



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO  
EN ELECTROQUIMICA



---

**“SOLUCIÓN AL PROBLEMA DE FUGA EN  
CELDAS ELECTROQUÍMICAS MICROFLUÍDICAS  
MEDIANTE LA VARIACIÓN DEL ANCHO DEL  
ELECTRODO”**

TESIS PRESENTADA POR:

**(I.Q.) CARLOS LUIS GONZÁLEZ GALLARDO**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRÍA EN ELECTROQUÍMICA**

**ENERO, 2019**

# Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica

REALIZADO POR:

**I.Q. Carlos Luis González Gallardo**

DIRIGIDA POR

**Dr. Jannú Ricardo Casanova Moreno**

## SINODALES

**Dr. Abraham Ulises Chávez Ramírez**  
Presidente

---

Firma

**Dr. Francisco Mherande Cuevas Muñiz**  
Secretario

---

Firma

**Dr. José Luis García Cordero**  
Vocal

---

Firma

**Dr. José Luis Herrera Celis**  
Suplente

---

Firma

## RESUMEN

---

El poli(dimetilsiloxano) (PDMS) ha sido uno de los polímeros más activamente usados para la microfluídica, el cual sella irreversiblemente después de que se expone al plasma de aire. El problema radica en su uso en la fabricación de celdas electroquímicas microfluídicas. Los electrodos de oro son inertes al plasma de aire, lo que provoca fugas en la interfase PDMS/oro de la celda, afectando los datos obtenidos en experimentos de detección electroquímica. Otro problema debido a las fugas es que el electrolito se estanca, y al utilizar otro electrolito diferente, contamina la solución, dando mediciones no deseadas si se quiere controlar el pH.

En este trabajo se describe el diseño, fabricación y caracterización de celdas electroquímicas microfluídicas, donde se estudió el efecto que tiene el ancho del conector del electrodo en la presión de fuga. En los experimentos de prueba de fuga se observó que los conectores de 4  $\mu\text{m}$  soportan una presión de 238 kPa. Este resultado es comparable a los dispositivos microfluídicos fabricados con PDMS-vidrio sellados con plasma y que no tienen electrodos, los cuales tienen rango de presión de fuga de 205 a 345 kPa.

Se estudió el efecto de la deformación del PDMS en la presión de fuga mediante simulación, para observar su comportamiento al variar el ancho de la interfase PDMS/oro. Los resultados arrojaron que al comparar la curva experimental y la curva de simulación tienen una tendencia similar, por lo que la presión de fuga está ligada a la deformación de PDMS.

Se evaluaron las celdas electroquímicas microfluídicas fabricadas con diferentes anchos de conector mediante un analito modelo. Los resultados arrojaron que los conectores de 4  $\mu\text{m}$  son la mejor opción para la fabricación de celdas electroquímicas microfluídicas debido a que la caída óhmica debido al conector es despreciable.

## ABSTRACT

---

Poly (dimethylsiloxane) (PDMS) has been one of the most actively used polymers for microfluidics, which seals irreversibly after it is exposed to the air plasma. The problem lies in its use in the fabrication of microfluidic electrochemical cells. The metal electrodes (e.g. gold) are inert to the air plasma, which causes leakage in the PDMS/gold interface of the cell, affecting the data obtained in electrochemical detection experiments. Another problem due to leaks is that the electrolyte stagnates, and when using another different electrolyte, it contaminates the solution, giving unwanted measurements if you want to control the pH.

This work describes the design, manufacture and characterization of microfluidic electrochemical cells, where the effect of the width of the electrode connector on the leakage pressure was studied. In the leak test experiments, it was observed that the 4  $\mu\text{m}$  connectors support a pressure of 238 kPa. This result is comparable to the microfluidic devices manufactured with PDMS-glass sealed with plasma and they don't have electrodes, which have leakage pressure ranging from 205 to 345 kPa.

The effect of the PDMS deformation on the leakage pressure was studied by simulation, to observe its behavior when varying the width of the PDMS/gold interface. The results showed that when comparing the experimental curve and the simulation curve they have a similar tendency, so the leakage pressure is linked to the deformation of PDMS.

Microfluidic electrochemical cells manufactured with different connector widths were evaluated by a model analyte. The results showed that the 4  $\mu\text{m}$  connectors are the best option for the fabrication of microfluidic electrochemical cells because the ohmic drop due to the connector is negligible.



**Este trabajo fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica (CIDETEQ), bajo la dirección**

**Dr. Jannú Ricardo Casanova Moreno**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecimientos al CONACYT por la beca proporcionada para realizar mis estudios de maestría en electroquímica en CIDETEQ.

Al CIDETEQ por la oportunidad otorgada para realizar mis estudios en maestría en electroquímica.

A mi familia por el apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida y poder cumplir mis metas profesionales.

A mi asesor, el Dr. Jannú Ricardo Casanova Moreno por su guía y paciencia proporcionada en este proyecto.

A mis sinodales, el Dr. Francisco Mherande Cuevas Muñiz, el Dr. Abraham Ulises Chávez Ramírez y el Dr. José Luis García Cordero por la aportación de conocimientos y visión crítica en este trabajo.

A mis amigos Francy, Oscar, Jan-carlo, Isaac, Alex, gracias por su apoyo y hacer que mi estancia en CIDETEQ sea más amena.

A mis compañeros de SEQE y maestría, Pine, Alonso, Alex, Miguel, Oscar V., Víctor, Jesús, Marcos, Trini, Lety, gracias por todo.

Al CONACYT por el apoyo financiero otorgado para el desarrollo de esta investigación a través del proyecto LN-293442 del Laboratorio Nacional de Micro y Nanofluídica.

# TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	ii
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	v
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.2 JUSTIFICACIÓN .....	3
1.1 HIPÓTESIS.....	3
1.3 OBJETIVO.....	3
1.3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
<b>CAPÍTULO 2: ANTECEDENTES</b> .....	5
2.1 Introducción .....	5
2.2 Electroquímica.....	5
2.2.1 Técnicas Electroquímicas.....	6
2.2.2 Caída Óhmica .....	8
2.2.3 Microelectrodos .....	10
2.3 Simulación numérica .....	12
2.4 Microfluídica.....	14
2.4.1 Microfabricación .....	15
2.5 Integración de la Microfluídica y la Electroquímica .....	16
2.6 Problemas de fugas .....	17
<b>CAPÍTULO 3: DISEÑO Y FABRICACIÓN DEL DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO</b> .....	21
3.1. Diseño .....	21
3.2. Fotolitografía.....	23
3.2.1. Fabricación de electrodos.....	23
3.2.1.1 Resultados.....	24
3.2.2. Fabricación de canales .....	25
3.2.1.1 Resultados.....	26
3.3. Depósito por evaporación por haz de electrones .....	28
3.4. Método de Sellado con Plasma.....	30
3.4.1. Limpieza de sustratos .....	30
3.4.2. Preparación de polidimetilsiloxano.....	30
3.4.3. Sellado con Plasma.....	32

<b>CAPÍTULO 4: PRUEBA DE FUGA</b> .....	33
<b>4.1 Microscopía de Fluorescencia</b> .....	33
<b>4.2. Acoplamiento del Microscopio de Fluorescencia y el Equipo de Control Microfluídico</b> .....	35
<b>4.3 Medición de Presión de fuga</b> .....	36
<b>4.3.1 Resultados y Discusión</b> .....	41
<b>4.4 Simulación de la caída de presión</b> .....	47
<b>4.4.1 Resultados y Discusión</b> .....	47
<b>4.5 Simulación de la deformación del polidimetilsiloxano</b> .....	50
<b>4.5.1 Resultados y Discusión</b> .....	52
<b>CAPÍTULO 5: EVALUACIÓN ELECTROQUÍMICA</b> .....	58
<b>5.1. Diseño en software</b> .....	58
<b>5.2 Fabricación de electrodos</b> .....	59
<b>5.3. Fabricación de canales</b> .....	59
<b>5.4. Sellado con Plasma</b> .....	59
<b>5.5 Fabricación de electrodos de pseudoreferencia de Ag/AgCl</b> .....	60
<b>5.6 Resultados y Discusión</b> .....	62
<b>5.6.1 Celda electroquímica macroscópica</b> .....	62
<b>5.6.2 Cálculo de resistencia del oro</b> .....	65
<b>5.6.3 Cálculo de la caída óhmica</b> .....	66
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	74
<b>6.1 Trabajo a Futuro</b> .....	75
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	77



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

- Figura 2. 1. Esquema de una celda electroquímica de tres electrodos. .... 6
- Figura 2. 2. a) La especie O está inactiva a  $E_1$ , pero se reduce a una velocidad de limitada por difusión a  $E_2$ , b) Gráfica de corriente vs tiempo característica de la cronoamperometría..... 6
- Figura 2. 3. Gráficas representativas de la técnica de cronopotenciometría, donde  $\tau$  es el tiempo de transición, que transcurre desde el inicio del pulso hasta el cambio pronunciado de potencial, por el agotamiento de la especie electroactiva en la interfase..... 7
- Figura 2. 4. a) Barrido de potencial cíclico, b) Voltamperograma cíclico. La especie A está equilibrio electroquímico en la superficie del electrodo ( $A + e \rightleftharpoons A \cdot -$ )..... 8
- Figura 2. 5. Voltamperometría cíclica de  $K_3[Fe(CN)_6]$  0.6 mM en KCl 0.1 M en ausencia (rojo) y en presencia (azul) de una resistencia de 100  $\Omega$  conectada en serie entre el potenciostato y el electrodo de trabajo. .... 9
- Figura 2. 6. Difusión (indicada con flechas) planar característico en electrodos convencionales (a) y difusión radial característica de los microelectrodos (b).. .... 11
- Figura 2. 7. Voltamperogramas simulados de un microelectrodo de 4  $\mu m$  de radio a diferentes velocidades de barrido. a) 100 mV/s; b)200 mV/s; c) 2 V/s..... 12
- Figura 2. 8. Esquema de la técnica de volumen de control alrededor de un nodo (centroide de la celda)..... 13
- Figura 2. 9. Representación de la unión entre PDMS/vidrio y la ausencia de esta en la interfase PDMS/oro. La línea roja representa la zona de fuga. .... 18
- Figura 2. 10. Representación de una superficie de sílice recubierta con 3-MPTS unida con oro..... 19
- Figura 2. 11. Formación de carboxil-amina entre TMS-EDTA Y 3-APTMS..... 20

### CAPÍTULO 3

- Figura 3. 1. Esquema en 3D del dispositivo de prueba de fuga a fabricar..... 21

Figura 3. 2. Diseños de los dispositivos de prueba, en negro las estructuras de oro, en rojo los canales. ....	22
Figura 3. 3. Diseño de prueba (a) Completo (b) Parte del diseño donde los anchos de estructura y espaciado entre las mismas van de 1 a 10 $\mu\text{m}$ .....	23
Figura 3. 4. Imágenes del diseño de prueba expuesto a 6 mW con diferentes tiempos de exposición (a) 50%, (b) 60%, (c) 70%.....	24
Figura 3. 5. Imágenes del diseño de prueba expuesto a 7mW con diferentes tiempos de exposición (a) 50%, (b) 60%, (c) 70%.....	25
Figura 3. 6. Imágenes del diseño de prueba expuesto a: (a) 20 mW 50% 1x4, (b) 20 mW 50% 2x4, (c) 30 mW 50% 1x4.....	27
Figura 3. 7. Proceso de lift-off para la fabricación de las estructuras de oro. El titanio se representa en gris y el oro en amarillo. ....	28
Figura 3. 8. Estructuras de oro fabricadas con la técnica de lift-off. ....	29
Figura 3. 9. Perfilometría del grosor de las estructuras fabricadas mediante el depósito por evaporación por haz de electrones.....	29
Figura 3. 10. Proceso de litografía suave para la fabricación de los canales en PDMS.....	30
Figura 3. 11. Proceso de fabricación de los canales. ....	31
Figura 3. 12. Perfilometría de la profundidad de los canales hechos con PDMS.31	
Figura 3. 13. Dispositivo fabricado para las pruebas de fuga. Se inyectó un colorante para hacer visibles los canales.....	32

## **CAPÍTULO 4**

Figura 4. 1. Diagrama de Jablonski.. ....	33
Figura 4. 2. Espectro de fluorescencia de la fluoresceína (FITC).....	34
Figura 4. 3. Funcionamiento del microscopio de fluorescencia. ....	34
Figura 4. 4. a) Dispositivo de prueba con salida sellada. b) Montaje del dispositivo en el soporte.....	35
Figura 4. 5. Estación de trabajo para medición de presión de fugas. ....	35
Figura 4. 6. Captura de pantalla del software Oculus. ....	36
Figura 4. 7. Captura de pantalla de referencia de referencia.....	37

Figura 4. 8. Captura de pantalla del software ImageJ .....	38
Figura 4. 9. Estructura de oro de 770 $\mu\text{m}$ de ancho. a) sin valor umbral b) con umbral.....	39
Figura 4. 10. Fuga de fluoresceína a través del electrodo. a) sin valor umbral b) con umbral.....	40
Figura 4. 11. Estructura de oro de 770 $\mu\text{m}$ . a) campo claro, b), c) y d) imágenes de fluorescencia a presiones de 20.52, 35.10 y 60.21 kPa, respectivamente. Imágenes obtenidas del microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti-U.....	41
Figura 4. 12. Estructura de oro de 4 $\mu\text{m}$ . a) campo claro, b), c) y d) imágenes de fluorescencia a presiones de 161.22, 222.24 y 242.76 kPa, respectivamente. Imágenes obtenidas del microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti-U.....	42
Figura 4. 13. Experimentos de presión de fuga con anchos de electrodo de 4 a 770 $\mu\text{m}$ .....	46
Figura 4. 14. Modelo del sistema en el que se realizan las pruebas de fuga. ....	48
Figura 4. 15. Fluido desplazando la burbuja de aire. a) posición inicial b) posición final c) distancia recorrida. En líneas punteadas está el canal. ....	49
Figura 4. 16. Perfiles de presión a través del sistema. ....	49
Figura 4. 17. a) Sección longitudinal del dispositivo de prueba. b) Esquema simplificado de la vista longitudinal del dispositivo de prueba de fuga. En rojo la pieza de PDMS que se tomó como modelo para la simulación, la línea punteada representa la deformación del PDMS.....	51
Figura 4. 18. Modelo de la pieza de PDMS: la línea roja el dominio 1 representa la interfase PDMSoro, la línea azul del dominio 2 representa la interfase PDMS/vidrio.....	51
Figura 4. 19. Deformación del PDMS en la interfase PDMS/oro, con un ancho de 4 $\mu\text{m}$ , aplicando presiones de a) 100 kPa y b) 250 kPa. ....	53
Figura 4. 20. Deformación del PDMS en la interfase PDMS/oro, con un ancho de 754 $\mu\text{m}$ , aplicando presiones de a) 100 kPa y b) 250 kPa. ....	54
Figura 4. 21. Variación de la deformación del PDMS con respecto a la presión aplicada.....	55

Figura 4. 22. Interpolación de las gráficas de variación de la deformación del PDMS con respecto a la presión aplicada a un valor de deformación arbitrario de 0.85 $\mu\text{m}$ (línea punteada). .....	56
Figura 4. 23. Gráfica obtenida de la simulación de la deformación de 0.8 $\mu\text{m}$ PDMS.....	57

## CAPÍTULO 5

Figura 5. 1. Diseño de la celda electroquímica, en negro los electrodos y en rojo los canales, para la fabricación de las celdas electroquímicas .....	58
Figura 5. 2. Celdas electroquímicas microfluídicas utilizadas para los experimentos.....	59
Figura 5. 3. Imagen del electrodo con conector de 40 $\mu\text{m}$ . La línea roja es el área del electrodo.....	60
Figura 5. 4. Electrodo de referencia. a) sin depósito, b) Depósito de Ag, c) Formación de AgCl. Imágenes obtenidas del microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti-U.....	61
Figura 5. 5. Celda electroquímica macroscópica para la reacción redox de ferri/ferrocianuro de potasio. Electrodo de trabajo de oro, electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl saturado, contraelectrodo de oro.....	62
Figura 5. 6. Voltamperometría Cíclica de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0.002 M en KCl 3 M a diferentes velocidad de barrido, electrodo de trabajo de oro.....	63
Figura 5. 7. Gráfica de la corriente de pico en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido del voltamperograma cíclico de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0.002 M en KCl 3 M, electrodo de trabajo de oro.....	64
Figura 5. 8. Diferencia de pico de los potenciales anódicos y catódicos a velocidades de barrido de 100, 200, 300, 400 y 500 mV/s, en una celda macroscópica. ....	65
Figura 5. 9. Cálculo de la resistencia del oro a partir de la curva de potencial vs corriente.....	66

Figura 5. 10. Voltamperometría Cíclica de $K_3[Fe(CN)_6]$ 0.002 M en KCl 3 M a una velocidad de barrido de 100 mV/s, electrodo de trabajo de oro con diferentes anchos de conector.....	67
Figura 5. 11. Caída Óhmica calculada a diferentes anchos de conector.....	68
Figura 5. 12. Diferencia de potencial de pico, $\Delta E_p$ , a diferentes velocidades de barrido, obtenidos de los voltamperogramas de $K_3[Fe(CN)_6]$ 0.002 M en KCl 3 M con diferentes anchos de conector. a) comparación de electrodos con conectores de 20 a 50 $\mu m$ con un electrodo convencional, b) Comparación de electrodos con conectores de 100 a 400 $\mu m$ con un electrodo convencional.....	70
Figura 5. 13. Diferencia de potencial de pico, $\Delta E_p$ , para cada ancho de conector a una velocidad de barrido de 500 mV/s. En amarillo la incertidumbre del $\Delta E_p$ de la celda macroscópica.....	72

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Los términos "Lab-on-a-Chip" y "Micro Total Analysis System" ( $\mu$ -TAS) son sinónimos que se usan para definir los dispositivos que utilizan fluidos como medio de trabajo e integran una serie de diferentes funcionalidades a pequeña escala. Las más importantes de estas funcionalidades son la preparación y transporte de muestras, la separación y la detección.[1, 2] La microfluídica es la ciencia y la ingeniería de sistemas en el que el comportamiento del fluido, debido a la pequeña escala de los sistemas Lab-on-a-Chip y  $\mu$ -TAS, difiere de los macrosistemas.[3] La microfluídica es una rama comparativamente nueva de la ciencia y la tecnología en la que se han hecho progresos considerables en los últimos 10-15 años.[1, 2]

La principal ventaja de la microfluídica es la utilización de su escala para nuevos efectos y un mejor rendimiento. Estas ventajas se derivan de la cantidad microscópica de fluido que puede manejar un dispositivo microfluídico. Independientemente del tamaño de la instrumentación circundante y del material del que está hecho el dispositivo, sólo se miniaturiza el espacio en el que se procesa el fluido. La miniaturización de todo el sistema, aunque a menudo beneficioso, no es un requisito de un sistema microfluídico. La cantidad de líquido es la cuestión clave en la microfluídica.[4] La miniaturización de los dispositivos, por ejemplo, los microchips que se utilizan para electroforesis capilar tienen grandes ventajas, tales como la disminución del consumo de muestra y reactivos, reducción de costo (particularmente en el caso de dispositivos desechables), incremento en la portabilidad, y tiempos de análisis más rápidos.[4, 5]

En los últimos años, se ha aceptado generalmente que se necesitan métodos analíticos a gran escala y de alto rendimiento en diversas aplicaciones, especialmente en los campos de la genómica y la proteómica.[3] Esta afirmación también se aplica fuertemente al campo farmacéutico, donde estas cuestiones analíticas desempeñan un papel importante también en lo que respecta a la química combinatoria y el descubrimiento de fármacos.[6] Por otra parte, las nuevas

aplicaciones que utilizan la microfluídica para el suministro de energía, y producción de productos químicos son prometedoras.[7]

Entre todas las técnicas analíticas acopladas con la microfluídica, la detección electroquímica es la más simple de integrar, lo que la hace ideal para aplicaciones en el punto de atención.[8] La integración de la detección electroquímica con microcanales se remonta a los primeros días de microfluídica cuando los microcanales se utilizaban principalmente para separaciones por electroforesis. Originalmente, se usaron métodos de detección amperométricos para separaciones para tales aplicaciones, que fue seguido por la incorporación de métodos voltamperométricos para detectar una variedad de analitos orgánicos e inorgánicos. Típicamente, los sistemas de microfluidos que incorporan detección electroquímica se implementan mediante un patrón de electrodos en un sustrato de vidrio plano o silicio, y luego se adhiere a éste una pieza basada en polímero (polodimetilsiloxano) que lleva microcanales por el método de plasma.[9]

Sin embargo, el problema radica en el sellado de estos dispositivos microfluídicos, ya que, electrodos basados en oro son inertes al método de sellado de plasma y no forman enlaces siloxano con el polidimetilsiloxano (PDMS), como en el caso de las interfases PDMS-vidrio. Esto conlleva una caída del rendimiento del dispositivo microfluídico en la detección electroquímica.[10]

Para resolver éste problema, se han estudiado varios métodos, como el uso de una capa  $\text{SiO}_2$ , [10] y modificando las superficies de los sustratos con 3-aminopropiltrimetoxisilano (3-APTMS) y ácido N - [(3-trimetoxisilil)propil]-etilen-diamina triacético (TMS-EDTA). [11] Para una explicación más detallada, ver la sección 2.6.

