaje. (a) Se corta PDMS. (b) Se alinea PCB y PDMS con clips de librería. (c) Se alinea PCB, PDMS y capa plástica con tornillos. (d) Se introducen puntas agujereadoras. (e) Se atraviesa el PDMS ejerciendo presión en la salida con un dedo. (f) Se termina de atravesar el PDMS con las punta agujereadoras. (g) Se retira cilindro de PDMS con aguja. (h) introdución de las mangueras. (i) ensamblado final.

Se utiliazron agujas 20 gauge (Jensen Global), agujas 27 gauge proveidas por Elder Tec y punzón de biopsia proveído por Instrumental Médico Lilis. Las mangueras microfluídicas tienen 0,01 y 0,03 pulgadas de diámetro interno y externo respectivamente (Tygon).

## 5.2. Preparación de la muestra

Se utilizaron tres líneas celulares: levaduras *Saccharomyces cerevisiae* en estado seco (safeale us-05, Fermentis), lactobacilos *lactobacillus acidophilus* en estado seco (Piping Rock Health Products) y células Jurkat (E6,1; European Collection of Authenticated cell cultures) cultivadas en el laboratorio.

Las levaduras y los lactobacilos fueron resuspendidos en agua destilada y en otro medio compuesto por 10 ml de PBS (PH 7.4) y 90 ml de un medio isotónico (8,5% w/v de sacarosa y 0,3% w/v de dextrosa).

Células Jurkat fueron cultivadas en un medio de crecimiento RPMI-1640 (Gibco) suplementado al 10% con suero fetal bovino (Gibco), L-Glutamina (Invitrogen), antibiótico formado por penicilina, streptomicina y fungizone (Gibco). El cultivo se hizo en una estufa de cultivo (3111, Thermo Scientific) en un ambiente humificado a 37 °C y 5% de  $CO_2$ 

Las levaduras y los lactobacilos fueron teñidas con un fluoróforo lipofílico (Vybrant<sup>TM</sup> DiI Cell-Labeling Solution, V22885, Invitrogen<sup>TM</sup>) siguiendo el protocolo aportado por Invitrogen (ver Anexo).

Las células Jurkat fueron preparadas para el experimento con el siguiente protocolo:

- 1. Contar viabilidad celular.
- 2. Centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.
- 3. Retirar sobrenadante y resuspender en un medio isotónico compuesto por 220 mM de sacarosa, 16 mM de dextrosa, 1  $\mu m$  de  $CaCl_2$  y 5 mM de  $Na_2HPO_4$  (PH 7,4).
- 4. Repetir paso 2 y 3.
- 5. Repetir paso 1.
- 6. Repetir paso 2.

- 7. Teñir medio isotónico (8, 5 % w/v) de sacarosa y 0, 3 % w/v de dextrosa), corrigir PH a PH fisiológico y filtrar la solución con filtro de jeringa de  $0,2\mu m$ .
- 8. Retirar sobrenadante y resuspender en el medio isotónico teñido.
- 9. Repetir paso 1.

Los conteos de viabilidad celular se realizaron con una cámara Neubauer mediante una tinción con azul de tripano. Para centrifugar se utilizó una centrifugadora Sorvall ST 16R, Thermo Scientific. Todos los reactivos químicos fueron proveídos por Anedra (R), Research AG S.A.

Todos los medios se realizaron con agua ultra pura filtrada con el equipo Simplicity  $\mathbb{R}$ UV, Merck Millipore. Además, estos fueron filtrados en dos etapas: primero por un filtro Whatman<sup>TM</sup>(Cat. N° 1001 125) y luego por un filtro de 0, 22µm (431097, CORNING).

La tinción del medio isotónico compuesto por sacarosa y dextrosa se realizó con concentraciones de 1; 0,5 y 0,1 mg/ml de calceína (C481, Invitroge <sup>TM</sup>). Se utilizó un filtro de jeringa 0,2  $\mu m$  de CORNING. A medida que se corrigió el PH se tomaron mediciones de conductividad. Las mediciones de PH y conductividades se realizaron con un multiparametro de mesada (EZDO-PC, ALTRONIX).

## 5.3. Seteado del experimento

Para la optimización del sellado y funcionamiento del chip se modificó el torque ejercido a los tornillos en función del análisis óptico del flujo de tintas introducidas al canal microfluídico. Se utilizaron tres tintas: tinta china (Librería Lavalle), azul de metileno y una solución de Dodecilsulfato de sodio (BIO BASIC CANADA INC.) 1% y calceína 1 mg/ml.

Las tintas se introdujeron al canal microfluídico con un flujo de 1  $\mu l/min$ mediante una jeringa de 3 ml (Terumo) y una aguja 27 gauge conectada a la manguera microfluídica. El flujo fue controlado con una bomba de infusión (NE-4000, New Era Pump Systems, Inc.). Se posicionó el dispositivo en un microscopio invertido de fluoresencia (ECLIPSE TS 100, Nikon) equipado con una fuente y lámpara de mercurio (C-SHG, Nikon), filtro de fluoresencia B-2A (Nilkon) y una cámara CMOS (Micrometrics 519CU). El dispositivo se posicionó sobre una base de PMMA (2 mm) diseñada a medida para el experimento. Se conectó el dispositivo a un generador de onda (AG 1022, OWON®) y a un osciloscopio (MSO7102TD, OWON) (ver figura 22). Se introdujeron las células Jurkat suspendidas en el medio isotónico teñido con calceína y se le aplicó una onda sinusoidal con 23  $V_{pp}$ . Se varió el flujo y la frecuencia de la onda aplicada y se realizaron fotografías y videos.



Figura 22: Mesa de trabajo. (a) Se observa de izquierda a derecha: osciloscopio, generador de onda (abajo), bomba de infusión (arriba) y microscopio invertido de fluoresencia. (b) Se observa el dispositivo conectado al equipamiento y posicionado para su análisis óptico. Las salidas de las mangueras fueron ubicadas en eppendorfs.

# 6. Resultados y discusión

Se fabricaron alrededor de una quincena de diseños (ver figura 23) que permitieron la optimización de la ténica de microfabricación. A continuación se mostrarán los resultados obtenidos y las discusiones acerca de las mejoras aplicadas y posibles mejoras a futuro de la técnica de microfabricación propuesta. Además se mostrarán los resultados del experimento dielectroforético utilizando el último diseño fabricado. Se discutirán los problemas encontrados y posibles mejoras para la optimización del funcionamiento del dispositivo.



Figura 23: Se observa una quincena de dispositivos microfluídicos fabricados con la técnica propuesta. De derecha a izquierda y de abajo hacia arriba se puede ver el progreso en el diseño y en la aplicación de la técnica.

# 6.1. Optimizacion de la técnica de microfabricación

En esta sección se mostraran los resultados a partir de los obstáculos encontrados en la microfabricación del canal.

## 6.1.1. Sellado del canal

El primer desafío que se presentó fue el sellado del canal microfluídico y las líneas divisorias que separan estos de los electrodos. Es importante remarcar que el objetivo en esta sección es sellar completamente las lineas divisorias para evitar pérdidas y sellar el canal de manera tal de que se obtenga una sección lo más unifrome posible. Se plantearon diferentes estrategias para abordar el problema:

• <u>Clips de librería</u>: Se intentó sellar el dispositivo mediante clips de librería ejerciendo presión sobre la capa plástica o el PDMS (ver figura 24).



Figura 24: Ensamblado del dispositivo mediante clips de librería. (a) Los clips de librería ejercen la presión sobre la capa plástica. (b) Los clips de librería ejercen la presión sobre el PDMS. (c) Vista superior del dispositivo.

En la bibliografía consultada se han encontrado dos ejemplos que utilizan clips de librería para sellar el canal con éxito. Altomare *et al.* fabricaron una micro cámara DEP para manejo celular basada en un PCB [42]. El sistema consiste en una base de PCB que alberga los electrodos sellada con una capa transparente conductiva que, a su vez, funciona de electrodo. La altura de la micro cámara está dada por dos cables de fibra óptica mientras que una junta de silicona delimita sus lados. El sistema es ensamblado y sellado por dos clips de librería. Gadish *et al.* lograron sellar un canal microfluídico compuesto por una base de vidrio que alberga los electrodos, una capa de PDMS que contiene el canal microfluídico y una tapa de vidrio que le otorga rigidez al dispositivo [43].

Sin embargo, cuando se ejerció presión sobre la capa plástica se observó el colapso del canal microfluídico debido a que la capa plástica distribuye la fuerza de los clips (~ 2 Kgf), [44]) através de todo el dispositivo.

Por otro lado, aunque se consiguió sellar el canal aplicando presión directamente sobre el PDMS y alrededor del canal, se presentaron diversas desventajas. Los clips de librería imposibilitaron el análisis bajo el microscopio. Además, como este sistema de ensamblado ofrece poco manejo de la distribución de la fuerza, fue necesario modificar la posición de estos hasta encontrar la posición óptima. Esto no solo es sumamente laborioso sino que desalinea los agujeros ubicados en el PDMS, de los puertos ubicados de entrada y de salida del PCB.

• <u>Tornillo y arandela sobre PDMS</u>: En búsqueda de tener un mayor control de distribución de la fuerza aplicada y de la alineación del dispositivo se utilizó una serie de tornillos con arandelas ejerciendo la presión sobre la capa de PDMS (ver figura 25).





A pesar de las mejoras introducidas, este sistema resultó en un sellado ineficiente. Se observó que a medida que se ejercía torque en los tornillos se colapsaba la sección debajo de la arandela pero las zonas a su alrededor se elevaban debido a la deformabilidad del PDMS. Esto resultó en el sellado de las lineas divisorias pero no del canal microfluídico.

• <u>Adhesivo epoxi</u>: Como alternativa al sellado de las líneas divisorias se aplicó adhesivo epoxi entre la lámina de cobre y el PDMS.

En la literatura consultada se encontró que Wang *et al.* han sellado un PCB con una capa de vidrio mediante la aplicación pegamento UV. El principal problema con este sistema es la aplicación de una cantidad justa y pareja de pegamento para no inundar los canales microfluídicos de pegamento [2]. Para evitar esta complicación se aplicó el pegamento a lo largo del perímetro del dispositivo. Ante la introducción de tinta china en el canal se observó pérdida a las salidas de las líneas divisorias.

• <u>Tornillo sobre capa plástica</u>: Para evitar la deformación del PDMS alrededor de las zonas donde se ejercía presión, se posicionó una capa plástica por encima del PDMS otorgándole rigidez al dispositivo.

Para sujetar las tres capas se utilizaron, como primera opción, tornillos de 4 mm de diámetro. Al realizar las perforaciones en el PCB se observó que este se deformaba debido a la presión ejercida por la mecha de 4 mm (ver figura 26). La deformación del PCB imposibilitó el sellado correcto del dispositivo.



Figura 26: (a) Perforaciones realizadas con una mecha de 4mm de diámetro para metal. (b) Se observa la deformación de la placa de cobre (izquierda placa agujereada, derecha, placa sin agujerear).

Por esta razón se decidió utilizar tornillos de 3 mm de diámetro. Las perforaciones se realizaron con una mecha de 3,25 mm para facilitar la in-

troducción de los tornillos. La presión se generó con una tuerca posicionada debajo de la placa de cobre (ver figura 27)



Figura 27: Sistema de sellado compuesto por tornillos y tuercas. (a) Vista superior. (b) Vista inferior.

Para evitar el colpaso del canal, como ocurría con los clips de librería, y basándose en un trabajo encontrado en la literatura que utilizó un sistema similar [29], se realizó una abertura en la capa plástica posicionada sobre el canal microfluídico (ver figura 28). En el primer caso (figura 28(a)), al aplicar torque a los tornillos se deformó el PDMS que no se encontraba cubierto por la capa plástica. Como solución, se disminuyó la dimensión de la abertura en la capa plástica posicionada sobre el canal microfluídico (ver figura 28(b)). A pesar de obtener resultados positivos en cuanto al sellado del dispositivo, se introdujo un problema para el análisis óptico que será desarrollado en la sección "Análisis bajo microscopio" (6.1.2).



Figura 28: Sistema de ensamblado con abertura en capa plástica. (a) Abertura sobre la capa plástica. (b) Abertura sobre la capa plástica restringida a las dimensiones del canal.