Se ha estudiado la resistencia a la fuga en dispositivos con electrodos de oro con un ancho de 500-770  $\mu\text{m}$ , los cuales están modificados con TMS-EDTA, mientras que las placas de PMDS son modificadas con 3-APTMS. Estos dispositivos

resistieron una presión de 37 kPa, en comparación a los 1 kPa de los dispositivos que utilizan el sellado por plasma sin la estrategia de carboxilamina.[12]

## **1.2 JUSTIFICACIÓN**

Los dispositivos microfluídicos pueden reducir costos, su pequeño tamaño permite su portabilidad una alta velocidad de análisis, y la necesidad de bajos volúmenes de muestra.

En anteriores publicaciones se ha reportado el sellado de microchips con el sistema PDMS/oro/vidrio usando la técnica de modificación por plasma; en algunos casos no reportan problemas de fuga, y en otros sí. Esto es un problema para los grupos de investigación que deseen fabricar celdas electroquímicas microfluídicas, donde encontrarán problemas de fugas y necesitan un método que permita resolver este problema. El ancho de conector del electrodo puede ser un factor determinante utilizando el método de plasma, debido a que alrededor del electrodo hay una fuerza de enlace covalente muy fuerte en la interfase PDMS-vidrio, y esto permita ayudar a resistir presiones más altas a lo reportado en la literatura.

## **1.1 HIPÓTESIS**

La reducción del ancho de los conectores de los electrodos permitirá fabricar dispositivos electroquímicos microfluídicos que soporten presiones mayores a 37 kPa (cifra más alta reportada) mediante el sellado con el método de plasma, sin afectar las propiedades eléctricas.

## **1.3 OBJETIVO**

Establecer un nuevo parámetro de fabricación de celdas electroquímicas microfluídicas para obtener dispositivos que sean confiables al presentar presiones



de fuga comparables a las de los dispositivos microfluídicos fabricados con PDMS/vidrio.

### **1.3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Fabricar los dispositivos que tengan estructuras de oro con diferentes anchos.
- Medir las presiones de fuga en los dispositivos fabricados.
- Realizar la simulación de la interfase PDMS/oro y PDMS/vidrio para explicar el fenómeno de la resistencia a la fuga de los dispositivos fabricados.
- Realizar voltamperometrías cíclicas en una celda electroquímica microfluídica con un analito modelo, para verificar el efecto de la caída óhmica en los voltamperogramas debido al ancho del conector.

## **CAPÍTULO 2: ANTECEDENTES**

### **2.1 Introducción**

Esta tesis se basa en las áreas de investigación de electroquímica y microfluídica, así como la simulación computacional. El objetivo de este capítulo es el de proporcionar a lector las bases con las que se trabajó para la realización de este proyecto y como la electroquímica puede coexistir con la microfluídica para el análisis de las sustancias.

### **2.2 Electroquímica**

La electroquímica es la rama de la química relacionada con la interrelación de los efectos eléctricos y químicos. Una gran parte de este campo se ocupa del estudio de los cambios químicos causados por el paso de una corriente eléctrica y la producción de energía eléctrica por reacciones químicas. De hecho, el campo de la electroquímica abarca una gran variedad de fenómenos diferentes (por ejemplo, electroforesis y corrosión), dispositivos (pantallas electrocrómicas, sensores electroanalíticos, baterías y celdas de combustible) y tecnologías (el electrodeposición de metales y la producción a gran escala de aluminio y cloro).[13]

Una celda electroquímica está frecuentemente conectada a un potencióstato para realizar mediciones. Una celda electroquímica de tres electrodos está compuesta por el electrodo de trabajo, el electrodo auxiliar, y el electrodo de referencia. El potencióstato controla el voltaje entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo, y mide el flujo de corriente que pasa a través de la celda (Figura 2.1.).

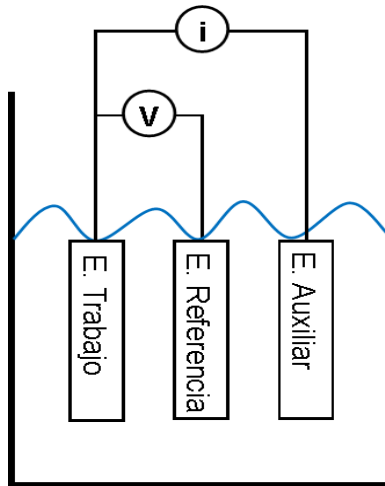


Figura 2. 1. Esquema de una celda electroquímica de tres electrodos.

Existen varias técnicas de medición que se pueden realizar con el potenciostato; entre ellas la cronoamperometría y la voltamperometría

### 2.2.1 Técnicas Electroquímicas

La cronoamperometría consiste en imponer un escalón de potencial entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia, durante un tiempo determinado. La respuesta de la corriente que pasa por el electrodo es medida en función del tiempo (Figura 2.2).

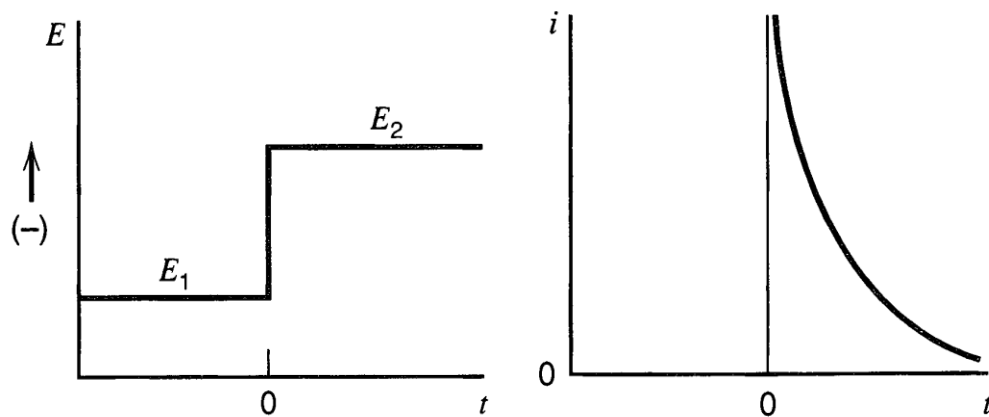


Figura 2. 2. a) La especie O está inactiva a  $E_1$ , pero se reduce a una velocidad de limitada por difusión a  $E_2$ , b) Gráfica de corriente vs tiempo característica de la cronoamperometría. Reimpreso con permiso de [13]. Copyright © 2001 John Wiley and Sons.

La cronopotenciometría consiste en mantener la corriente constante al electrodo de trabajo y se mide la variación del potencial en función del tiempo (Figura 2.3.).

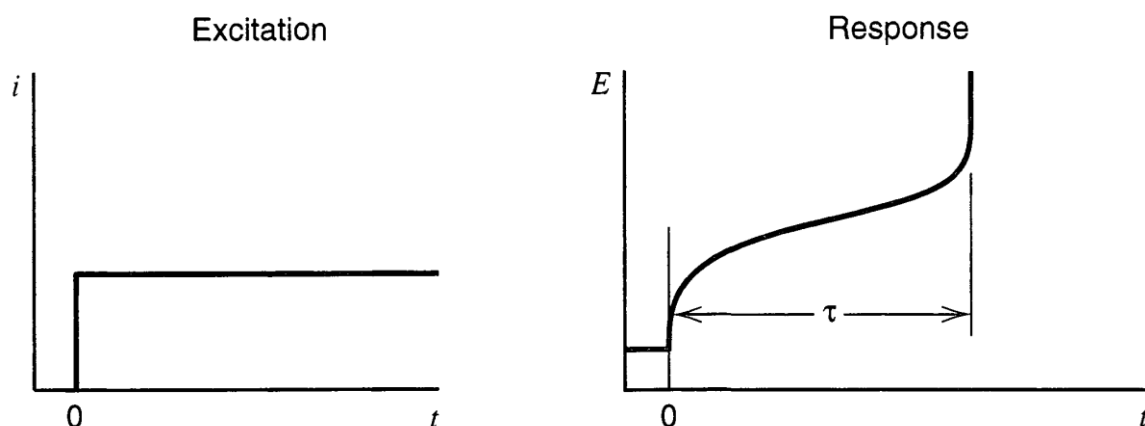


Figura 2. 3. Gráficas representativas de la técnica de cronopotenciometría, donde  $\tau$  es el tiempo de transición, que transcurre desde el inicio del pulso hasta el cambio pronunciado de potencial, por el agotamiento de la especie electroactiva en la interfase. Reimpreso con permiso de[13]. Copyright © 2001 John Wiley and Sons.

En la voltamperometría se aplica un barrido de potencial en el electrodo de trabajo a una velocidad constante, en donde se impone una rampa de potencial al sistema y se mide la corriente de repuesta. Los datos obtenidos se representan en un gráfico de  $i$  vs  $E$ , denominado voltamperograma (Figura 2.4.).

La voltamperometría se divide en varias subtécnicas, entre las cuales, las más populares son las siguientes:

- Voltamperometría de barrido lineal: Se aplica un potencial inicial y llega a un potencial final para terminar el proceso.
- Voltamperometría cíclica: El voltaje se barre entre un límite superior un límite inferior a una velocidad fija. Cuando el voltaje alcanza un límite, el barrido se revierte y el voltaje regresa al otro límite.

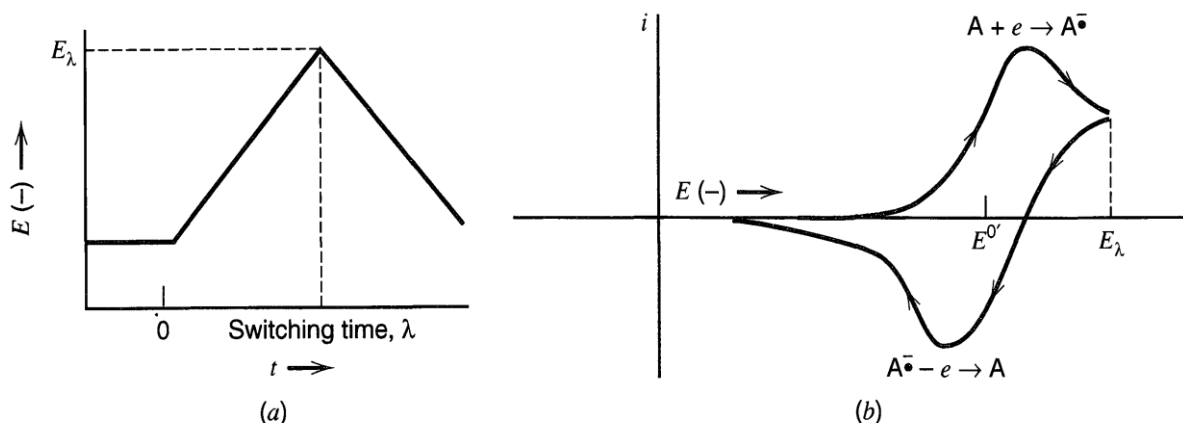


Figura 2. 4. a) Barrido de potencial cíclico, b) Voltamperograma cíclico. La especie A está equilibrio electroquímico en la superficie del electrodo ( $A + e \rightleftharpoons A^{\cdot-}$ ). Reimpreso con permiso de[13]. Copyright © 2001 John Wiley and Sons.

Como se puede observar en la figura 2.4.b, mientras el potencial del electrodo sea mayor al potencial formal,  $E^0$ , la especie se oxida; mientras que, al ser menor al potencial formal, la especie se reduce. En este voltamperograma se puede observar la corriente de pico para cada caso. La relación entre el corriente de pico,  $i_p$ , y la velocidad de barrido la ecuación,  $v$ , está dada por la ecuación de Randles-Sevcik:

$$i_p = (2.65 \times 10^5) A C D^{1/2} n^{3/2} v^{1/2}$$

Donde  $A$  es el área del electrodo,  $C$  es la concentración de la especie en el seno de la solución,  $D$  es el coeficiente de difusión de la especie,  $n$  es el número de electrones envueltos en la reacción y  $v$  es la velocidad de barrido.

### 2.2.2 Caída Óhmica

En una celda electroquímica, la corriente fluye a través del electrolito por migración iónica y a través de los componentes metálicos por conducción electrónica. Si consideramos que hay una resistencia en el electrolito entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia, la caída de potencial debido esta resistencia se le conoce como caída óhmica o caída  $iR$ . [14] Sin embargo, también existe una resistencia que puede afectar al sistema, la cual es la resistencia del electrodo y conectores. Si la resistencia es muy grande, esta puede afectar al circuito que hay

en la celda electroquímica provocando también una caída óhmica. Esta caída óhmica se debe a la ley de Ohm y se representa en la siguiente ecuación:

$$E_{app} = E_{WE} - E_{RE} - iR$$

donde  $E_{app}$  es el potencial medido,  $E_{WE}$  es el potencial del electrodo de trabajo,  $E_{RE}$  es el potencial del electrodo de referencia, y  $iR$  es la caída óhmica. La resistencia que hay entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo también se conoce como resistencia no compensada,  $R_u$ .

Debido a este efecto, se producen resultados no deseados en las mediciones. Esto se puede observar en la voltamperometría cíclica, donde la caída óhmica provoca principalmente una disminución en la magnitud de la corriente y un aumento en la separación de los picos anódicos y catódicos en el voltamperograma (Figura 2.5.).

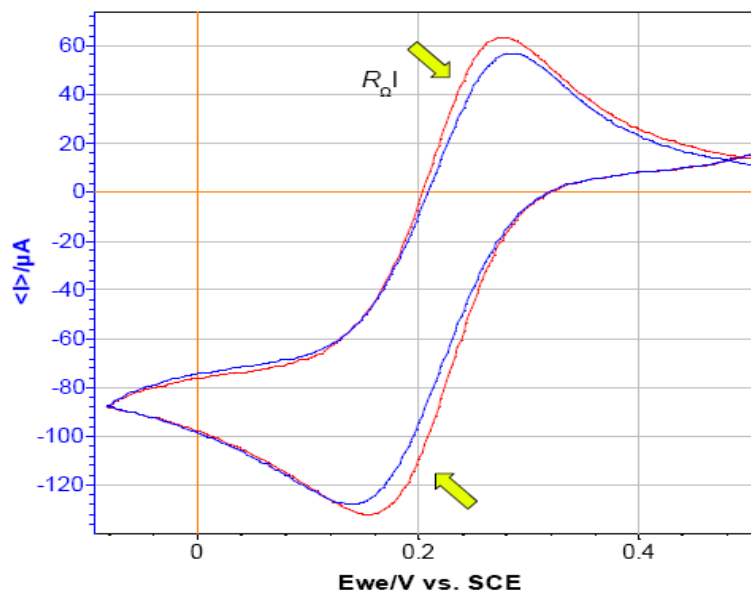


Figura 2. 5. Voltamperometría cíclica de  $K_3[Fe(CN)_6]$  0.6 mM en KCl 0.1 M en ausencia (rojo) y en presencia (azul) de una resistencia de  $100 \Omega$  conectada en serie entre el potenciostato y el electrodo de trabajo. [15]

La caída óhmica depende de lo siguiente:

- La posición entre el electrodo de trabajo y el de referencia.
- La conductividad del electrolito en la solución; ya que, a menor conductividad, mayor es la caída óhmica.

- La resistencia de los electrodos y conectores.

Generalmente para minimizar los efectos de la caída óhmica se utilizan los siguientes métodos:

- Usar altas concentraciones de electrolito en la solución
- Usar un sistema de tres electrodos
- El electrodo de trabajo y el de referencia deben estar cerca.
- Utilizar bajas velocidades de barrido para minimizar la corriente.
- El área de la superficie del electrodo de trabajo debe ser pequeña.

El desarrollo de microelectrodos ayuda a que se pueda usar un sistema de dos electrodos en una celda electroquímica debido a que se miden cantidades muy pequeñas de corriente. Esto quiere decir que se puede trabajar con soluciones con alta resistencia.[14, 16, 17]

### **2.2.3 Microelectrodos**

El término “microelectrodo” se usa generalmente para aquellos electrodos en los cuales son, al menos en una dimensión, menores a 25  $\mu\text{m}$ . [13] El uso de estos microelectrodos nos ayuda en el análisis a escala microscópica, medición de perfiles de concentración, detección en sistemas microfluídicos, y análisis de pequeñas cantidades de muestras ( $\mu\text{L}$ ). Los microelectrodos difieren de sus contrapartes macroscópicas debido a que la difusión pasa de ser planar semi-infinita en los electrodos convencionales, a una difusión radial semi-infinita en los microelectrodos (Figura 2.6.).

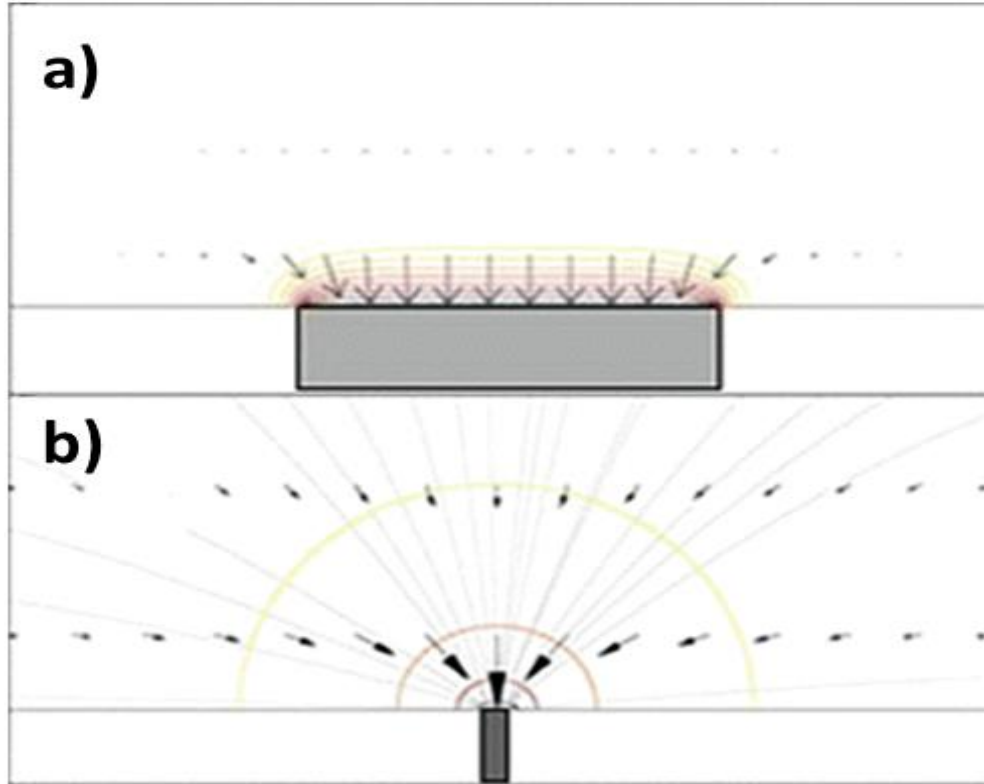


Figura 2. 6. Difusión (indicada con flechas) planar característico en electrodos convencionales (a) y difusión radial característica de los microelectrodos (b). Reimpreso con permiso de [18]. Copyright © 2014, Springer Science Business Media New York.

La reducida capacitancia de la doble capa de los microelectrodos debido a su pequeña área resulta en una constante de tiempo RC ( $\tau$ ) muy corta y, en consecuencia, permite realizar experimentos voltamperométricos a alta velocidad en microsegundos.[14, 18]

Como se muestra en la Figura 2.7, a bajas velocidades de barrido la forma del voltamperograma es sigmoideal, característico de los microelectrodos, mientras que, a velocidades de barrido altas, en el voltamperograma se forman los picos característicos de los electrodos convencionales.[18, 19] La diferencia de potencial de pico  $\Delta E_p$ , del voltamperograma de la Figura 2.7.b. es de 168 mV, mientras que



el  $\Delta E_p$ , de la Figura 2.7.c. es de 89 mV, por lo que al aumentar la velocidad de barrido, esto provoca que el  $\Delta E_p$  disminuya.

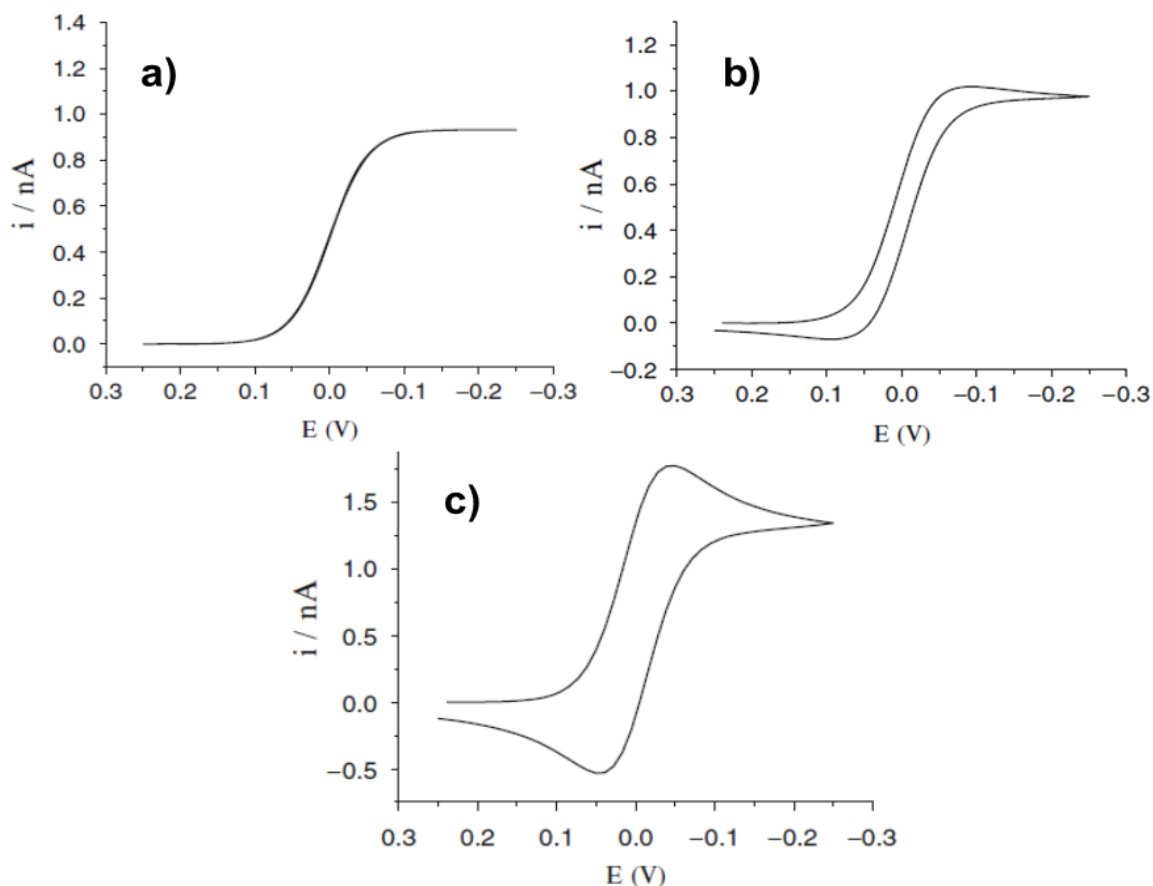


Figura 2. 7. Voltamperogramas simulados de un microelectrodo de 4  $\mu\text{m}$  de radio a diferentes velocidades de barrido. a) 100 mV/s; b) 200 mV/s; c) 2 V/s. Reimpreso con permiso de [18]. Copyright © 2014, Springer Science Business Media New York.

### 2.3 Simulación numérica

La simulación numérica se utiliza para resolver modelos matemáticos los cuales pueden contener una gran cantidad de ecuaciones diferenciales y predecir el comportamiento de un sistema, ahorrando el proceso de experimentación. Existen diferentes métodos en la simulación numérica, tales como el de diferencias finitas, elemento finito y volumen finito.

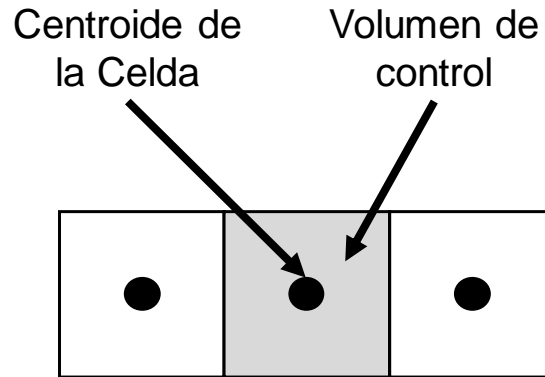


Figura 2. 8. Esquema de la técnica de volumen de control alrededor de un nodo (centroide de la celda).

La simulación numérica utiliza el método de elemento finito, donde la mayoría de los programas de simulación utilizan la técnica de volumen de control mostrado en la Figura 2.8. [20]

El método de elemento finito está definido por un elemento típico,  $e$ , que está definido por sus nodos  $(i, j, m)$  y por su contorno que se forman por líneas que unen estos nodos. Los desplazamientos  $u$  de cualquier punto del elemento se aproximan por un vector columna,  $\hat{u}$ :

$$u \approx \hat{u} = \sum_k N_k a_k^e = [N_i, N_j, \dots] \begin{Bmatrix} a_i \\ a_j \\ \vdots \end{Bmatrix} = N a^e$$

Donde  $N$  son funciones de posiciones dadas, y  $a$  es un vector formado por los desplazamientos nodales de los elementos considerados.[21]

El proceso de simulación consiste en lo siguiente:

- Generar la malla en la geometría, entre más fina sea mayor es la aproximación con la realidad.
- Integración de las ecuaciones gobernantes sobre todos los nodos de la malla generada.
- Conversión de las ecuaciones integrales en un sistema de ecuaciones algebraicas.

- Solución de las ecuaciones algebraicas mediante un método iterativo.[22]

## 2.4 Microfluídica

Los dispositivos microfluídicos son herramientas que se utilizan para realizar diferentes funciones tales como la separación y detección de las sustancias dentro del mismo. Se caracterizan porque las dimensiones de los canales son del orden de micrómetros ( $\mu\text{m}$ ). Esto conlleva a que se usen volúmenes de fluido del orden de los nanolitros ( $\text{nL}$ ).

La escala de la longitud de los canales por los que fluye el fluido afecta la fuerza que es aplicada al flujo. La magnitud de esta fuerza aplicada al fluido está relacionada con  $\nabla p$  y, por lo tanto, el tamaño y diseño de los canales determina la caída de presión en los mismos. Esto se observa muy comúnmente en los microcanales; que, al tener dimensiones muy pequeñas, se caracterizan porque su número de Reynolds es muy pequeño.[2] El número de Reynolds es un número adimensional que se caracteriza por la relación de las fuerzas inerciales y las fuerzas viscosas del fluido. El número de Reynolds está dado por:

$$Re = \frac{\rho v d}{\mu}$$

Donde  $\rho$  es la densidad del fluido,  $v$  es la velocidad característica del fluido,  $d$  es la longitud característica del canal,  $\mu$  y es la viscosidad dinámica del fluido.

Cuando el  $Re$  es menor a 2000, el flujo es laminar, lo que quiere decir que las fuerzas viscosas son las que predominan. Mientras al tener un  $Re$  mayor a 2000, el flujo es turbulento, donde las fuerzas inerciales son las que tienen mayor impacto. En microfluídica también se analiza la relación del transporte de masa debido al flujo y debido a la difusión, el cual es un número adimensional conocido como Peclet.

$$Pe = \frac{v d}{D}$$

Donde  $D$  es el coeficiente de difusión.

Como ya se ha visto, los dispositivos microfluidicos utilizan muy pequeñas velocidades de fluido, por lo que el factor determinante en la magnitud del número de Peclet es la longitud característica del canal.[2, 23]

Las ecuaciones que rigen el flujo laminar en un fluido incompresible incluyen la continuidad (conservación de la masa) y las ecuaciones de Navier-Stokes (conservación del momento).[1, 23]

$$\nabla \cdot \bar{u} = 0$$
$$\rho \frac{\partial \bar{u}}{\partial t} + \rho(\bar{u} \cdot \nabla)\bar{u} = -\nabla p + \mu \nabla^2 \bar{u} + \bar{f}$$

Donde  $\bar{u}$  es el vector velocidad para los fluidos,  $p$  es la presión,  $t$  es el tiempo y  $\bar{f}$  son las fuerzas de cuerpo por unidad de volumen. Como se ha visto antes, en los microsistemas rige el flujo laminar por su número de Reynolds bajo, debido a que las fuerzas viscosas predominan sobre las fuerzas inerciales. Por lo tanto, los términos de aceleración convectiva se ignoran, quedando la ecuación de Navier-Stokes como sigue:

$$0 = -\nabla p + \mu \nabla^2 \bar{u} + \bar{f}$$

#### 2.4.1 Microfabricación

Para obtener el producto final los cuales son los dispositivos microfluídicos, se utilizan diferentes técnicas de microfabricación, las cuales se verán a continuación.

Fotolitografía. También conocida como litografía óptica, es la técnica más importante en los procesos de microfabricación ya que a partir de ésta siguen los procesos de lift-off y litografía suave. En esta técnica el patrón de un diseño deseado es transferido a una fotoresina que está depositada en un sustrato.[7, 24, 25]

Lift-off. Es una técnica que sirve para fabricar patrones de metal sobre un sustrato. Como se mencionó anteriormente, la técnica de fotolitografía se utiliza para fabricar

patrones en la fotoresina, en donde se depositará metal tanto en el patrón como en la fotoresina. La fotoresina actúa como material de sacrificio; el metal que no está en contacto con el sustrato se remueve con un disolvente junto a la fotoresina.[25]

Litografía suave. Es una técnica de transferencia directa en el cual se usa un elastómero, generalmente polidimetilsiloxano (PDMS), como negativo a partir de un molde fabricado con fotolitografía, donde generalmente se usa SU-8.[7, 24]

## **2.5 Integración de la Microfluídica y la Electroquímica**

La detección es un paso muy importante, en especial en sistemas a escala micro, para el análisis de muestras.

Con el paso del tiempo, se han utilizado varios métodos de detección para el análisis de muestras en los microsistemas, como lo son la óptica, la electroquímica, la espectrometría de masa, entre otros.[2]

En la detección óptica se ha utilizado principalmente la fluorescencia, y, debido a su alta sensibilidad, es muy recomendable para el análisis de muestras. Una de las ventajas de este tipo de detección es que no requiere de interconexiones entre el dispositivo microfluídico y el equipo de detección. El problema es la limitada detección que se tiene debido a la poca cantidad de muestra que hay presente en el canal microfluídico. Otros tipos de detección óptica son la absorbancia,[26–28] resonancia por plasmones superficiales (SPR),[26–28] y quimioluminiscencia,[2, 26–28] entre otros.

Una de las ventajas de la detección electroquímica (ED) es que los electrodos se pueden miniaturizar y son compatibles con las técnicas de microfabricación de dispositivos microfluídicos. También tiene una alta sensibilidad, la señal de respuesta no depende de longitud del campo óptico o la turbiedad de la muestra, y requiere muy poco suministro de potencia.[2, 28]

Como se ha visto en años recientes, la electroquímica se ha utilizado en conjunto con las áreas de biosensores y microfluídica. El uso de electrodos a escala micrométrica es de gran utilidad ya que ofrecen algunas ventajas como la medición de pequeñas cantidades de corriente, respuesta rápida a cambios en el potencial aplicado, baja caída óhmica en potencial eléctrico, transporte de masa por difusión eficiente y una respuesta del potencial controlado por difusión en estado estacionario. Estas ventajas nos llevan al estudio de sistemas químicos y orgánicos, con una detección de concentraciones muy bajas de analito y mediciones de volúmenes de muestra muy bajos.

## **2.6 Problemas de fugas**

Los primeros sistemas microfluídicos se fabricaron mediante fotolitografía y grabado en silicio y vidrio. Sin embargo, el silicio es un material relativamente caro, tiene la desventaja de ser opaco en la región visible/UV del espectro, por lo que lo hace inadecuado para sistemas que utilizan detección óptica. El vidrio es transparente, pero debido a que es amorfo, las paredes laterales verticales son más difíciles de grabar que en silicio.[5]

La fabricación en polímeros es fácil, y su uso como materiales reduce el tiempo, la complejidad y el costo de la creación de prototipos y la fabricación. El poli(dimetilsiloxano) (PDMS) ha sido uno de los polímeros más activamente desarrollados para la microfluídica. La fabricación de sistemas de canales en PDMS es fácil sobre todo porque puede ser moldeado adecuadamente con fidelidad menor a  $0.1 \mu\text{m}$ . [6] El PDMS es un buen material para fabricar dispositivos porque tiene una serie de propiedades útiles: bajo costo con respecto a otros polímeros como el polimetilmetacrílico (PMMA), baja toxicidad, transparencia de las longitudes de onda visibles en las longitudes de onda cercanas al ultravioleta. [7, 24]

El PDMS puede sellar de manera reversible con otra pieza de PDMS, así como en el vidrio, haciendo contacto molecular (Van der Waals) con la superficie, pero no puede soportar presiones mayores a 34.5 kPa. [5, 6]

También se han usado otros métodos para mejorar el sellado reversible en dispositivos microfluídicos, utilizando una técnica de ensamblado en forma de sándwich, donde estos dispositivos están formados por dos piezas de vidrio y una capa intermedia de PDMS delgada, que puede soportar presiones de hasta 400 kPa.[29]

El PDMS también puede sellarse irreversiblemente después de que se expone a plasma de aire lo que genera grupos silanol (Si-OH). Para PDMS y vidrio, esta reacción produce enlaces Si-O-Si después de pérdida de agua, y soporta presiones de 205-345 kPa. El PDMS sella irreversiblemente en un rango de materiales distintos, incluyendo vidrio, silicio, óxido de silicio, cuarzo, nitruro de silicio, polietileno, poliestireno, carbon vítreo y el PDMS mismo.[5, 6, 30]

No obstante, los materiales no basados en silicio no se adherirán por este método. Se ha encontrado que hay fugas de solución entre la capa de PDMS y las superficies de los electrodos de oro (Figura 2.9.). A diferencia del vidrio, el oro es inerte al plasma de O<sub>2</sub> y no tiene sitios de unión para reaccionar con el PDMS oxidado. Debido a esto, el electrolito dentro del canal fuga a través de la interfase PDMS/oro, lo cual provoca un cambio en el área del electrodo y, en consecuencia, produce mediciones erróneas al realizar experimentos electroquímicos.[10]

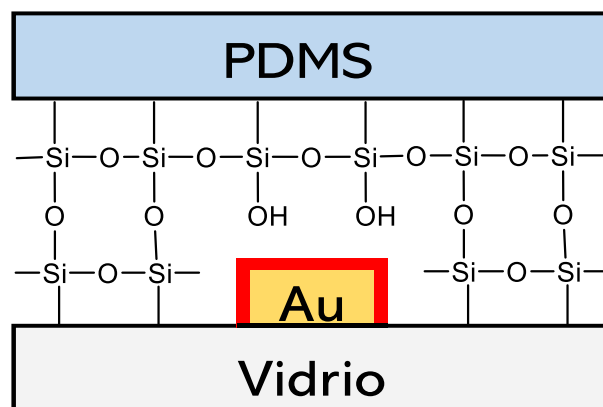


Figura 2. 9. Representación de la unión entre PDMS/vidrio y la ausencia de esta en la interfase PDMS/oro. La línea roja representa la zona de fuga.

Otro problema a causa de la fuga del electrolito es que este se estanca, y al utilizar otro electrolito diferente, contamina la solución, en especial cuando se quiere controlar el pH, dando mediciones no deseadas.

Para la adhesión entre el PDMS y otros metales, se han estudiado varios métodos. Para unir permanentemente una placa de PDMS a una placa de oro, se tratan las superficies de PDMS y/u oro con 3-mercaptopropil trimetoxi silano (3-MPTS), con el fin de incorporar los grupos tiol (-SH) a la superficie del oro.[31–33] Como se muestra en la Figura 2.10., los grupos funcionales silano se unen covalentemente a la superficie de sílice y los grupos tiol se unieron covalentemente al oro.[34]

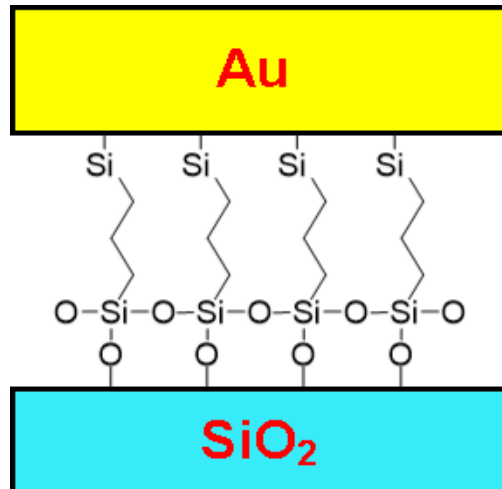


Figura 2. 10. Representación de una superficie de sílice recubierta con 3-MPTS unida con oro. Adaptado de [34]. Copyright © 2006 Elsevier B.V.