En consecuencia, se procedió a utilizar una capa plástica sin realizar la abertura sobre el canal. En este caso se observó que el torque necesario para colapsar totalmente las lineas divisorias provocó que el PDMS y la capa plástica se deformara en la zona del canal (resultado similar al observado con la utilización del sistema "tornillo-arandela"). Para posibilitar la introducción de más tornillos se decidió aumentar el área del "lay-out" del diseño (ver figura 29). En la figura 29(a) se observa una placa de cobre de 2, 5 x5cm que contiene dos hileras de perforaciones para sellar las líneas divisorias mientras que en la figura 29(b) se observa una placa de cobre de 5 x5cm con las mismas hileras más dos tornillos próximos a los canales. Esto permitió aplicar un torque a los tornillos de las hileras para sellar las líneas divisorias, y otro torque para sellar el canal óptimamente.



Figura 29: Sistema de ensamblado con capa plástica sin perforar. (a) "Layout" de 2, 5 x 5 cm. (b) "Lay-out" de 5 x 5 cm.

Este sistema de ensamblaje depende de dos variables. La primera es la posición de los tornillos y la segunda es el torque ejercido a estos. Mediante las iteraciones en los diseños y fabricación de dispositivos, se pudo concluir que, con una capa plástica de 1,65 mm de espesor, una de PDMS de 3mm de espesor y un tornillo de 3 mm de diámetro con cabeza cónica, se puede modificar la sección de un canal ubicado hasta 7 mm. Este resultado es de suma utilidad para plantear futuros diseños de dispositivos.

No se ha encontrado en la literatura otro método para sellar un canal microfluídico definido por los electrodos ubicados en un PCB. En este trabajo se propuso uno y se probó con éxito su funcionamiento. Sin embargo hay que remarcar que este método es altamente dependiente del diseño y del usuario, hecho que dificulta su estandarización.

• Otros métodos: Cai ha desarrollado un método para ensamblar dis-

positivos 'Electrical-Optical-Circuit-Board" (EOCB) [45]. En este método se demuestra la unión entre una capa de PDMS y materiales utilizados en la fabricación de PCBs como cobre y FR-4 mediante la adición de "Surface-Adhesion-Promoters" (SAP) al prepolímero de PDMS. Shiroma *et al.* han propuesto un nuevo enfoque para el ensamblaje de dispositivos microfluídicos [46]. Este método se basa en el encapsulamiento del sustrato del dispositivo entre capas de PDMS.

En un futuro trabajo se debe investigar si estos métodos son aplicables para ensamblar dispositivos con la técnica de microfabriación propuesta.

#### 6.1.2. Análisis bajo microscopio

Uno de los objetivos del diseño del dispositivo es lograr la posibilidad de analizar su funcionamiento bajo microscopio. Para lograr esto es necesario asegurar que el objetivo del microscopio llegue a su distancia focal, delimitando el espesor del dispositivo. También se debe procurar la uniformidad, no solo el de sus capas sino también en el apoyo de la base del microscopio. A partir de este requisito se tomaron las siguientes decisiones.

• <u>Elección cabeza de tornillo</u>: Debido a la utilización de un microscopio invertido, el dispositvo debe posicionarse boca abajo, con las cabezas de los tornillos en la base del microscopio (ver figura 22(b)). Para asegurar la uniformidad de su posicionamiento sobre la base se decidió utilizar los tornillos de cabeza cónica.

•Espesores de capas y elección de material de capa plástica: La cabeza cónica de los tornillos miden 1, 5 mm de largo. Se fijó el espesor de la capa plástica, utilizando una capa de PMMA de 1,65 mm y se fabricaron dispositivos con capas de PDMS de 2, 3, 4, 5 mm con el fin de obtener el máximo espesor posible del dispositivo que posibilite el enfoque del ojetivo del microscopio. Se obtuvo como resultado que se pudo enfocar correctamente con un objetivo 10x dispositivos de hasta 7,15 mm de espesor. A pesar de que el espesor del dispositivo permitía llegar a la distancia focal del objetivo 20x, nunca se pudo enfocar correctamente. Esto se atribuye a la naturaleza óptica de las capas.

Cabe aclarar que este análisis se basa en un espesor de cobre de 35  $\mu m$  y que el espesor del sustrato de la placa de cobre no se toma en cuenta ya que se debe enfocar en su superficie.

Material	Módulo de Young (GPa)
PMMA	1,8-3,1 [47]
PC	2,6 [48]
PET	2-2,7 [48]

Tabla 1: Módulo de Young de los distintos materiales plásticos utilizados.

Como se explicó en la sección "Sellado del canal" (6.1.1), se utilizaron capas plásticas agujereadas y sin agujerear. Se probaron capas plásticas de PMMA, PC y PET. Las perforaciones fueron realizadas con las mismas mechas  $(1 \ mm)$  que se usaron para realizar los agujeros de entrada y de salida. Se observó que el material más apto para trabajar con esta técnica es el PMMA. Tanto el PC como el PET tienen una menor oposición a la presión transversal ejercida por la mecha. Este fenómeno se debe a los módulos de Young de los materiales (ver Tabla 1).

Una de las mejoras que se pueden aplicar en un futuro trabajo es la modificación del protocolo de fabricación de PDMS. Este difiere de los protocolos estandarizados en el curado del PDMS, en vez de realizar un curado a temperaturas alrededor de los 70°, primero se deja curar a temperatura ambiente. Este cambio se introdujo porque la estufa de esterilización y secado del laboratorio de biología molecular y celular del ITBA posee una inclinación dando como resultado una capa de PDMS no uniforme. Al realizar un pre-curado en la mesada de laboratorio se obtiene una capa de PDMS semi rígida dispuesta a someterse a la inclinación de la estufa para realizar su curado final sin alterar su forma. Con el fin de ahorrar tiempo y simplificar el flujo de trabajo se debería corregir la inclinación en la estufa de secado y esterelización. Además, idealmente se debería conseguir un recipiente cuya base sea lo más uniforme posible. La tapa de la caja de petri de vidrio utilizada en este trabajo presenta una leve inclinación hacia el extremo de su radio.

#### 6.1.3. Conexiones eléctricas

A lo largo de la optimización de la técnica se probaron dos tipos de soldadura: con estaño y con pegamento epoxi conductivo.

En los primeros dispositivos las conexiones eléctricas se realizaron por debajo de la capa de PDMS (ver figura  $29(\mathbf{a})$ ). Al soldar los pines con estaño al PCB se generaba un montículo poco uniforme que complicaba el sellado del canal. A raíz de esto se probó el pegamento con epoxi conductivo con

el fin de reducir la cantidad de material depositado por debajo de la capa de PDMS. Se observó que depositando una pequeña cantidad de pegamento epoxi conductivo de tal manera que permite el sellado eficiente del dispositivo, las conexiones eléctricas eran mecánicamente inestables y no soportaron la manipulación posterior para su uso.