Se ha avanzado con el tiempo en el sellado de microchips, utilizando películas delgadas de SiO<sub>2</sub> para recubrir los electrodos, mejorando la eficiencia del sellado vía plasma de O<sub>2</sub>, y, por lo tanto, mejorando el rendimiento del dispositivo.[10]

Las soluciones de 3-aminopropiltrimetoxisilano (3-APTMS) y 3-mercaptopropil trimetoxisilano (3-MPTMS) se han utilizado para modificar las superficies de oro para obtener grupos amina y tiol, respectivamente.[35]



En años recientes, se han hecho avances en los métodos de sellado, utilizando el acoplamiento mediante la reacción de un ácido carboxílico(ácido N - [(3-trimetoxisilil)propil]-etilen-diamina triacético ó TMS-EDTA) y una amina (3-APTMS), para la fabricación de dispositivos microfluídicos en PDMS-vidrio y PDMS-oro, como se muestra de la Figura 2.11., se observaron que las moléculas con grupos funcionales trimetoxisilano pueden interactuar con superficies de oro y vidrio.[11, 36]

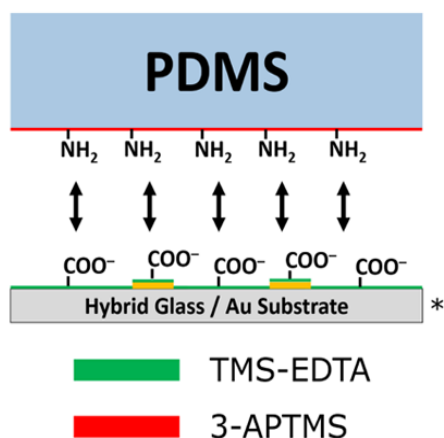


Figura 2. 11. Formación de carboxil-amina entre TMS-EDTA Y 3-APTMS. Reimpreso con permiso de [36]. Copyright © 2016, American Chemical Society.

Se ha estudiado la resistencia a la fuga en dispositivos con electrodos de oro con un ancho de 500-770  $\mu\text{m}$ , los cuales están modificados con TMS-EDTA, mientras que las placas de PMDS son modificadas con 3-APTMS. Estos dispositivos resistieron una presión 37 veces mayor que los dispositivos que utilizan el sellado por plasma sin la estrategia de carboxilamina.[12]

## CAPÍTULO 3: DISEÑO Y FABRICACIÓN DEL DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO

La fotolitografía, depósito por haz de electrones y litografía suave, son técnicas muy comunes para la fabricación de dispositivos electroquímicos microfluídicos. El uso de plasma para el sellado de las superficies PDMS y vidrio es ampliamente utilizado en microfluídica. Sin embargo, sabiendo que el oro es inerte al plasma y que se deben realizar pruebas de fuga en estos dispositivos a diferentes anchos, es necesario fabricar un dispositivo que sea hermético alrededor de las estructuras de oro, es decir, que al presentarse la fuga sobre la estructura de oro esta llegue hasta el exterior del dispositivo de prueba, provocando caídas de presión significativas y afecten a las mediciones. En este capítulo se explica cómo se realizó el diseño en software y la fabricación en de las estructuras de oro y los canales, que se muestra en la Figura 3.1.

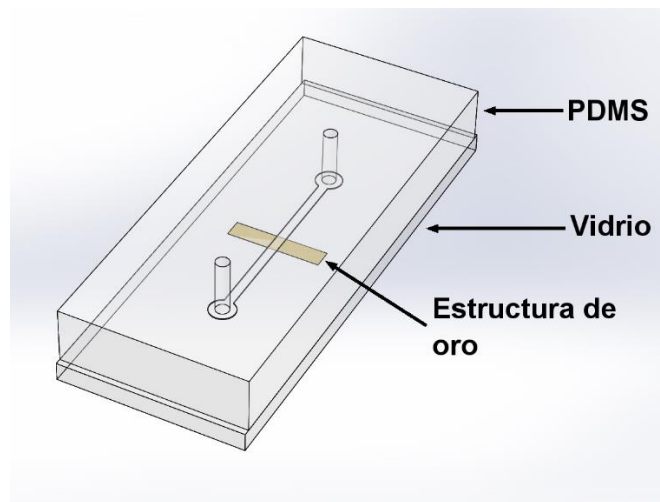


Figura 3. 1. Esquema en 3D del dispositivo de prueba de fuga a fabricar.

### 3.1. Diseño

Se hizo una búsqueda en literatura de los anchos de electrodos utilizados en sistemas vidrio-estructuras de oro-PDMS, los cuales se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 1 Anchos de electrodo utilizados en literatura.

Ancho de Electrodo	Referencia
2 $\mu\text{m}$	[37]
4 $\mu\text{m}$	[38]
20 $\mu\text{m}$	[37]
26 $\mu\text{m}$	[38]
40 $\mu\text{m}$	[39, 40]
50 $\mu\text{m}$	[10, 41]
100 $\mu\text{m}$	[41]
200 $\mu\text{m}$	[41–45]
500 $\mu\text{m}$	[12]
770 $\mu\text{m}$	[12]

Se hicieron los siguientes diseños en el software Layout Editor, de acuerdo con la tabla de tamaños de electrodos utilizados en publicaciones anteriores, y agregando valores de ancho de electrodo dentro del rango de la tabla 1 (4, 20, 26, 40 50, 100, 200, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 y 770  $\mu\text{m}$ ).

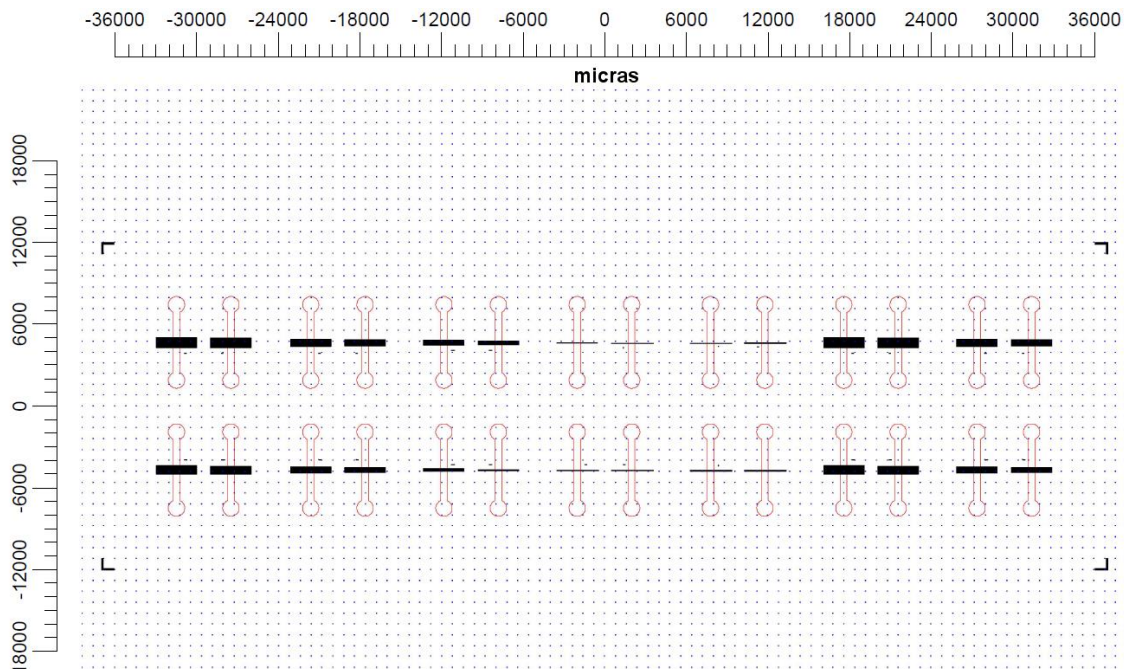


Figura 3. 2. Diseños de los dispositivos de prueba, en negro las estructuras de oro, en rojo los canales.

## 3.2. Fotolitografía

### 3.2.1. Fabricación de electrodos

En un cristizador se preparó una solución piraña 3:1 v/v de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . y se calentó a  $100\text{ }^\circ\text{C}$ . Los sustratos de vidrio se sumergieron en esta disolución durante 15 minutos y se enjuagaron con agua desionizada.

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

El proceso se caracterizó mediante el uso de un diseño de prueba (Figura 3.3.), llevando a cabo la exposición por lotes, variando los tiempos de exposición de 50% a 100% con respecto al tiempo de permanencia del láser sobre cada píxel, en un rango de 6 a 9 mW de potencia, eligiendo las condiciones más adecuadas.

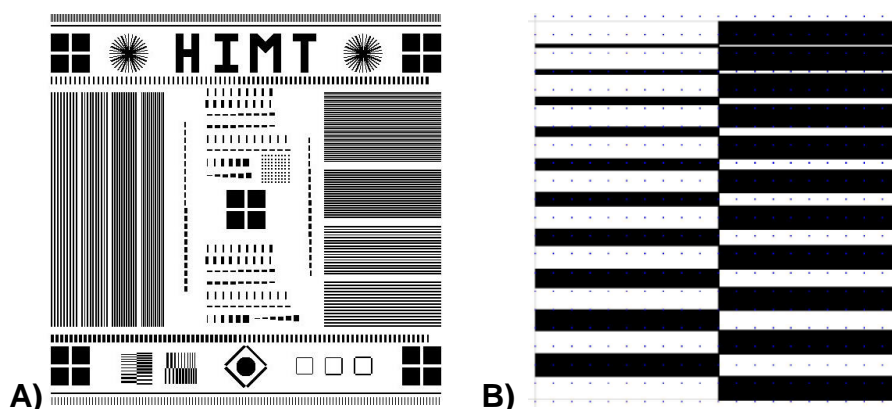


Figura 3. 3. Diseño de prueba (a) Completo (b) Parte del diseño donde los anchos de estructura y espaciado entre las mismas van de 1 a  $10\text{ }\mu\text{m}$

Una vez terminado el proceso se colocó el sustrato en la parrilla para empezar el proceso de “post exposure bake” a  $110\text{ }^\circ\text{C}$  durante 60 segundos el cual sirve como

catalizador y completa la fotoreacción iniciada durante la exposición. Una vez terminado el proceso de post exposure bake, se introdujo el sustrato en el revelador AZ 300MIF durante 60 segundos, observando que cubriera todo el sustrato, y posteriormente se sumergió en agua desionizada para detener el proceso de revelado. Después se secó el sustrato con aire seco o  $N_2$ , y se caracterizó en un microscopio metalográfico AmScope.

### 3.2.1.1 Resultados

Se hicieron análisis de las imágenes del microscopio de metalográfico AmScope para poder caracterizar la potencia y el tiempo de exposición de la resina AZnLOF 2020 en sustratos de vidrio.

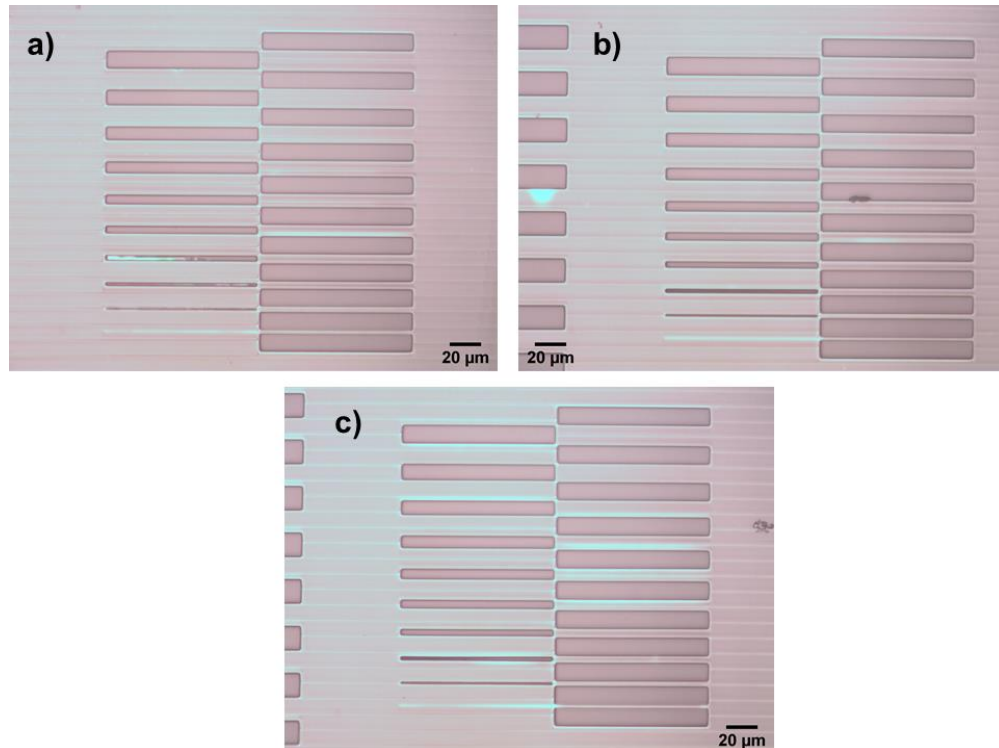


Figura 3. 4. Imágenes del diseño de prueba expuesto a 6 mW con diferentes tiempos de exposición (a) 50%, (b) 60%, (c) 70%.

Como se observa en la Figura 3.4., la resina ocupa la mayor parte de la imagen y las líneas que se ven en la resina pertenecen a la exposición al láser del fotolitógrafo. El ancho de los rectángulos no concuerda con el diseño de prueba,

teniendo una diferencia entre las medidas de la muestra y el diseño original de  $0.63 \mu\text{m}$ . Esto paso en todos los tiempos de exposición mostrados en la Figura 3.4.

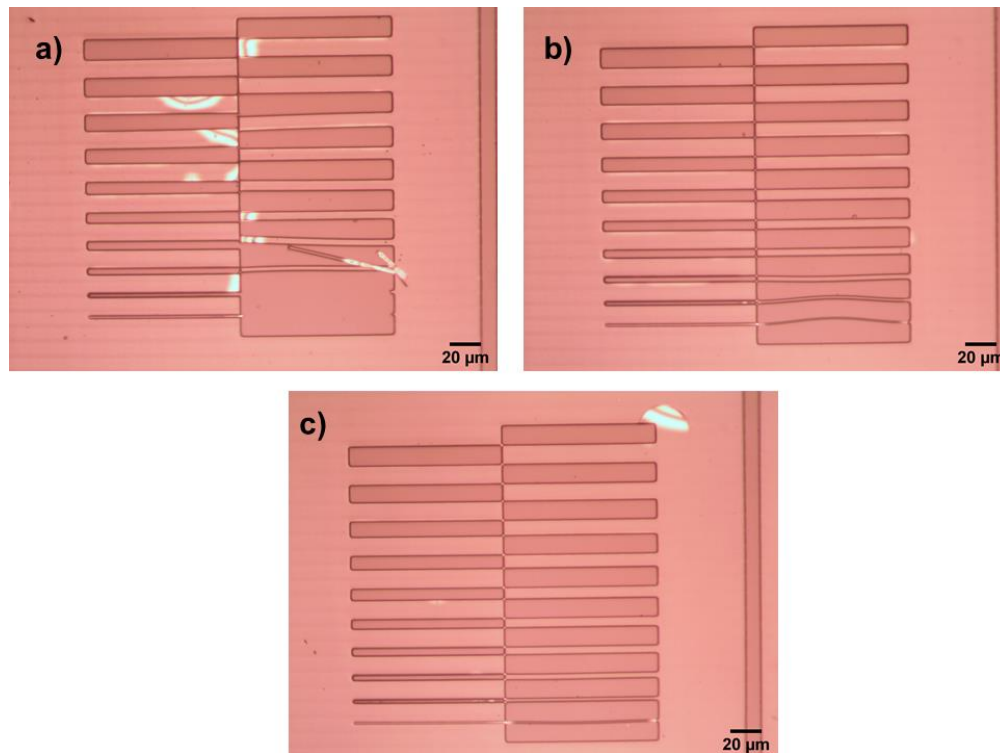


Figura 3. 5. Imágenes del diseño de prueba expuesto a 7mW con diferentes tiempos de exposición (a) 50%, (b) 60%, (c) 70%.

Como se puede observar en la Figura 3.5. a y b, el ancho de los rectángulos hechos con fotolitografía difiere con el del diseño de prueba en  $0.50 \mu\text{m}$ , mientras que en la Figura 3.5.c, el ancho de los rectángulos se apega más al diseño de prueba (Figura 3.3.), al tener una diferencia de  $0.03 \mu\text{m}$ , por lo que se eligieron los parámetros de 7 mW 70% para la fabricación de las estructuras de oro.

### 3.2.2. Fabricación de canales

Se calentaron los sustratos en la parrilla EMS 1000-1 a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  por 1 minuto para eliminar residuos de agua. Se colocaron los sustratos en el spin coater SCS G808P, donde se agregó uniformemente la resina (SU-8 50) en toda el área del sustrato. Este se hizo girar a 3000 rpm durante 30 segundos para obtener un espesor de resina de  $40 \mu\text{m}$  aprox., y una vez terminado el proceso se colocó el sustrato en la

parrilla para el “soft bake”, primero a 65 °C por 10 minutos y después a 95 °C por 30 minutos.

Se caracterizó el proceso mediante el mismo diseño de prueba mostrado en la Figura 3.3., haciendo el uso de exposición por lotes, variando los tiempos de exposición de 50% a 100% con respecto al tiempo de permanencia del láser sobre cada píxel, en rango de 20 a 35 mW de potencia, y variando el número de pasadas y el factor de reducción de tiempo (1x1 a 2x4, respectivamente) para así elegir cual es el más adecuado.

Una vez terminado el proceso se colocó el sustrato en la parrilla para empezar el proceso de “post exposure bake”, primero a 65 °C durante 1 minuto y después a 95 °C durante 4 minutos. Una vez terminado el proceso de “post exposure bake”, se introdujo el sustrato en el revelador, durante 5 minutos y se introduce en 2-propanol para detener el proceso de revelado. Después se secó el sustrato con aire seco o N<sub>2</sub>, listo para que pueda ser observado en el microscopio metalográfico AmScope.

### **3.2.1.1 Resultados**

Se realizó el análisis de las imágenes del microscopio metalográfico AmScope para poder caracterizar la potencia y el tiempo de exposición de la resina SU-8 en sustratos de vidrio.