Aprovechando el ensanchamiento del "Lay-out" como se explicó en la sección "Sellado del canal" (6.1.1) se ubicaron las conexiones eléctricas en los extremos de la capa de PDMS. En esta posición se soldaron pines 90° con estaño (ver figura 29(b)).

#### 6.1.4. Resolución

La resolución de la técnica depende de dos variables. La resolución de la impresora de tinta tóner y los tiempos de "wet-etching".

En la figura 30 se puede ver la impresión del diseño en la zona de los electrodos.



Figura 30: Imagen aumentada 4x que muestra la impresión de los electrodos sobre una hoja A4.

En base a la figura anterior se puede observar que la impresora no tiene la resolución suficiente para imprimir los electrodos cuadrados diseñados digitalmente (ver figura 32). Sin embargo, Lin *et al.* demostraron que que es preferible la utilización de electrodos con morfología ondular ("wavy-electrodes") frente a electrodos cuadrados ("castellated") [36]. Así, en este trabajo se aprovechó la baja resolución de la impresora para imitar los "wavy-electrodes".

Por otro lado, se utilizaron dos técnicas de wet-etching. En la primera se sumergió la placa entera hasta corroborar que todo el cobre había sido removido del canal. Se observó que el tiempo de inmersión necesario para remover el cobre de los puertos de entrada y de salida provoca la remoción de parte de cobre por debajo de la tinta tóner. Esto resulta en la pérdida total de la morfología de los electrodos (ver figurea  $31(\mathbf{a})$ ). Para solucionar este inconveniente se procedió a manipular la placa de cobre dentro del baño químico de manera tal que primero sea removido el cobre en los extremos (puertos de entrada y salida) y luego el cobre de los electrodos. Los tiempos de inmersión fueron 3 minutos por cada extremo y 6 minutos para la inmersión total (ver figura  $31(\mathbf{b})$ ).



Figura 31: Imagen aumentada 10x de los electrodos microfabricados con dos estrategias de "wet-etching". (a) Inmersión de la placa por partes, primero los extremos y luego la placa entera. (b) Inmersión de la placa entera.

Para aumentar la resolución de la técnica se podría utilizar una impresora de tinta tóner con mayor resolución. También se utilizar cualquier otra ténica de microfabricación de PCBs como por ejemplo la de fotolitografía. La técnica de "toner-transfer" es sumamente útil para el prototipado rápido de dispositivos pero por su baja productividad resulta imposible llevarla al plano comercial. Para esto es necesario la elección de una técnica de fabricación de PCB que ya se encuentre probada económicamente en el mercado de la microelectrónica.

#### 6.1.5. Diseño final y dispositivo

A partir de la toma de decisiones anteriores se obtuvo un diseño final (ver figura 32) cuyas dimensiones se encuentran detalladas en la tabla 2.



Figura 32: Diseño virtual final. (a) "Lay-out" completo. (b) "Zoom-in" en la zona de los electrodos.

El diámetro de los puertos de entrada y de salida se eligió para posibilitar el alineamiento con los agujeros realizados en la capa de PDMS y de PMMA. El largo de los canales que conectan los puertos con la zona de electrodos se escogió en base al diámetro del objetivo 10x ya que en diseños anteriores las mangueras microfluídicas imposibilitaban el enfoque del objetivo. El largo del canal principal entre electrodos se seleccionó de manera tal que las perforaciones que albergan los tornillos para sellar el canal principal no se superpongan con las lineas divisorias. El ancho del canal principal y la dimensión de los electrodos fue elegida en base al trabajo realizado por Lin *et al.* [36].

En la figura 33 se muestra la fabricación del dispositivo en base al diseño final escogido. Las hileras de tornillos en los extremos sellan las líneas divisorias por completo mientras que los tornillos alrededor del canal sellan el canal de manera tal que todo el flujo introducido salga por las mangueras de salida sin colapsar el canal.

Zona	Dimensión (mm)		
"Lay-out"	$50 \ x \ 50$		
Puertos de entrada y salida	1,5 de diámetro		
Canal principal hasta electrodos	$0, 15 \ x \ 3, 4$		
Líneas divisorias	$0,1 \ x \ 50$		
Canal principal entre electrodos	$0, 15 \ x \ 3, 4$		
Electrodos	$0, 1 \ x \ 0, 1$		
Zona de bifurcación	$0,22 \ x \ 0,3$		
Canales de salida externos	$0, 1 \ x \ 0, 7$		
Canales de salida interno	$0, 12 \ x \ 0, 5$		

Tabla 2: Dimensiones del diseño ilustrado en la figura 32



Figura 33: Dispositivo fabricado en base al último diseño. Se muestran en rojo la distancia del centro del tornillo al extremo de la placa. Se asume simetría.

## 6.2. Tratamiento de muestra

En esta sección se detallarán los resultados que se obtuvieron a partir de la optimización de las condiciones para realizar el experimento dielectroforético con el último dispositivo fabricado.

#### 6.2.1. Especies celulares

En primera instancia se planteó el uso de levadura y lactobacilos como especies celulares para introducir al canal. Estas especies se pueden conseguir en estado sólido, simplificando el proceso y flujo de trabajo ya que se ahorra el cultivo de las mismas. Las células en estado sólido deben ser sometidas a un proceso de rehidratación para resuspenderlas en una solución y poder introducirlas al dispositivo. Las dos especies celulares fueron sometidas a dos procesos de rehidratación.

El primer ensayo se realizó con agua destilada y no se observaron resultados positivos. Luego de 5 minutos se observó la decantanción de las células. Además, en este proceso de rehidratación se corre el riesgo de la muerte celular debido a la presión osmótica. Por consiguiente, se procedió a utilizar un medio isotónico, proceso desarrollado por Khoshmanesh *et al.* [29]. En este trabajo se utilizan las mismas especies celulares en estado sólido y se resuspenden con éxito para realizar un experimento de "trapping" en un dispositivo DEP. A pesar de los esfuerzos realizados para imitar las condiciones de resuspensión no se obtuvieron resultados positivos, las células decantaron rápidamente. Esto no solo imposibilita la introducción de ellas al dispositivo sino que también impide una futura tinción celular.