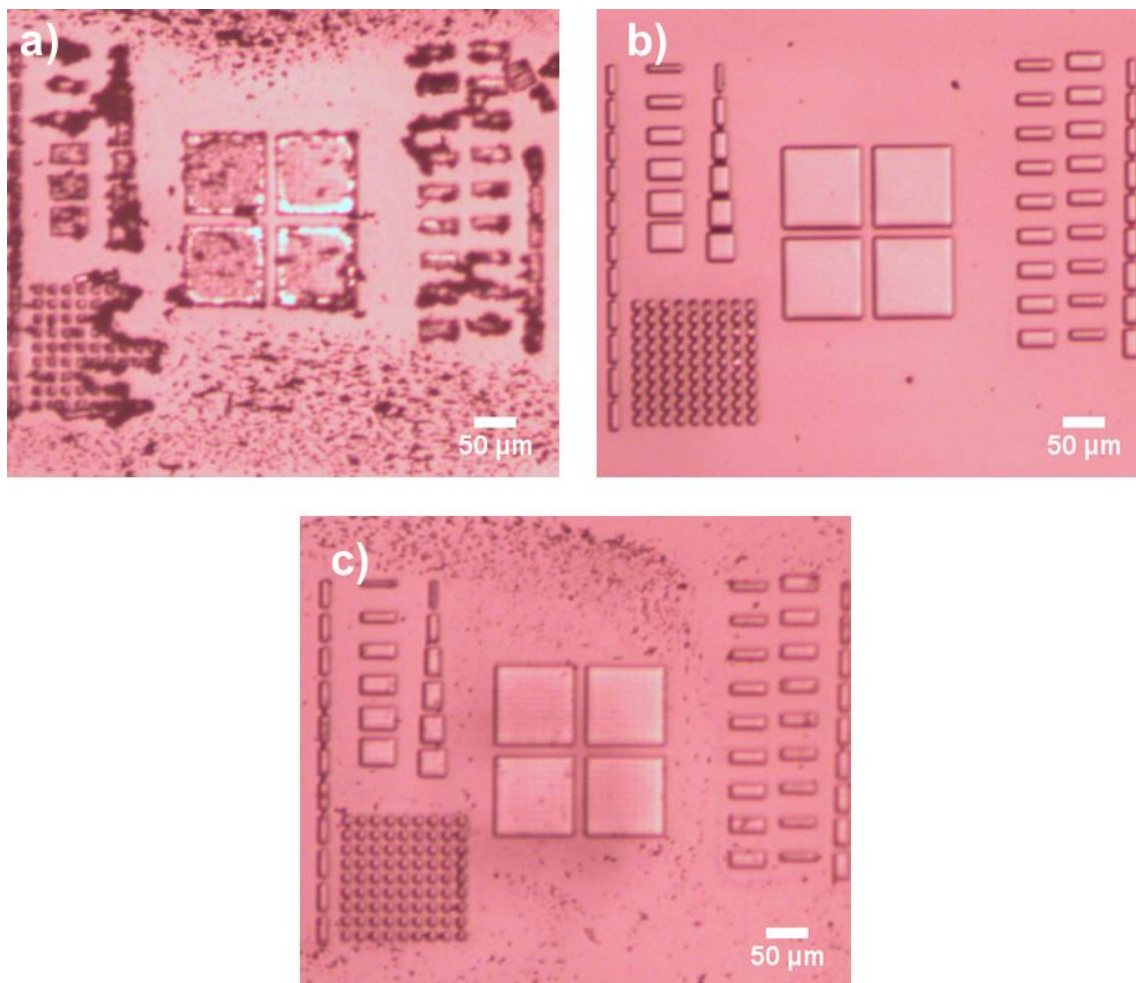


Figura 3. 6. Imágenes del diseño de prueba expuesto a: (a) 20 mW 50% 1x4, (b) 20 mW 50% 2x4, (c) 30 mW 50% 1x4.

Como se observa en la Figura 3.6. b,) las dimensiones de los cuadrados del centro se apegan a los del diseño de prueba, al tener una diferencia mayor de  $0.04 \mu\text{m}$ , mientras que en la Figura 3.6.a, las estructuras de la resina no se adhieren al sustrato por falta de potencia y exposición, y en la Figura 3.6. b), las estructuras de la resina no se adhieren al sustrato, y las dimensiones de los cuadrados del centro son menores al del diseño de prueba, con una diferencia mayor de  $0.28 \mu\text{m}$ , por los que se eligieron los parámetros de 20 mW 50% 2x4.



### 3.3. Depósito por evaporación por haz de electrones

Una vez que se fabrican las estructuras para los electrodos con la ayuda de la resina AZnLOF 2020 y el equipo de litografía Heidelberg  $\mu$ PG101, se utiliza el equipo de depósito físico a vapor Intercovamex D18 para aplicar la técnica de evaporación por haz de electrones (Figura 3.7.).

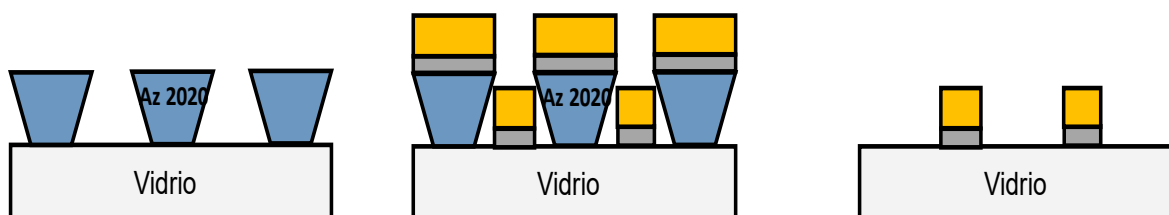


Figura 3. 7. Proceso de lift-off para la fabricación de las estructuras de oro. El titanio se representa en gris y el oro en amarillo.

En la tabla 2 se muestra los datos necesarios para el depósito de titanio y oro en los sustratos de vidrio.

Tabla 2. Datos del material a depositar

Muestra	Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	Z-Ratio
Titanio (Ti)	4.5	0.628
Oro (Au)	19.3	0.381

Se depositaron Ti y Au a velocidades de 1.3 Å/s y 6.2 Å /s respectivamente, y se obtienen grosores de cada material de 20 y 200 nm respectivamente. Para remover la resina AZnLOF 2020 del sustrato, éste se sumerge en el removedor AZ 400T a 80 °C por 1 hora tras lo que se obtienen los sustratos de vidrio con electrodos de oro (Figura 3.8.).

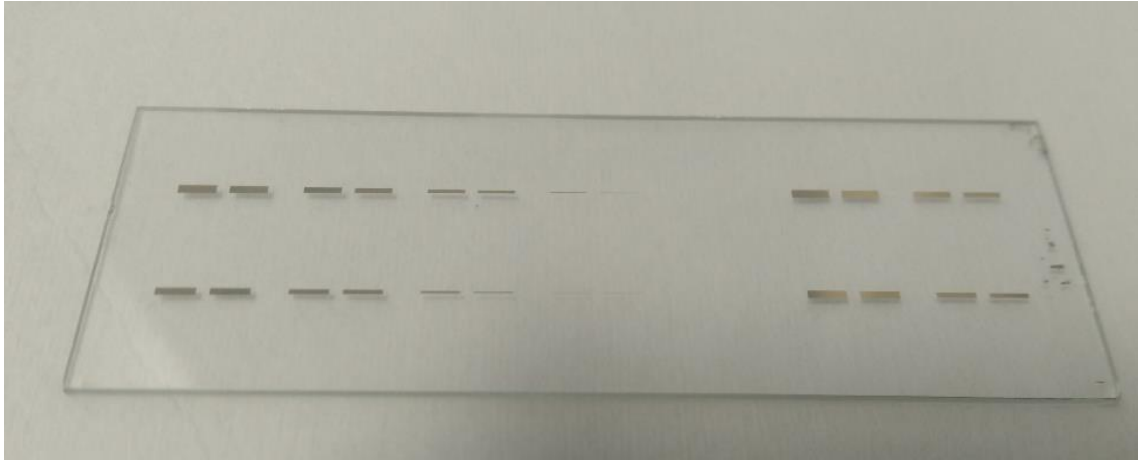


Figura 3. 8. Estructuras de oro fabricadas con la técnica de lift-off.

Se hicieron perfilometrías para saber el espesor total de la capa de titanio + oro, resultando en un valor de 240 nm (Figura 3.9.).

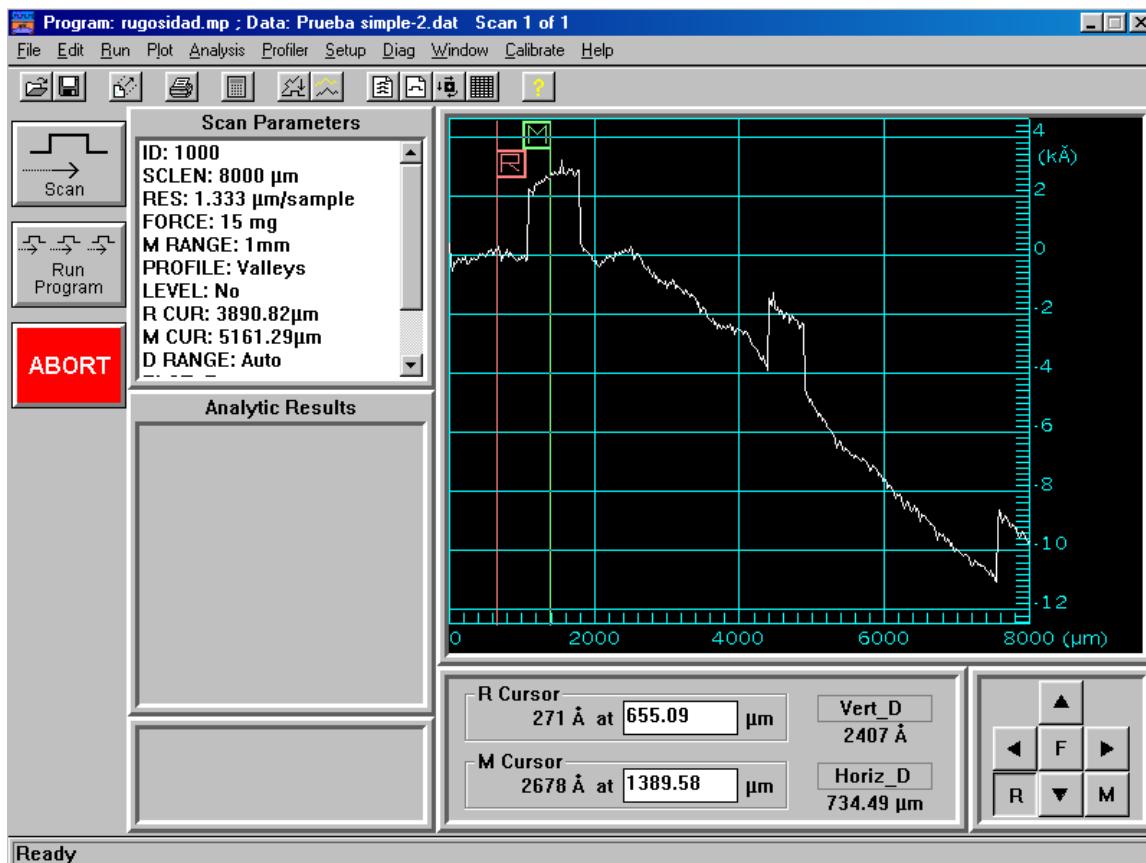


Figura 3. 9. Perfilometría del grosor de las estructuras fabricadas mediante el depósito por evaporación por haz de electrones.

### 3.4. Método de Sellado con Plasma

#### 3.4.1. Limpieza de sustratos

La limpieza de los sustratos se hace de manera secuencial sumergiéndolos en vasos de precipitado con acetona (Merck), 2-propanol (Sigma-Aldrich), metanol (Fermont) y agua ultrapura, en un sonicador por 15 minutos en cada reactivo. Después los sustratos se sumergen en solución RCA1 para remover contaminantes orgánicos (5:1:1 en volumen de agua ultrapura,  $\text{NH}_4\text{OH}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a temperatura ambiente por 15 minutos. Una vez terminado el tratamiento con RCA1, los sustratos se sumergen en una solución  $\text{HNO}_3$  0.1 M por 30 minutos. Después los sustratos se enjuagan con agua ultrapura y se secan con  $\text{N}_2$ .

#### 3.4.2. Preparación de polidimetilsiloxano

Para la fabricación de los canales se utilizó la litografía suave, la cual consiste en tener un molde hecho con un sustrato y las estructuras fabricadas en SU-8 sobre el cual se vierte PDMS que, una vez curado y retirado del molde, presenta los canales como negativo de las estructuras de SU-8(Figura 3.10.).

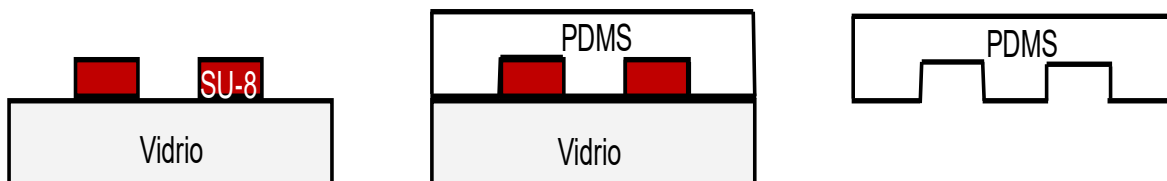


Figura 3. 10. Proceso de litografía suave para la fabricación de los canales en PDMS.

Para ello, primero se prepara una mezcla entre el agente de curado y el Sylgard 184 en una proporción de 1:10 y se agita uniformemente. Se prepara un molde con cinta Scotch en el portaobjetos que contiene las estructuras para los canales y se vierte el PDMS en el molde. Se introduce el molde en un desecador y se deja por 15 – 30 minutos al vacío hasta que se observe que las burbujas de aire en el PDMS desaparezcan y a continuación se introduce en horno a 60 °C durante 3 horas (Figura 3.11.).

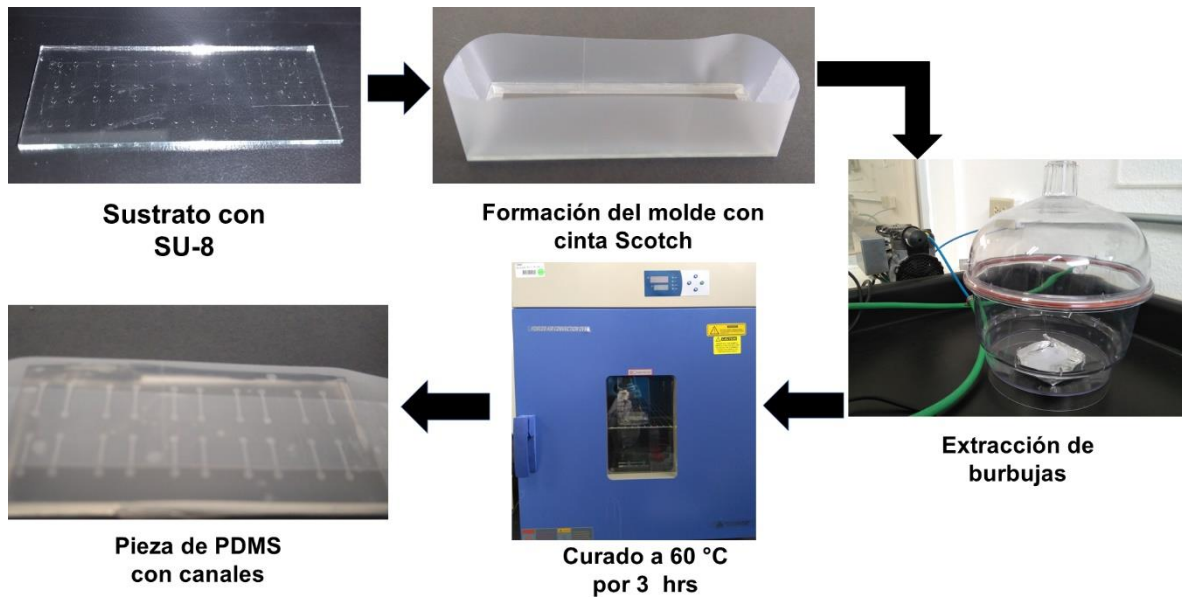


Figura 3. 11. Proceso de fabricación de los canales.

A los canales fabricados se les hizo una perfilometría (Figura 3.12.), saber la profundidad de éstos, dando como resultado  $39.52 \pm 1.78 \mu\text{m}$ .

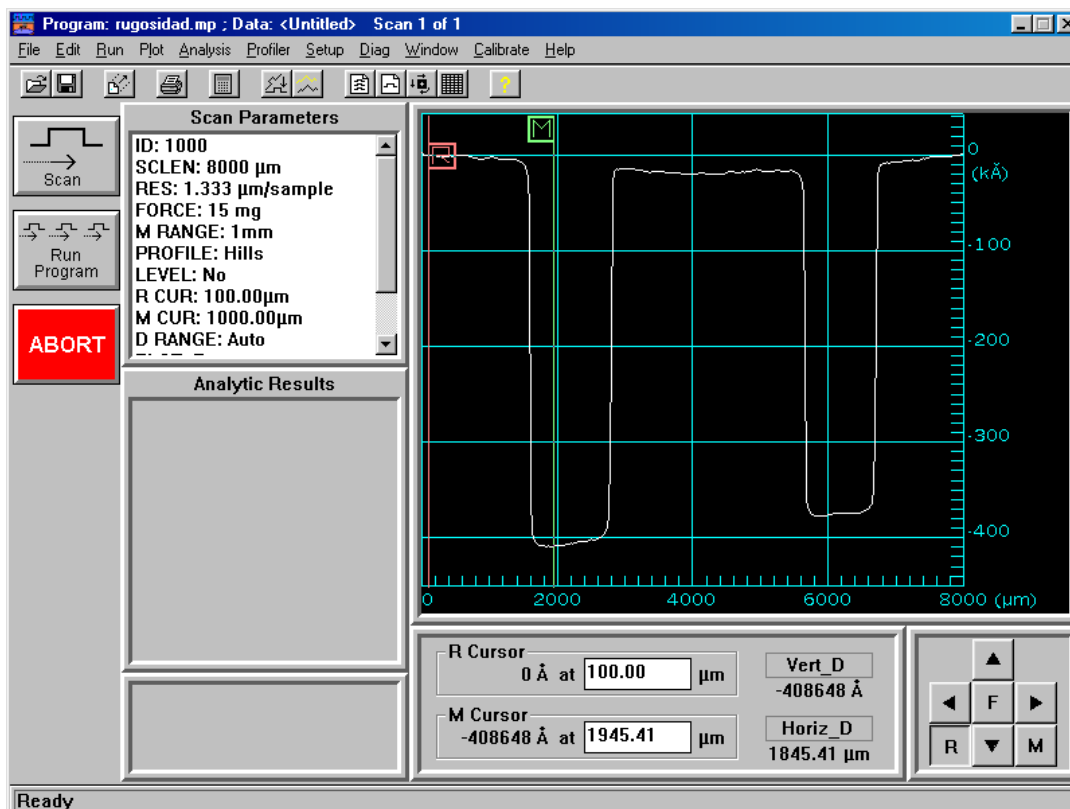


Figura 3. 12. Perfilometría de la profundidad de los canales hechos con PDMS.