Por estas razones se decidió utilizar células pertenecientes a la línea Jurkat. Estas son células existen naturalmente en suspensión debido a que son células no adherentes y tienen un radio relativamente pequeño (3-6  $\mu m$ ) [49].

#### 6.2.2. Tintas

Se utilizaron tintas con dos propósitos. Por un lado es necesario ver el flujo introducido para optimizar el torque ejercido a los tornillos. Por otro lado es necesario el uso de tintas para visualizar las células en el canal microfluídico ya que estas son transparentes.

En las primeras etapas del trabajo se utilizó tinta china diluida para visualizar el flujo a través del canal. A pesar de utilizar soluciones con diferentes niveles de disolución se observó el depositado de partículas en el canal microfluídico y en las mangueras. Como alternativa se utilizó azul de metileno debido a su mayor solubilidad en agua. Adicionalmente se utilizó un filtro de jeringa para introducir las tintas. A pesar de que se obtuvieron mejores resultados que con la tinta china, todavía se observaron contaminaciones en el canal.

Como solución se procedió a utilizar calceína diluida en agua ultra pura (1, 0,5 y 0,1 mg/ml) con 1 % de SDS. La calceína es un fluoróforo que tiñe el medio y el SDS es un compuesto tensioactivo aniónico que sirve para la limpieza del canal. De esta manera al optimizar el torque de los tornillos simultáneamente se limpia el canal para el experimento dielectroforético. En este paso se utilizaron con éxito los medios con concentraciones de 1 y 0,5 mg/ml mientras que con 0,1 mg/ml se dificulta el análisis óptico para optimizar el torque. Para evitar la deposición de partículas en el canal es necesario preparar una solución de SDS al 1% como se detalló en la sección "Preparación de la muestra" 5.2, agregar la calceína y filtrar la solución con un filtro de jeringa de 0,22  $\mu m$ .

En cuanto a la tinción celular, primero se trabajó con levaduras y lactobacilos. Se realizó la tinción con un fluoróforo lipofílico que puede teñir tanto células vivas como muertas. Debido a los problemas de rehidratación especificados en la sección "Especies celulares" (6.2.1) no se obtuvo una tinción uniforme. Al trabajar con las células Jurkat se optó por no teñir la célula sino teñir el medio con calceína para visualizar la célula por contraste. Las células vivas son impermeables a la calceína, de esta manera se puede visualizar el patrón del flujo y al mismo tiempo las células vivas (ver figura 34). A pesar de posibilitar la visualización de células Jurkat vivas dentro del canal la elección de este medio introdujo problemas explicados posteriormente.



Figura 34: Se muestra con una flecha roja la célula Jurkat rodeada por una burbuja.

Como alternativa a la tinción del medio con calceína se puede plantear en un futuro trabajo la tinción celular con otro fluoróforo. Este debe ser elegido en base al rango de longitudes de emisión y excitación del filtro de fluoresencia utilizado, el rango de longitudes de onda de emisión y excitación del fluoróforo y la naturaleza de su tinción.

El filtro de fluoresencia del microscopio utilizado tiene el siguiente espectro de emisión y excitación:



Figura 35: Espectro de emisión y excitación de un filtro B-2A. Gráfico tomado de [50]

En base a estos requisitos el laboratorio de biología molecular y celular del ITBA cuenta con dos fluoróforos que se podrían utilizar en este experimento.

El fluoróforo utilizado para teñir levaduras y lactobacilos (Dil Vybrant) puede utilizarse para teñir células Jurkat ya que tiñe la membrana lipídica de la célula y tiene el siguiente espectro de emisión y excitación:



Figura 36: Espectro de emisión y excitación del fluoróforo Dil Vybrant. Espectro de excitación en azul y de emisión en rojo. Gráfico tomado de [51]

Otra posible opción es la calceína AM. Este es un colorante que penetra en la célula y es utilizado en la mayoría de las células eucariotas. La calceína AM es no fluorescente en solución pero fluoresce cuando ingresa a la celula viva. El espectro de emisón y excitación de este colorante (ver figura 37) se superpone con el del filtro de fluoresencia y por ende podría utilizarse en este experimento.



Figura 37: Espectro de emisión y excitación de la calceína AM. Espectro de excitación en azul y de emisión en rojo. Gráfico tomado de [52]

#### 6.2.3. Elección del medio para el experimento dielectroforético

La elección del medio acuoso para realizar el experimento dielectroforético debe basarse en las siguientes variables:

- Condiciones medioambientales para asegurar la viabilidad celular (principalmente PH y presión osmótica).
- Conductividad que permita pDEP y nDEP.
- Baja cantidad de componentes que puedan tapar el canal microfluídico.

El medio de cultivo de las células Jurkat establece las condiciones ideales para el crecimiento de esta especie. Sin embargo, al ser un medio fisiológico posee una alta conductividad (permitiendo solo nDEP) y, además, posee una gran cantidad de componentes que pueden obstruir el canal microfluídico.

Basándose en trabajos que utilizaron células Jurkat en experimentos dieletroforéticos [53, 54, 55] se decidió utilizar un medio isotónico con baja conductividad (8,5% w/v de sacarosa y 0,3% w/v de dextrosa). La elección de este medio se basa en la búsqueda de una conductividad que permita tanto pDEP como nDEP. En la bibliografía encontrada la conductividad es modificada con buffer fosfato salino (PBS). Sin embargo, en este trabajo la conductividad se modificó con otra estrategia.

Como se detalló en la sección "Tintas" (6.2.2) el medio se tiñó con calceína. Como este es un componente orgánico altamente ácido se tuvo que corregir el PH a un PH cercano al fisiológico. El PH se corrigió utilizando  $N_aOH$  y debido a la disociación del ión sodio se observó un aumento en la conductividad del medio. En la tabla 3 se muestran las conductividades obtenidas a diferentes PH del medio teñido con diferentes concentraciones de calceína.

Conc. $(mg/ml)$	$\mathbf{PH} - \mathbf{Conductividad} \ (\mu S/cm)$				
0	6,2-5	-	-	-	-
0,1	4,03 - 50	6,52 - 199	7,97 - 225	-	-
0,5	3,3 - 116	6,14 - 141	$6,\!66-178$	6,8 - 181	9,66 - 254
1	3,12 - 178	4,34 - 204	6,82 - 384	7 - 386	7,24 - 400

Tabla 3: Variación de la conductividad mediante la correción del PH del medio isotónico teñido con distintas concentraciones de calceína pura.