### 3.4.3. Sellado con Plasma

El sellado se hace mediante un limpiador de plasma MTI PDC-001-LD. Se introducen el sustrato de vidrio con los electrodos y la pieza de PDMS con el canal, con la cara que se quiere sellar hacia arriba. Se hace vacío en la cámara, se gira la válvula a la posición de venteo, y se deja que se establezca la presión a  $7 \times 10^{-1}$  torr. Se enciende la radiofrecuencia en intensidad media, y se expone el material durante 1 minuto y 15 segundos a partir de la ignición del plasma. Después se sacan el sustrato de vidrio con los electrodos y la pieza de PDMS y se unen, así obteniendo el dispositivo de prueba de fugas (Figura 3.13.).

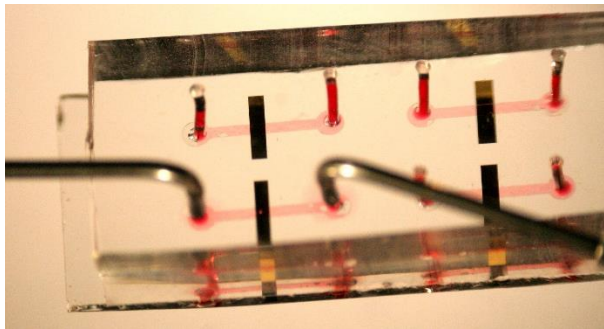


Figura 3. 13. Dispositivo fabricado para las pruebas de fuga. Se inyectó un colorante para hacer visibles los canales.

## CAPÍTULO 4: PRUEBA DE FUGA

Para las pruebas de presión de fuga se utilizó la fluorescencia para su detección óptica. El fundamento de la detección por fluorescencia se describe a continuación.

### 4.1 Microscopía de Fluorescencia

La microscopía de fluorescencia es una poderosa herramienta para el estudio de sistemas micro y nanoestructurados. En un microscopio óptico común (campo claro), la muestra se ilumina con una fuente de luz y es ésta misma luz la que se analiza, después de su interacción con la muestra. [46] La luz analizada puede ser transmitida o reflejada (iluminación episcópica).

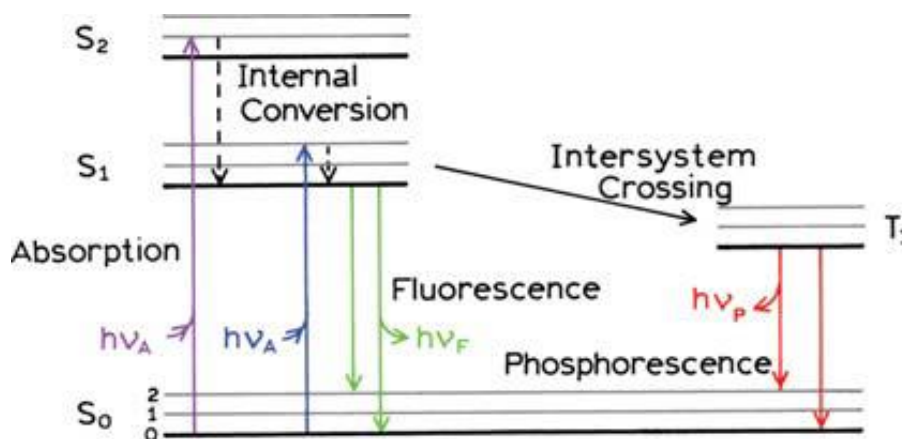


Figura 4. 1. Diagrama de Jablonski. Reimpreso con permiso de [47]. Copyright © 2006, Springer Science Business Media, LLC.

Tal como lo describe el diagrama de Jablonski de la Figura 4.1., en un microscopio de fluorescencia las moléculas de la muestra que están en un estado electrónico basal ( $S_0$ ) absorben fotones provenientes de la fuente de luz, excitando las moléculas a otro estado electrónico de mayor energía ( $S_0 \rightarrow S_1$ ). Al decaer radiactivamente, estas moléculas emiten fotones de menor energía ( $S_1 \rightarrow S_0$ ), que son los que se analizan en las técnicas basadas en fluorescencia, como se observa en el espectro de fluorescencia de la fluoresceína de la Figura 4.2.

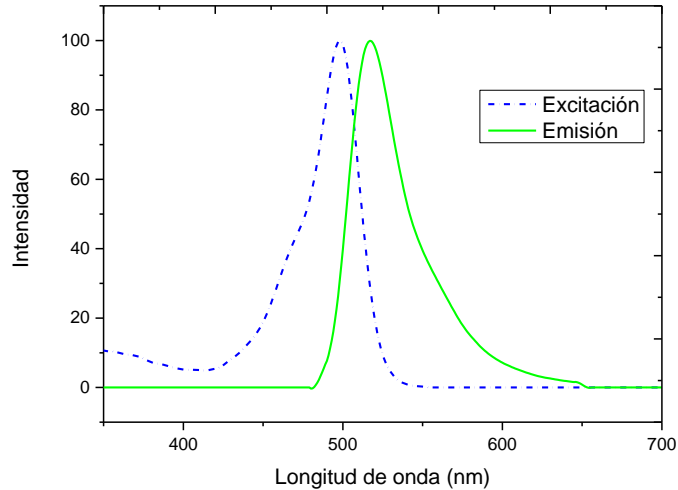


Figura 4. 2. Espectro de fluorescencia de la fluoresceína (FITC).[48]

El microscopio de fluorescencia contiene un filtro cubo, el cual contiene 2 filtros (filtro de excitación y filtro de emisión) y un espejo dicroico (Figura 4.3.). La luz proveniente de una fuente pasa a través de un filtro de excitación el cual deja pasar luz azul de una longitud de onda de 450-490 nm, y es reflejada por el espejo dicroico hacia la muestra, iluminándola. La fluorescencia emitida de la muestra se recolecta por el objetivo y es transmitida a través del espejo dicroico, pasando por un filtro de emisión en donde solo pasa luz verde de una longitud de onda de 520-560 nm, hacia el detector.

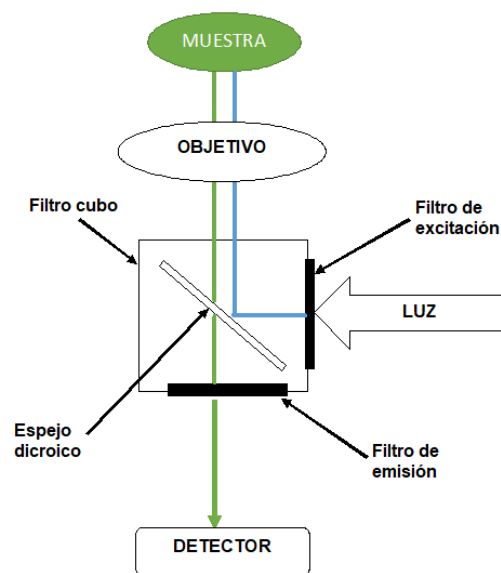


Figura 4. 3. Funcionamiento del microscopio de fluorescencia.

## 4.2. Acoplamiento del Microscopio de Fluorescencia y el Equipo de Control Microfluídico

Para la medición de la presión de fuga, se utiliza una solución de fluoresceína  $1 \times 10^{-5}$  M, la cual se pasa por el canal del dispositivo de prueba de fugas que está montada en un soporte, el cual protege el objetivo del microscopio de las fugas (Figura 4.4.b). La salida del dispositivo de prueba se selló una vez que el sistema estuviera lleno de la solución (Figura 4.4.a). La presión se suministró con la ayuda del equipo de control microfluídico Elveflow.

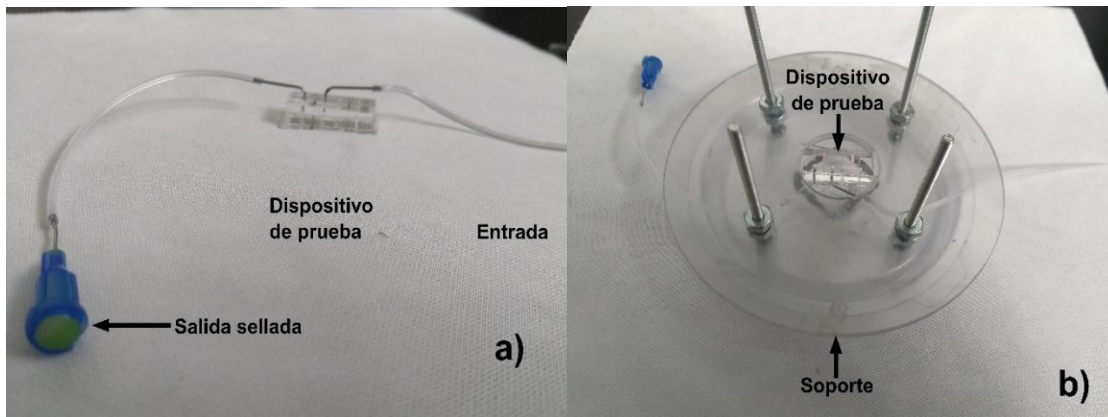


Figura 4. 4. a) Dispositivo de prueba con salida sellada. b) Montaje del dispositivo en el soporte.

El microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti-U, ayudar a observar la fluoresceína que fluye sobre las estructuras de oro, una vez que se haya roto el sellado entre las interfases PDMS-oro (Figura 4.5.).

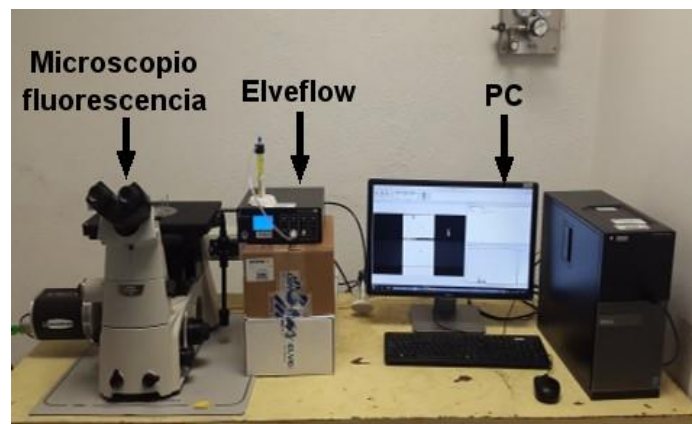


Figura 4. 5. Estación de trabajo para medición de presión de fugas.



### 4.3 Medición de Presión de fuga

Con la ayuda del software Oculus, se obtienen capturas de imágenes de los canales llenos de fluoresceína en los cruces con las estructuras metálicas mientras se aumenta la presión de la solución dentro de los canales de acuerdo con una rampa de presión de 80 kPa por 120 segundos (Figura 4.6.).

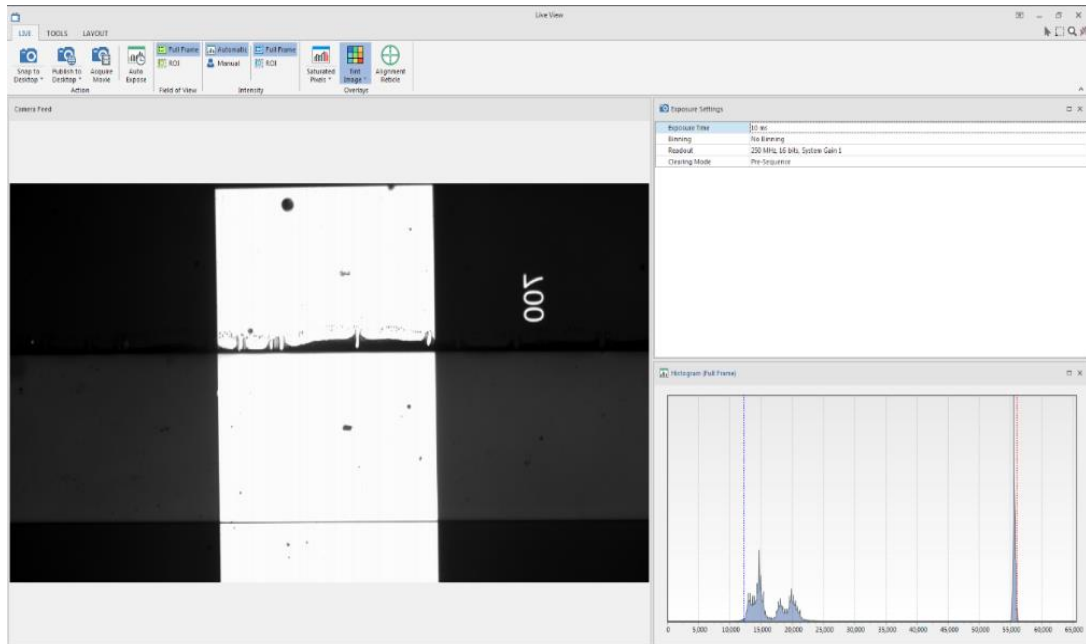


Figura 4. 6. Captura de pantalla del software Oculus.

Debido a que los puntos de referencia a partir de los cuales se reportan los tiempos de cada imagen y valor de presión son diferentes para el equipo Elveflow y la cámara del microscopio de fluorescencia, se realiza la sincronización de estos de acuerdo con el siguiente procedimiento. Se ingresan los parámetros presión y tiempo para generar la rampa en el equipo de control microfluídico Elveflow. Tras iniciar el aumento de presión y la toma de imágenes se toma una captura de pantalla a usarse como referencia (Figura 4.7.), la cual debe contener el cuadro y la presión en ese instante, además de la velocidad de captura de imágenes (2.5 fps).

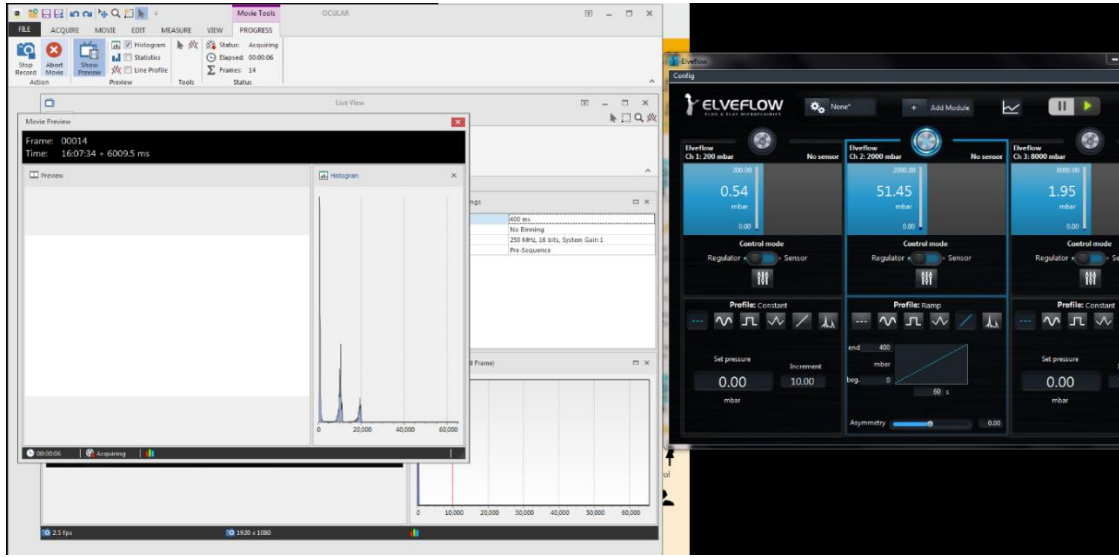


Figura 4. 7. Captura de pantalla de referencia.

Con la imagen de referencia, la pendiente  $m$  de la rampa de presión vs tiempo, se calcula de la siguiente manera:

$$m = \frac{p}{t}$$

Donde  $p$  es presión final y  $t$  es el tiempo final de la rampa. Se hace el cálculo del tiempo en que la cámara hace la captura de cada imagen.

$$t_{\text{captura imagen}} = \frac{\text{cuadro}}{m_{\text{captura imagen}}}$$

Donde  $m_{\text{captura imagen}}$  es la velocidad de captura de imágenes en cuadros por segundos (fps). Se calcula el tiempo de la presión de la imagen de referencia:

$$t_{\text{presión imagen de referencia}} = \frac{p_{\text{imagen de referencia}}}{m}$$

El  $t_{\text{presión imagen de referencia}}$  se utiliza para sincronizar el tiempo en que se suministra la presión con el equipo Elveflow y el tiempo de la captura de imagen  $t_{\text{captura imagen}}$ . Después se realiza la diferencia de tiempos entre estas dos variables.

$$\Delta t = t_{\text{presión imagen de referencia}} - t_{\text{captura imagen referencia}}$$

Después se calcula el tiempo y la presión ajustadas de suministro de presión para cada imagen. El  $t_{ajustado}$  es el tiempo de captura de cada imagen a partir del inicio de suministro de la presión. La  $p_{ajustada}$  es la presión calculada, a un  $t_{ajustado}$ , para cada cuadro.

$$t_{ajustado} = t_{captura\ imagen} + \Delta t$$

$$p_{ajustada} = \frac{t_{ajustado}}{m}$$

De estas ecuaciones se obtiene la presión a la que se está sometiendo el líquido dentro del canal en cada una de las imágenes capturadas por la cámara. Con el equipo de control microfluídico Elveflow se midió la presión que se suministra al dispositivo, y con estos datos se realizó una interpolación entre los valores experimentales y el valor de tiempo teórico, calculando así la presión experimental.

Mediante el uso del software ImageJ se realiza el análisis de datos obtenidos en los experimentos (Figura 4.8.)

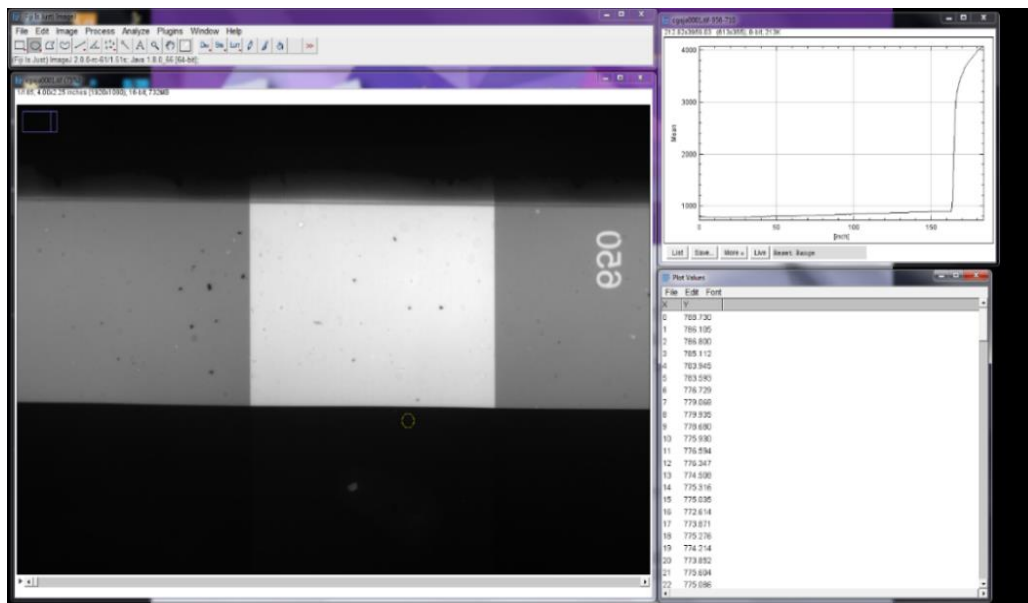


Figura 4. 8. Captura de pantalla del software ImageJ

Al realizar el análisis de datos de las imágenes éstas se ajustan con el método de valor umbral, en donde se clasifican los pixeles de la imagen de acuerdo con su intensidad en un histograma. Al rango de intensidad más alto se le asigna el color blanco, que al inicio de la secuencia de imágenes (stack), representa la fluoresceína dentro del canal. Al rango de intensidad más bajo se le asigna el color negro que representa la estructura de oro y los alrededores del canal. (Figura 4.9.)