En base a las curvas obtenidas por Sabuncu *et al* (ver figura 15) se puede observar que es posible la generación de pDEP y nDEP utilizando el medio isotónico propuesto teñido con cualquiera de las concentraciones medidas. Además, si se quisiera una conductividad mayor, se podría agregar PBS.

Adicionalmente, con el fin de disminuir el riesgo del traspaso de partículas del medio de cultivo al canal microfluídico, se realiza un paso de lavado celular. Antes de resuspender las células en el medio de baja conductividad, se resuspenden en un medio isotónico (ver protocolo en la sección "Preparación de la muestra" (5.2). Este medio contiene calcio para preservar la morfología de la pared celular en los pasos de centrifugación [54]. La conductividad de este medio no es relevante ya que no se introduce al canal microfluídico.

Para evaluar el efecto de estos dos medios se midió la viabilidad celular según el protocolo propuesto. En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos.

A partir de estos resultados se puede corroborar que lavar las células con el buffer isotónico propuesto no afecta la viabilidad ni la cantidad de células. Luego, se nota que en la resuspensión en el medio de baja conductividad cae tanto el conteo celular como la viabilidad. Este resultado se atribuye a la manipulación de la muestra y al "stress" ocasionado por el medio con baja presión osmótica y nutrientes. Sabuncu *et al.* estudiaron el efecto de los medios de baja conductividad en células Jurkat y condrocitos.

## 6.3. Aplicación del campo eléctrico

Durante el experimento se fijó la tensión en 23  $V_{pp}$  y se varió la frecuencia desde 1 Hz hasta 10 MHz y no se observó caída de tensión entre electrodos.

Instancia	Células/ml	Viabilidad(%)
1	1.025.000	77
2	950.000	80
3	515.000	52

Tabla 4: Se muestran los conteos de viabilidad celular en las tres instancias marcadas en el protocolo de la sección "Preparación de la muestra" (5.2). La segunda columna corresponde a la estimación de células (vivas y muertas) por mililitro. La última columna es la razón de células vivas sobre las células totales. Este resultado indica la correcta aislación entre los paneles de cobre.

No se pudo visualizar el fenómeno dielectroforético en células vivas debido a la elección de calceína como tintura del medio. Como se mencionó en la sección "Tintas" (6.2.2) la calceína es impermeable en células vivas y se esperaba visualizar al medio teñido de verde y a las células como figuras negras. Sin embargo se observó el ingreso de burbujas que rodearon a las células vivas, distorsionando el fenómeno de dielectroforesis (ver figura 38).



Figura 38: Se observan tres células Jurkat marcadas con flechas rojas. La impermeabildad de las células a la calceína provocan el ingreso de burbjas al canal microfluídico.

Sin embargo se pudo observar en un caso que unas células fueron agrupadas en el centro. Se cree que eran células muertas ya que el contraste con la calceína era muy bajo y no se pudieron tomar fotos que se apreciara la ocurrencia del fenómeno. En este caso se utilizó un flujo de 1  $\mu L$ , para facilitar la visualización de la célula se podría bajar el flujo.

#### 6.3.1. Mejoras a futuro

Como se mencionó en el sección "Tintas" (6.2.2) se puede eliminar el uso de calceína y oprtar por un fluoróforo para identificar la célula. Esto no solo mejoraría la visualización sino también las condiciones del medio, aumentando la viabilidad celular.

Otro problema que se trató en las secciones 6.2.2 y 6.2.3 es la obstrucción del canal. Con las mejoras introducidas en los apartados se pudo mejorar la condición del canal pero todavía no se pudieron eliminar contaminaciones introducidas por la tinta tóner o el marcador indeleble en el momento del "wet-etching" del cobre (ver figura 39)



Figura 39: Se muestran manchas de toner sobre el canal microfluídico y las líneas divisorias marcadas con flechas rojas.

Para evitar este tipo de contaminaciones como primera medida se puede eliminar el paso de remarcado del diseño con marcador indeleble. Además se puede introducir un paso de inmersión en un solvente que remueva la tinta tóner, como por ejemplo la MEK. Adicionalmente, como se mencionó en la sección "Resolución" (6.1.4) se puede utilizar otra técnica de microfabricación de PCBs que se adecúe a las necesidades del desarrollo, eliminando la tinta tóner del proceso.

Por último, para evitar el problema del contacto de la muestra con electrodos de cobre, se propone realizar un revestimiento ("coating") de la placa de cobre con PDMS mediante "spin-coating". Esto no solo mejoraría la viabilidad celular sino también que aportaría a eliminar contaminaciones en el canal microfluídico. En comparación con el FR-4, el PDMS es un material menos irregular y por ende se baja el riesgo de agentes contaminantes.

# 7. Conclusión

Se propuso una nueva técnica de microfabricación de dispositivos DEP. La misma se basa en las técnicas de microfabricación de circuitos electrónicos ("Lab-on-a-PCB"). En el trabajo se aplicó la técnica de "toner-transfer" pero los resultados y las discusiones sirven para cualquier técnica de fabricación de PCB.

Además se demostró satisfactoriamente una nuevo método de ensamblaje entre PCB y PDMS. El mismo consiste en un sistema de tornillos y tuercas que permiten sellar al canal microfluídico ejerciendo el torque apropiado. Al ser altamente dependiente del usuario se propone para fabricación rápida de prototipos microfluídicos. Luego se podría fabricar el diseño final con técnicas de microfabricación más exigentes.

El bajo costo y la simplicidad del equipamiento hacen que esta técnica de microfabricación de electrodos que, a su vez, conformen los canales microfluídicos sea atractiva para laboratorios académicos.

A pesar de que no se pudo visualizar óptimamente el fenómeno DEP en el dispositivo fabricado la fortaleza del trabajo reside en la versatilidad de la técnica de microfabricación. La misma no solo puede utilizarse para la fabricación de dispositivos DEP con distintas aplicaciones ("trapping", "focusing", separación celular, etc) sino que también puede utilizarse cualquier otro fenómeno que precise de microelectrodos inmersos en el canal microfluídico. Así se podrían fabricar dispositivos que utilicen electrodos activos (como en la electroforesis) o electrodos pasivos para biosensores electroquímicos. Adicionalmente, como alternativa, los patrones de cobre se podrían usar como moldes para generar canales microfluídicos en PDMS. Por úlitmo, se propusieron diversas mejoras para el perfeccionamiento de la técnica de fabricación de microelectrodos, así como mejoras para realizar el experimento dielectroforético.

# 8. Anexo

Se entregó digitalmente una carpeta nombrada "Anexo". Dicha carpeta contiene:

- Tabla comparativa de técnicas de microfabricación de dispositivos DEP extraída de [9].
- el protocolo de tinción de Dil Vybrant proveído por Invitrogen [51].

# Referencias

- George M Whitesides. The origins and the future of microfluidics. Nature, 442(7101):368, 2006.
- [2] Yuksel Temiz, Robert D Lovchik, Govind V Kaigala, and Emmanuel Delamarche. Lab-on-a-chip devices: How to close and plug the lab? *Microelectronic Engineering*, 132:156–175, 2015.
- [3] H Pohl et al. The behavior of neutral matter in nonuniform electric fields. *Cambridge University Press, Cambridge*, 1978.
- [4] Hywel Morgan and Nicolas G Green. AC electrokinetics. Research Studies Press, 2003.
- [5] Ming Li, WH Li, Jun Zhang, Gursel Alici, and Weijia Wen. A review of microfabrication techniques and dielectrophoretic microdevices for particle manipulation and separation. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 47(6):063001, 2014.
- [6] Thomas B Jones and Thomas Byron Jones. *Electromechanics of particles*. Cambridge University Press, 2005.

- [7] Ying Huang, Ralph Holzel, Ronald Pethig, and Xiao-B Wang. Differences in the ac electrodynamics of viable and non-viable yeast cells determined through combined dielectrophoresis and electrorotation studies. *Physics in medicine and biology*, 37(7):1499, 1992.
- [8] CY Yang and U Lei. Quasistatic force and torque on ellipsoidal particles under generalized dielectrophoresis. *Journal of Applied Physics*, 102(9):094702, 2007.
- [9] Rodrigo Martinez-Duarte. Microfabrication technologies in dielectrophoresis applications—a review. *Electrophoresis*, 33(21):3110–3132, 2012.
- [10] Stefan Fiedler, Stephen G Shirley, Thomas Schnelle, and Günter Fuhr. Dielectrophoretic sorting of particles and cells in a microsystem. Analytical chemistry, 70(9):1909–1915, 1998.
- [11] Joel Voldman, Martha L Gray, Mehmet Toner, and Martin A Schmidt. A microfabrication-based dynamic array cytometer. *Analytical chemistry*, 74(16):3984–3990, 2002.
- [12] Aytug Gencoglu and Adrienne Minerick. Chemical and morphological changes on platinum microelectrode surfaces in ac and dc fields with biological buffer solutions. *Lab on a Chip*, 9(13):1866–1873, 2009.
- [13] Kidong Park, Ho-Jun Suk, Demir Akin, and Rashid Bashir. Dielectrophoresis-based cell manipulation using electrodes on a reusable printed circuit board. Lab on a Chip, 9(15):2224–2229, 2009.
- [14] Larry J Millet, Kidong Park, Nicholas N Watkins, K Jimmy Hsia, and Rashid Bashir. Separating beads and cells in multi-channel microfluidic devices using dielectrophoresis and laminar flow. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (48), 2011.
- [15] Holger Becker. All i want for christmas.... Lab on a Chip, 11(9):1571– 1573, 2011.
- [16] Ciprian Iliescu, Guo Lin Xu, Victor Samper, and Francis EH Tay. Fabrication of a dielectrophoretic chip with 3d silicon electrodes. *Journal* of Micromechanics and Microengineering, 15(3):494, 2004.

- [17] Soumya K Srivastava, Aytug Gencoglu, and Adrienne R Minerick. Dc insulator dielectrophoretic applications in microdevice technology: a review. Analytical and bioanalytical chemistry, 399(1):301–321, 2011.
- [18] Hadi Shafiee, John L Caldwell, Michael B Sano, and Rafael V Davalos. Contactless dielectrophoresis: a new technique for cell manipulation. *Biomedical microdevices*, 11(5):997, 2009.
- [19] Hadi Shafiee, Michael B Sano, Erin A Henslee, John L Caldwell, and Rafael V Davalos. Selective isolation of live/dead cells using contactless dielectrophoresis (cdep). Lab on a Chip, 10(4):438–445, 2010.
- [20] Nicolas Demierre, Thomas Braschler, Pontus Linderholm, Urban Seger, Harald Van Lintel, and Philippe Renaud. Characterization and optimization of liquid electrodes for lateral dielectrophoresis. *Lab on a Chip*, 7(3):355–365, 2007.
- [21] Nicolas Demierre, Thomas Braschler, R Muller, and Philippe Renaud. Focusing and continuous separation of cells in a microfluidic device using lateral dielectrophoresis. Sensors and Actuators B: Chemical, 132(2):388–396, 2008.
- [22] Pei Yu Chiou, Aaron T Ohta, and Ming C Wu. Massively parallel manipulation of single cells and microparticles using optical images. *Nature*, 436(7049):370, 2005.
- [23] Wonjae Choi, Se-Hwan Kim, Jin Jang, and Je-Kyun Park. Lab-on-adisplay: a new microparticle manipulation platform using a liquid crystal display (lcd). *Microfluidics and Nanofluidics*, 3(2):217–225, 2007.
- [24] Rodrigo Martinez-Duarte, Robert A Gorkin III, Kameel Abi-Samra, and Marc J Madou. The integration of 3d carbon-electrode dielectrophoresis on a cd-like centrifugal microfluidic platform. *Lab on a Chip*, 10(8):1030– 1043, 2010.
- [25] Rodrigo Martinez-Duarte, Philippe Renaud, and Marc J Madou. A novel approach to dielectrophoresis using carbon electrodes. *Electrophoresis*, 32(17):2385–2392, 2011.
- [26] Maria del Carmen Jaramillo, Eduard Torrents, Rodrigo Martínez-Duarte, Marc J Madou, and Antonio Juárez. On-line separation of

bacterial cells by carbon-electrode dielectrophoresis. *Electrophoresis*, 31(17):2921–2928, 2010.