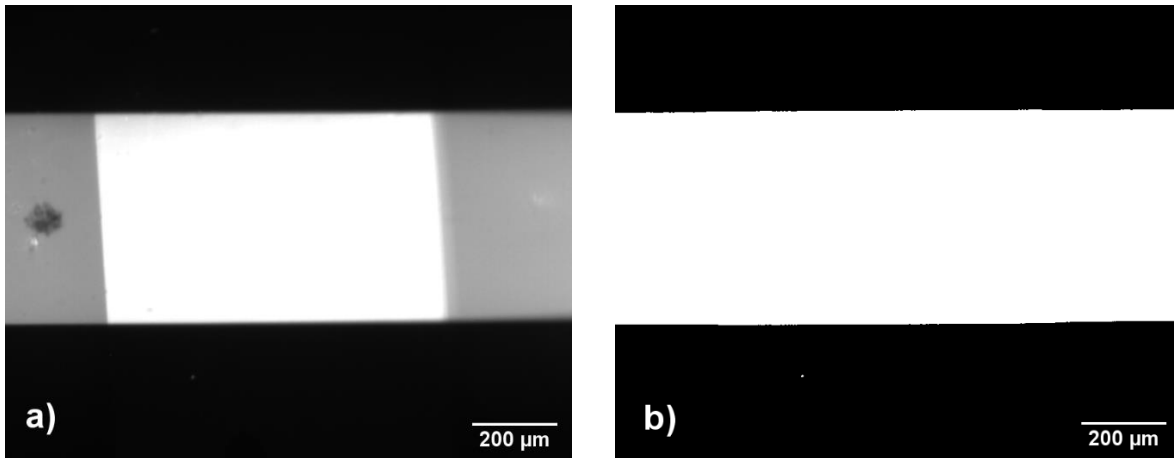


Figura 4. 9. Estructura de oro de 770 µm de ancho. a) sin valor umbral b) con umbral.

El método del valor umbral nos ayuda a ver claramente la fuga de la fluoresceína sobre la estructura de oro. Se traza una línea que va paralela al canal a una distancia de 0.03 mm de la pared del canal. La presión de fuga en los electrodos se toma el valor al cual la disolución de fluoresceína cruza esta línea (Figura 4.10.).

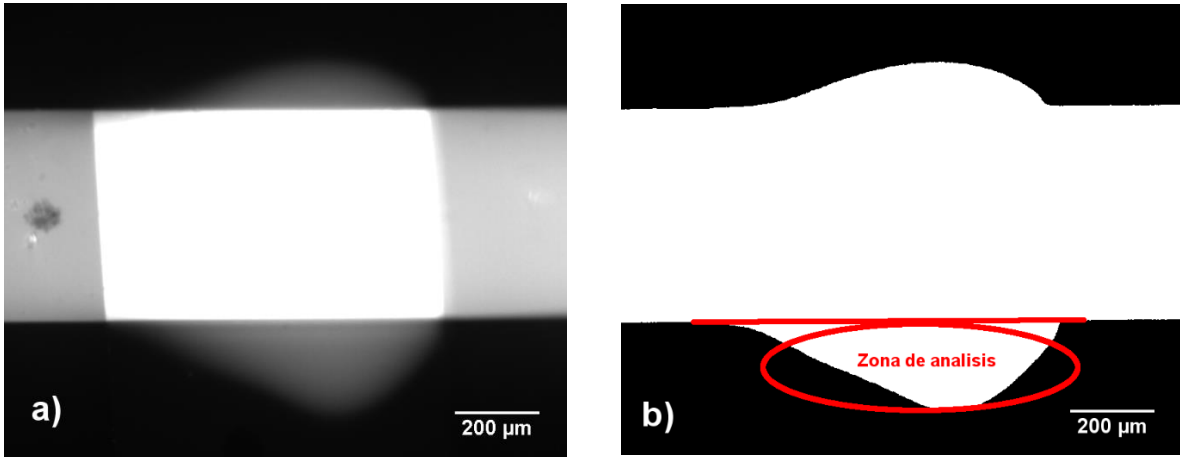


Figura 4. 10. Fuga de fluoresceína a través del electrodo. a) sin valor umbral b) con umbral.

### 4.3.1 Resultados y Discusión

Se analizaron las imágenes de la fuga de la fluoresceína sobre la estructura de oro de 770  $\mu\text{m}$  (Figura 4.11.a). En la figura se observa como el canal está lleno de fluoresceína, representado con los colores falsos naranja, rojo y blanco; mientras que el exterior del canal está representado de color azul (Figura 4.11.b), y al ir aumentando la presión, la fluoresceína se fuga a 35 kPa (Figura 4.11.c)

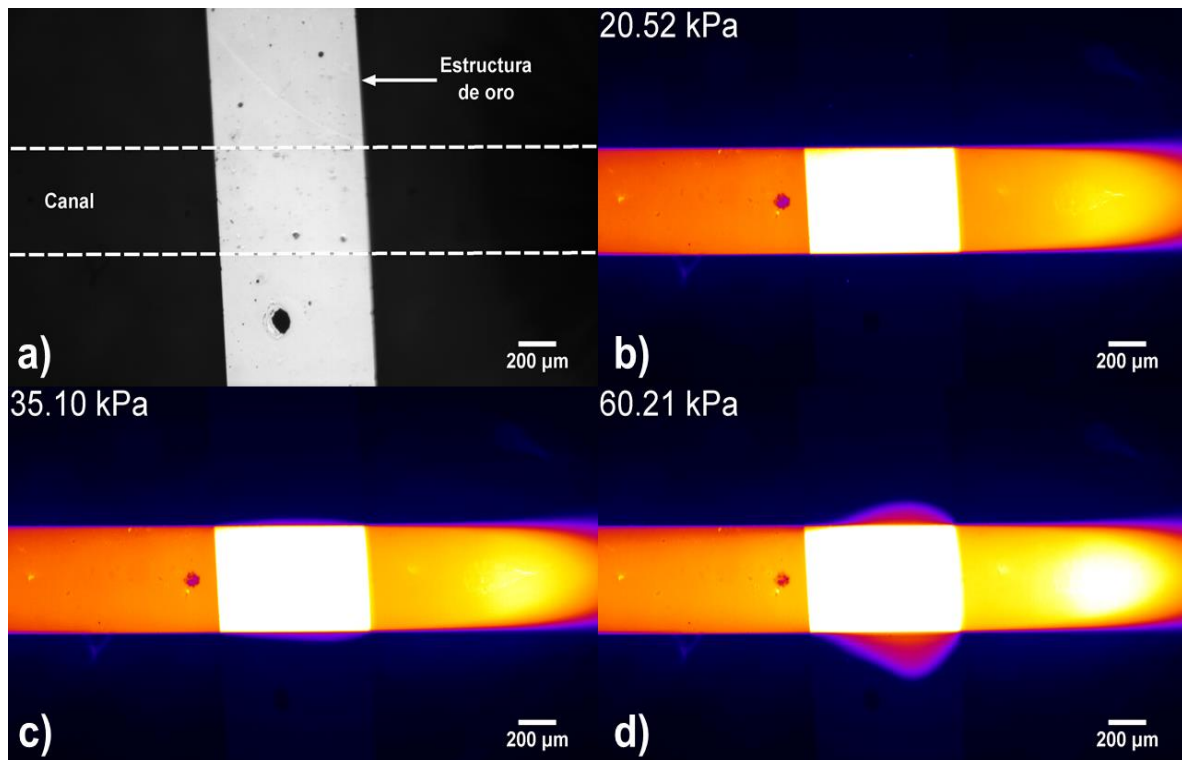


Figura 4. 11. Estructura de oro de 770  $\mu\text{m}$ . a) campo claro, b), c) y d) imágenes de fluorescencia a presiones de 20.52, 35.10 y 60.21 kPa, respectivamente. Imágenes obtenidas del microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti-U.

De la misma manera se analizaron las imágenes de la fuga en la estructura de 4  $\mu\text{m}$  con el diafragma de campo cerrado del microscopio. Esto nos permite iluminar solo la estructura de oro para ver la fuga con más detalle, debido a que si se usa el diafragma de campo abierto, se tiene ruido por la luz reflejada dentro del canal (Figura 4.12.a). En estas imágenes se observa cómo es necesaria una presión de 222 kPa para romper la interfase PDMS-oro para que fugue la fluoresceína (Figura 4.12.b-d).

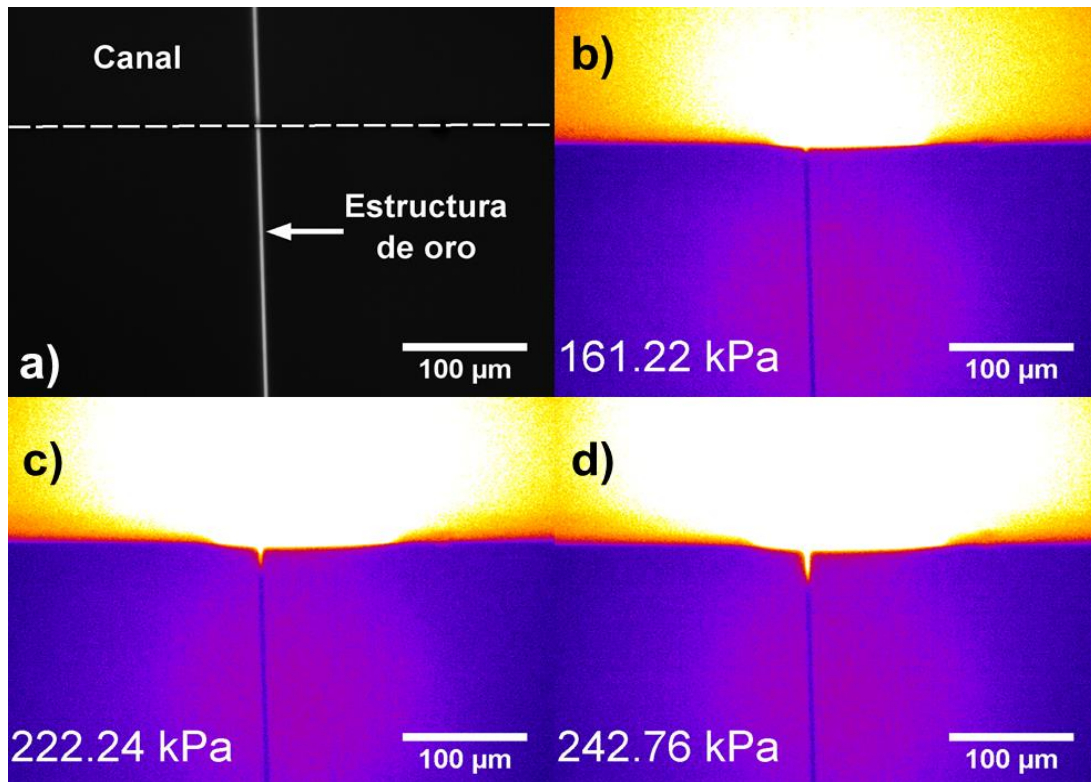


Figura 4. 12. Estructura de oro de 4  $\mu\text{m}$ . a) campo claro, b), c) y d) imágenes de fluorescencia a presiones de 161.22, 222.24 y 242.76 kPa, respectivamente. Imágenes obtenidas del microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti-U.

A continuación, se muestran extractos de tablas de la variación de presión de fuga y su consecuente análisis de imágenes en los cuadros alrededor del cual se presentó la fuga a diferentes anchos de la estructura de oro.

Tabla 3 Presiones calculadas de una estructura de oro de 770  $\mu\text{m}$  obtenidas a partir del análisis de imágenes

N° Cuadro	Valor Binario	T <sub>captura imagen</sub> (s)	T <sub>ajustado</sub> (s)	Presión (kPa)
137	0	54.8	53.13	35.42
138	0	55.2	53.53	35.69
139	0	55.6	53.93	35.95
140	255	56	54.33	36.22
141	255	56.4	54.72	36.49
142	255	56.8	55.13	36.75
143	255	57.2	55.53	37.02

Tabla 4 Presiones calculadas de una estructura de oro de 500  $\mu\text{m}$  obtenidas a partir del análisis de imágenes

<b>N° Cuadro</b>	<b>Valor Binario</b>	<b>T<sub>captura imagen</sub> (s)</b>	<b>T<sub>ajustado</sub> (s)</b>	<b>Presión (kPa)</b>
156	0	62.4	59.62	39.75
157	0	62.8	60.02	40.01
158	0	63.2	60.42	40.28
159	255	63.6	60.82	40.55
160	255	64	61.22	40.81
161	255	64.4	61.62	41.08
162	255	64.8	62.02	41.35

Tabla 5 Presiones calculadas de una estructura de oro de 300  $\mu\text{m}$  obtenidas a partir del análisis de imágenes

<b>N° Cuadro</b>	<b>Valor Binario</b>	<b>T<sub>captura imagen</sub> (s)</b>	<b>T<sub>ajustado</sub> (s)</b>	<b>Presión (kPa)</b>
182	0	72.8	69.96	46.64
183	0	73.2	70.36	46.90
184	0	73.6	70.76	47.18
185	255	74	71.16	47.44
186	255	74.4	71.56	47.71
187	255	74.8	71.96	47.98
188	255	75.2	72.36	48.24

Tabla 6 Presiones calculadas de una estructura de oro de 100  $\mu\text{m}$  obtenidas a partir del análisis de imágenes

<b>N° Cuadro</b>	<b>Valor Binario</b>	<b>T<sub>captura imagen</sub> (s)</b>	<b>T<sub>ajustado</sub> (s)</b>	<b>Presión (kPa)</b>
278	0	111.2	109.56	78.26
279	0	111.6	109.96	78.54
280	0	112	110.36	78.83
281	255	112.4	110.76	79.11
282	255	112.8	111.16	79.40
283	255	113.2	111.56	79.68
284	255	113.6	111.96	79.97



Tabla 7 Presiones calculadas de una estructura de oro de 40  $\mu\text{m}$  obtenidas a partir del análisis de imágenes

<b>N° Cuadro</b>	<b>Valor Binario</b>	<b>T<sub>captura imagen</sub> (s)</b>	<b>T<sub>ajustado</sub> (s)</b>	<b>Presión (kPa)</b>
164	0	65.6	188.26	125.508
165	0	66	188.66	125.78
166	0	66.4	189.06	126.04
167	255	66.8	189.46	126.31
168	255	67.2	189.86	126.58
169	255	67.6	190.26	126.84
170	255	68	190.66	127.11

Tabla 8 Presiones calculadas de una estructura de oro de 4  $\mu\text{m}$  obtenidas a partir del análisis de imágenes

<b>N° Cuadro</b>	<b>Valor Binario</b>	<b>T<sub>captura imagen</sub> (s)</b>	<b>T<sub>ajustado</sub> (s)</b>	<b>Presión (kPa)</b>
226	0	90.4	332.23	221.49
227	0	90.8	332.63	221.75
228	0	91.2	333.03	222.02
229	255	91.6	333.43	222.29
230	255	92	333.83	222.55
231	255	92.4	334.23	222.82
232	255	92.8	334.63	223.09

En las tablas 3-8 se observa como el valor binario de 0 que corresponde al color negro de la imagen con valor umbral, cambia a 255 que corresponde al color blanco (fluoresceína), para cada ancho de electrodo. En ese momento se considera que ocurre la fuga.

Se realizaron experimentos por triplicado para cada estructura de oro, y se calculó la presión de fuga promedio y la desviación estándar como indicadores estadísticos de la precisión de las mediciones.

Tabla 9 Presiones de fuga promedio (n=3)

<b>Ancho de estructuras de oro (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Presión de fuga promedio (kPa)</b>	<b>Desviación Estándar (kPa)</b>
770	32.09	5.38
700	31.82	4.16
650	32.91	1.38
600	38.50	2.26
550	28.43	9.04
500	28.49	5.94
450	31.04	8.75
400	35.99	5.35
350	53.92	8.53
300	44.69	1.83
200	50.96	6.20
100	70.73	6.67
50	106.00	14.13
40	120.09	5.59
26	135.24	4.14
20	147.58	5.78
4	238.32	21.60

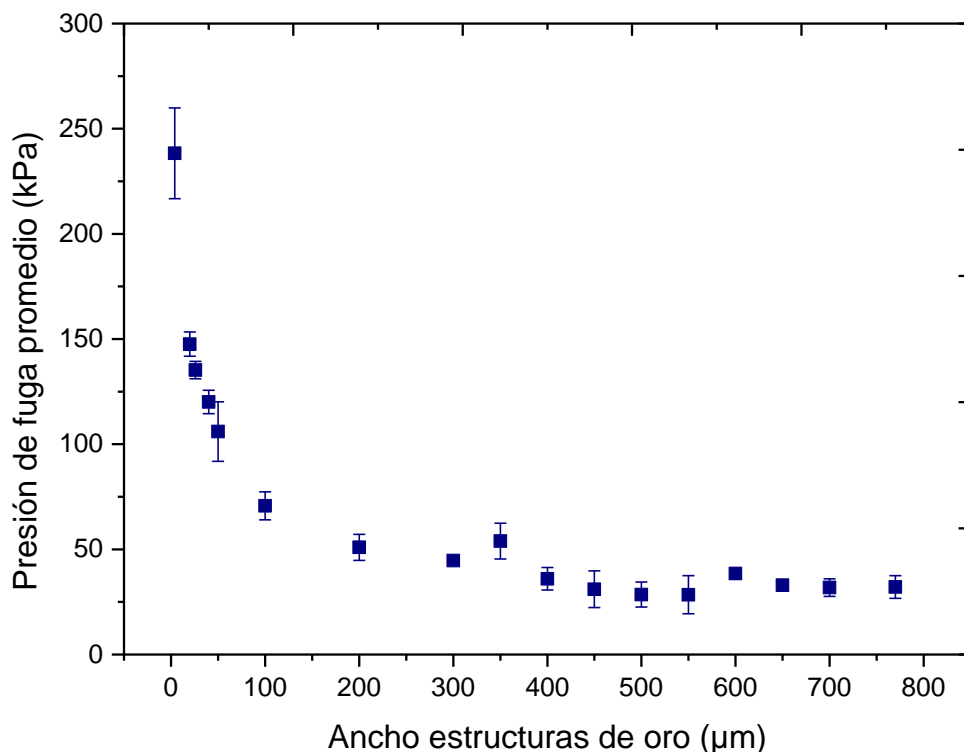


Figura 4. 13. Experimentos de presión de fuga con anchos de electrodo de 4 a 770  $\mu\text{m}$ .

Como se puede observar en la tabla 9 y la Figura 4.13., en los electrodos de 100 a 4  $\mu\text{m}$  se tienen los valores más altos de presión de fuga, que van de 70 a 238 kPa, mientras que en los demás anchos la fuga se mantiene en un rango de 28 a 53 kPa. Con esto se puede concluir que la fabricación de celdas electroquímicas microfluídicas, la mejor opción es usar conectores de 4  $\mu\text{m}$ , el cual soporta una presión de 238 kPa. Los dispositivos microfluídicos fabricados con PDMS-vidrio sellados con plasma y que no tienen electrodos, tienen rango de presión de fuga de 205 a 345 kPa.[5] Por lo tanto las presiones de fuga entre un dispositivo electroquímico microfluídico usando un ancho de conector de 4  $\mu\text{m}$  y uno sin electrodos son comparables.