- [27] Ju-Hee So and Michael D Dickey. Inherently aligned microfluidic electrodes composed of liquid metal. Lab on a Chip, 11(5):905–911, 2011.
- [28] Xize Niu, Mengying Zhang, Suili Peng, Weijia Wen, and Ping Sheng. Real-time detection, control, and sorting of microfluidic droplets. *Bio-microfluidics*, 1(4):044101, 2007.
- [29] Khashayar Khoshmanesh, Sara Baratchi, Francisco J Tovar-Lopez, Saeid Nahavandi, Donald Wlodkowic, Arnan Mitchell, and Kourosh Kalantar-Zadeh. On-chip separation of lactobacillus bacteria from yeasts using dielectrophoresis. *Microfluidics and nanofluidics*, 12(1-4):597–606, 2012.
- [30] Ronald Pethig, Ying Huang, Xiao-Bo Wang, and Julian PH Burt. Positive and negative dielectrophoretic collection of colloidal particles using interdigitated castellated microelectrodes. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 25(5):881, 1992.
- [31] Héctor Moncada-Hernández and Blanca H Lapizco-Encinas. Simultaneous concentration and separation of microorganisms: insulator-based dielectrophoretic approach. Analytical and bioanalytical chemistry, 396(5):1805–1816, 2010.
- [32] Torsten Müller, Gabriele Gradl, Steffen Howitz, S Shirley, Th Schnelle, and Günter Fuhr. A 3-d microelectrode system for handling and caging single cells and particles. *Biosensors and Bioelectronics*, 14(3):247–256, 1999.
- [33] Junjie Zhu and Xiangchun Xuan. Dielectrophoretic focusing of particles in a microchannel constriction using dc-biased ac flectric fields. *Elec*trophoresis, 30(15):2668–2675, 2009.
- [34] P Sajeesh and Ashis Kumar Sen. Particle separation and sorting in microfluidic devices: a review. *Microfluidics and nanofluidics*, 17(1):1– 52, 2014.
- [35] Haibo Li and Rashid Bashir. Dielectrophoretic separation and manipulation of live and heat-treated cells of listeria on microfabricated devices with interdigitated electrodes. Sensors and Actuators B: Chemical, 86(2):215–221, 2002.

- [36] Xiaoguang Lin, Jie Yao, Hua Dong, and Xiaodong Cao. Effective cell and particle sorting and separation in screen-printed continuous-flow microfluidic devices with 3d sidewall electrodes. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 55(51):13085–13093, 2016.
- [37] Joel Voldman. Electrical forces for microscale cell manipulation. Annu. Rev. Biomed. Eng., 8:425–454, 2006.
- [38] Francis EH Tay, Liming Yu, Ah Ju Pang, and Ciprian Iliescu. Electrical and thermal characterization of a dielectrophoretic chip with 3d electrodes for cells manipulation. *Electrochimica acta*, 52(8):2862–2868, 2007.
- [39] Antonio Ramos, Hywel Morgan, Nicolas G Green, and A Castellanos. Ac electrokinetics: a review of forces in microelectrode structures. *Journal* of Physics D: Applied Physics, 31(18):2338, 1998.
- [40] Chandra M Das, Frederick Becker, Suzanne Vernon, Jamileh Noshari, Celine Joyce, and Peter RC Gascoyne. Dielectrophoretic segregation of different human cell types on microscope slides. *Analytical chemistry*, 77(9):2708–2719, 2005.
- [41] Ahmet C Sabuncu, Anthony J Asmar, Michael W Stacey, and Ali Beskok. Differential dielectric responses of chondrocyte and jurkat cells in electromanipulation buffers. *Electrophoresis*, 36(13):1499–1506, 2015.
- [42] L Altomare, M Borgatti, G Medoro, N Manaresi, M Tartagni, R Guerrieri, and R Gambari. Levitation and movement of human tumor cells using a printed circuit board device based on software-controlled dielectrophoresis. *Biotechnology and bioengineering*, 82(4):474–479, 2003.
- [43] Nitzan Gadish and Joel Voldman. High-throughput positivedielectrophoretic bioparticle microconcentrator. Analytical chemistry, 78(22):7870–7876, 2006.
- [44] Qiang Chen, Gang Li, Yuan Nie, Shuhuai Yao, and Jianlong Zhao. Investigation and improvement of reversible microfluidic devices based on glass-pdms-glass sandwich configuration. *Microfluidics and nanofluidics*, 16(1-2):83–90, 2014.
- [45] Dengke Cai. Optical and mechanical aspects on polysiloxane based electrical-optical-circuits-board. PhD thesis, 2008.
- [46] Letícia S Shiroma, Maria HO Piazzetta, Gerson F Duarte-Junior, Wendell KT Coltro, Emanuel Carrilho, Angelo L Gobbi, and Renato S Lima. Self-regenerating and hybrid irreversible/reversible pdms microfluidic devices. *Scientific reports*, 6:26032, 2016.
- [47] Módluo de young de pmma. http://www.mit.edu/~6.777/matprops/ pmma.htm.
- [48] Módluo de young de pc y pet. http://www.engineeringtoolbox.com/ young-modulus-d\_417.html.
- [49] Ahmet C Sabuncu, Jie Zhuang, Juergen F Kolb, and Ali Beskok. Microfluidic impedance spectroscopy as a tool for quantitative biology and biotechnology. *Biomicrofluidics*, 6(3):034103, 2012.
- [50] Mycroscopyu. http://web.archive.org/web/20080207010024/http: //www.808multimedia.com/winnt/kernel.htm.
- [51] Dil vynrant, thermo fisher. https://www.thermofisher.com/order/ catalog/product/V22885.
- [52] Calceína am, thermo fisher. https://www.thermofisher.com/order/ catalog/product/C1430.
- [53] R Pethig and MS Talary. Dielectrophoretic detection of membrane morphology changes in jurkat t-cells undergoing etoposide-induced apoptosis. *Iet Nanobiotechnology*, 1(1):2–9, 2007.
- [54] Yulia Polevaya, Irina Ermolina, Michael Schlesinger, Ben-Zion Ginzburg, and Yuri Feldman. Time domain dielectric spectroscopy study of human cells: Ii. normal and malignant white blood cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1419(2):257–271, 1999.
- [55] Ahmet C Sabuncu and Ali Beskok. A separability parameter for dielectrophoretic cell separation. *Electrophoresis*, 34(7):1051–1058, 2013.