La influencia del ancho de la estructura de oro en la presión de fuga se puede deber a que alrededor del electrodo hay una fuerza de enlace muy fuerte en la interfase PDMS-vidrio. Lo esperado era que, al reducir el ancho de la estructura de oro,

**Estas páginas fueron eliminadas debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública 2017, y con el Artículo 116 de la Ley General de Transparencia y Acceso a la Información Pública 2015.**

## CAPÍTULO 5: EVALUACIÓN ELECTROQUÍMICA

Como se vio en la sección 4.3.1, el conector que tuvo mayor resistencia a la presión de fuga fue el de 4  $\mu\text{m}$ , por lo que, desde este punto de vista, se pueden fabricar las celdas electroquímicas microfluídicas siguiendo esta nueva pauta. Sin embargo, se debe corroborar que el tamaño del conector no influya en la resistencia eléctrica en el sistema. Para ello fue necesario realizar una evaluación electroquímica, donde se fabricaron celdas electroquímicas microfluídicas con electrodos de oro, y se depositó Ag/AgCl en uno de los electrodos de oro para fabricar el electrodo de pseudoreferencia.

### 5.1. Diseño en software

Se hicieron los diseños mostrados en la Figura 5.1. en el software Layout Editor. Los diseños incluyen canales con dimensiones de 1200 x 16000  $\mu\text{m}$ , un electrodo de pseudoreferencia, un electrodo auxiliar y tres electrodos de trabajo para aprovechar el tamaño de la celda, los cuales varían su ancho de conector de 4 a 770  $\mu\text{m}$  en la interfase PDMS/oro. Estos conectores están unidos a un rectángulo hecho de oro que tiene un área de 70000  $\mu\text{m}^2$ .

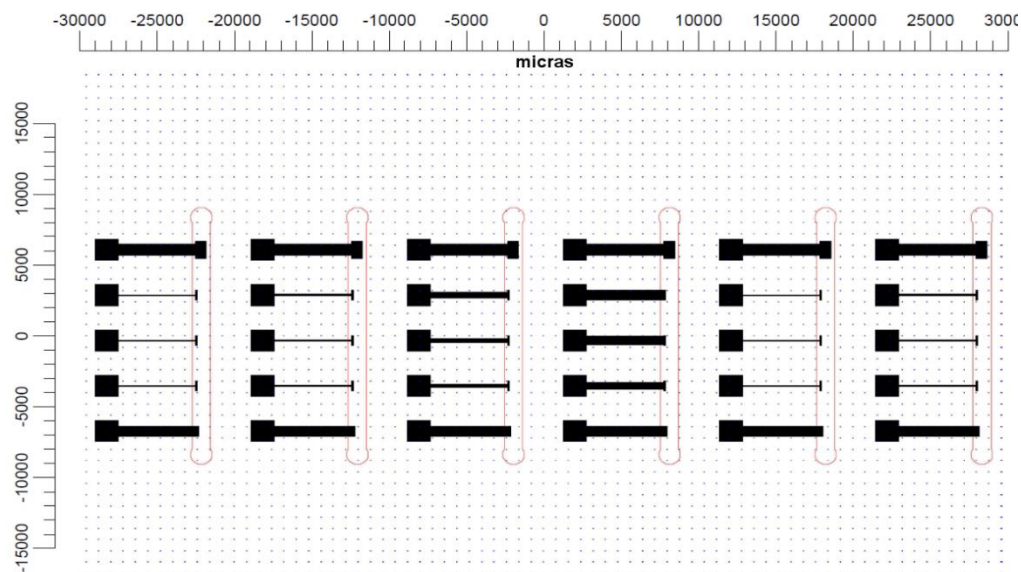


Figura 5. 1. Diseño de la celda electroquímica, en negro los electrodos y en rojo los canales, para la fabricación de las celdas electroquímicas

La relación entre el área de los rectángulos del electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar es de 1:10. Debido a esta consideración se diseñaron los electrodos en forma de T, así no habría una gran variación de las áreas de los electrodos de trabajo, como sucedería si fuera una extensión del conector.

## 5.2 Fabricación de electrodos

Se fabricaron los electrodos de acuerdo con la técnica de lift-off descrita en la sección 3.2.1 y 3.3. La fabricación del electrodo de pseudoreferencia se explica detalladamente en la sección 5.5.

## 5.3. Fabricación de canales

De la misma manera se fabricaron los canales con la técnica de litografía suave descrita en la sección 3.2.2 y 3.4.2

## 5.4. Sellado con Plasma

El sellado se hace de acuerdo con lo descrito en la sección 3.4.1. y 3.4.3., para obtener las celdas electroquímicas microfluídicas (Figura 5.2.).

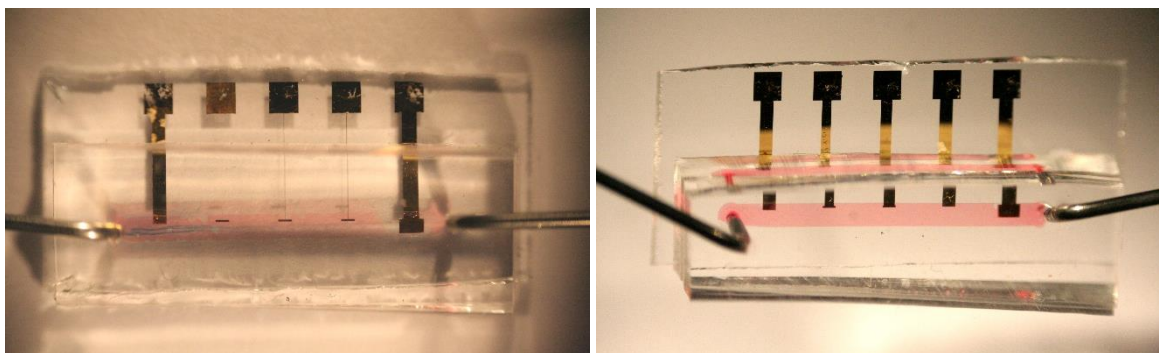


Figura 5. 2. Celdas electroquímicas microfluídicas utilizadas para los experimentos.

El área de los electrodos se diseñó para que sean las mismas para todos los conectores, pero debido a que el sellado se hace manualmente, la alineación no es perfecta, por lo que el área del electrodo incluirá una parte del conector. Para calcular el área que estará expuesta a la solución se realizan captura de imágenes

con la cámara del microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti-U, y se analizan las imágenes con el software imageJ.

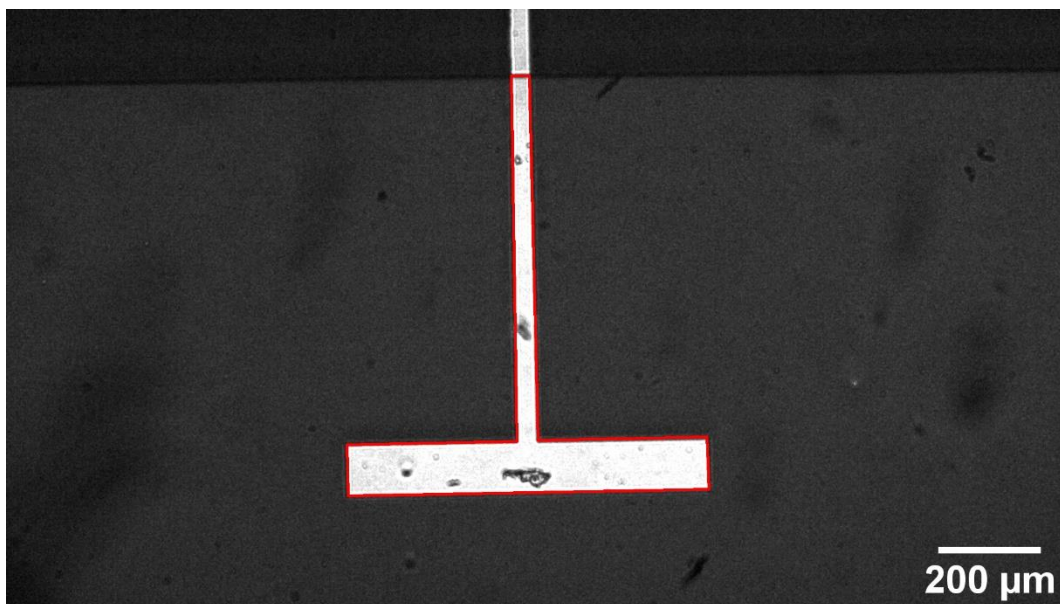


Figura 5. 3. Imagen del electrodo con conector de 40  $\mu\text{m}$ . La línea roja es el área del electrodo.

Con el software imageJ, se usa la opción de polígono para trazar el área del electrodo (Figura 5.3.). Una vez trazado el polígono se usa la opción medir del menú analizar para calcular el área del electrodo.

### 5.5 Fabricación de electrodos de pseudoreferencia de Ag/AgCl

La fabricación del electrodo de pseudoreferencia de Ag/AgCl (es de pseudoreferencia debido a que su potencial depende de la concentración de cloruros en la solución) se realiza en dos fases: la fabricación de los electrodos de Ag y la adición de cloruro a la porción recubierta de plata para tener el par redox Ag/AgCl. Dos métodos comunes para fabricar un electrodo de referencia de Ag son el depósito físico a vapor (PVD) y el electrodeposición.

Un método alternativo al PVD de Ag es el electrodeposición de Ag en los electrodos de Au existentes. El electrodeposición de Ag requiere sumergir el electrodo en una

solución de  $\text{Ag}^+$  y reducir el ión  $\text{Ag}^+$  en solución sobre la superficie del electrodo. Para ello se utilizó la técnica de cronopotenciometría. Se aplicó un tren de pulsos a los electrodos de oro (Figura 5.4.a) con una densidad de corriente catódica de  $0.82 \text{ mA/cm}^2$  en una solución  $0.015 \text{ M}$  de ácido cítrico,  $0.015 \text{ M}$  de  $\text{HNO}_3$  y  $0.1 \text{ M}$   $\text{AgNO}_3$  para depositar plata (470 ciclos de 1 segundo a  $-3.3 \times 10^{-6} \text{ A}$  seguido de 5 segundos a  $0 \text{ A}$ ), esto con el fin de obtener una capa uniforme de plata y no generar un crecimiento dendrítico de la misma (Figura 5.4.b).[49]

Los electrodos de plata se sometieron a un depósito de cloruros, oxidando el electrodo de  $\text{Ag}$  para formar una capa de  $\text{AgCl}$  (Figura 5.4.c). Los electrodos de  $\text{Ag}$  fueron pulsados en solución de  $\text{KCl}$   $3 \text{ M}$  usando la técnica de cronopotenciometría con una densidad de corriente anódica de  $0.39 \text{ mA/cm}^2$  (470 ciclos de 1 segundo a  $1.32 \times 10^{-6} \text{ A}$  seguido de 5 segundos a  $0 \text{ A}$ ).

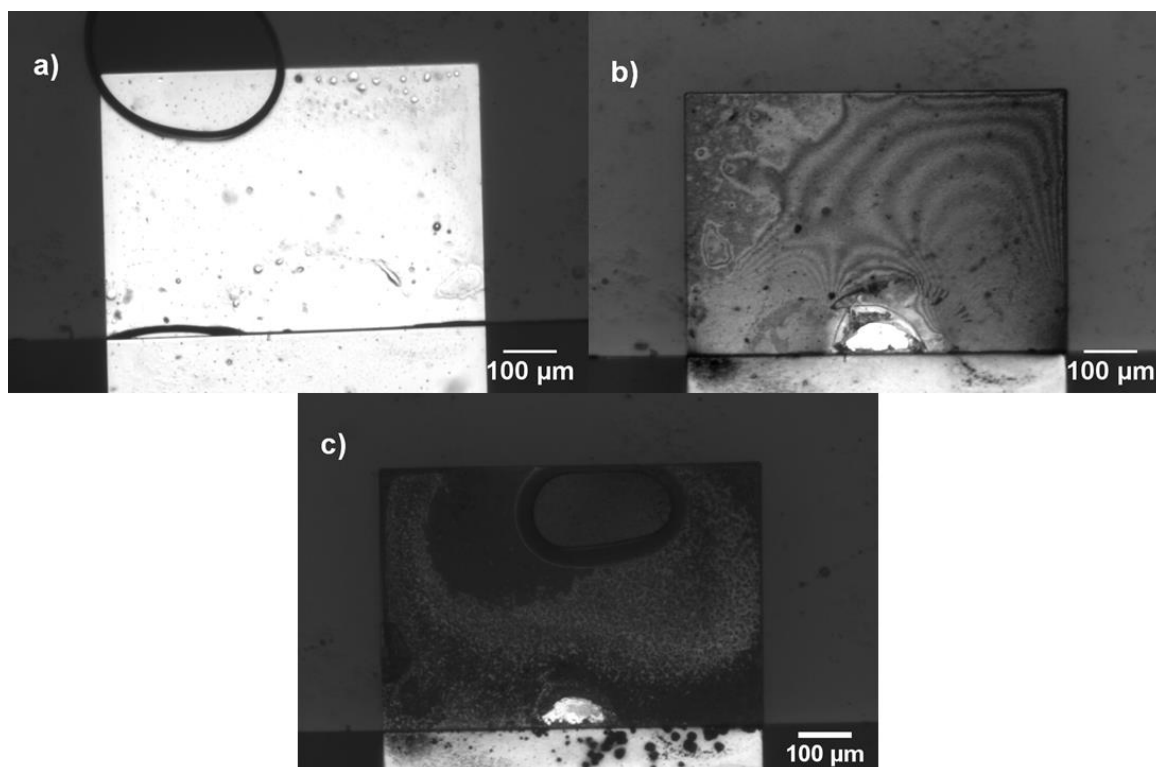


Figura 5. 4. Electrodo de referencia. a) sin depósito, b) Depósito de  $\text{Ag}$ , c) Formación de  $\text{AgCl}$ . Imágenes obtenidas del microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti-U.



## 5.6 Resultados y Discusión

En todos los experimentos se realizó una limpieza de los electrodos de trabajo con voltamperometría cíclica en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5 M, una ventana de potencial de -0.1 a 1.3 V y una velocidad de barrido de 100-200 mV/s.

### 5.6.1 Celda electroquímica macroscópica

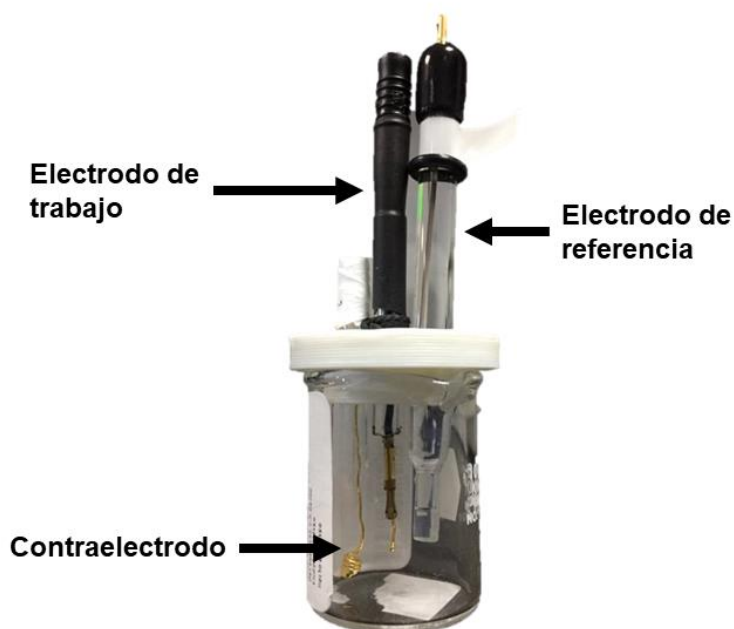
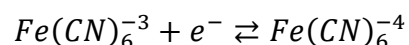


Figura 5. 5. Celda electroquímica macroscópica para la reacción redox de ferri/ferrocianuro de potasio. Electrodo de trabajo de oro, electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl saturado, contraelectrodo de oro.

Se realizaron los experimentos en una celda electroquímica macroscópica (Figura 5.5.) para tener una referencia de la diferencia de potenciales de pico catódico y anódico y compararlo con las celdas electroquímicas microfluídicas, realizando la siguiente reacción redox:



Las velocidades de barrido que se utilizaron fueron de 100, 200, 300, 400 y 500 mV/s. Como se muestra en la Figura 5.6., la corriente de pico aumenta conforme se

incrementa la velocidad de barrido. La corriente de pico varía linealmente con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, comportamiento típico de los procesos controlados por difusión y describe la ecuación de Randles-Sevcik (Figura 5.7.).[13, 14]

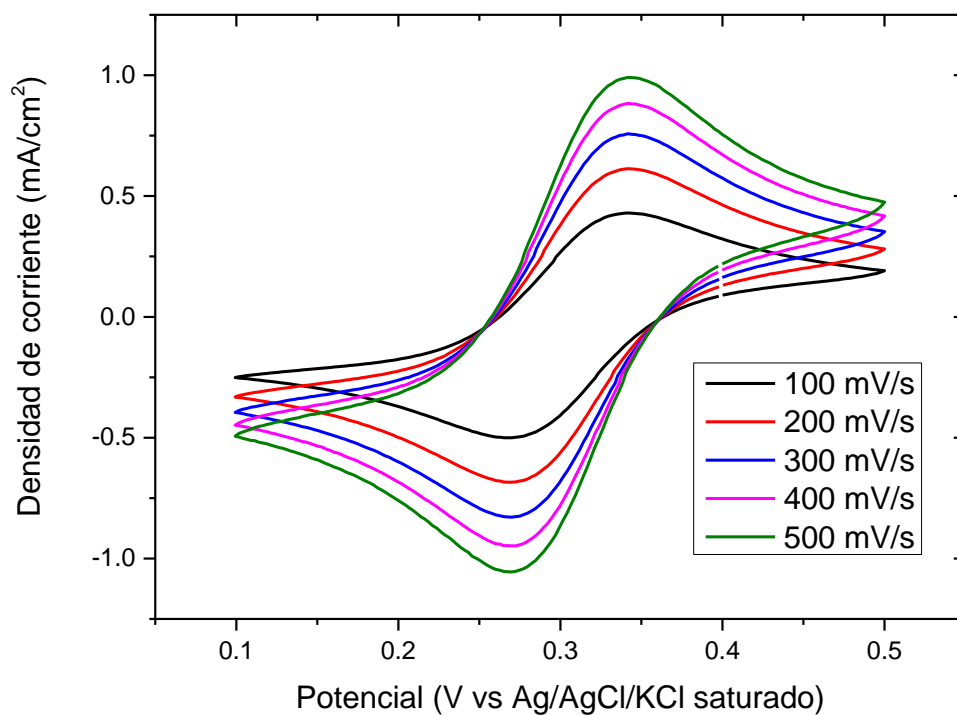


Figura 5. 6. Voltamperometría Cíclica de  $K_3[Fe(CN)_6]$  0.002 M en KCl 3 M a diferentes velocidad de barrido, electrodo de trabajo de oro.

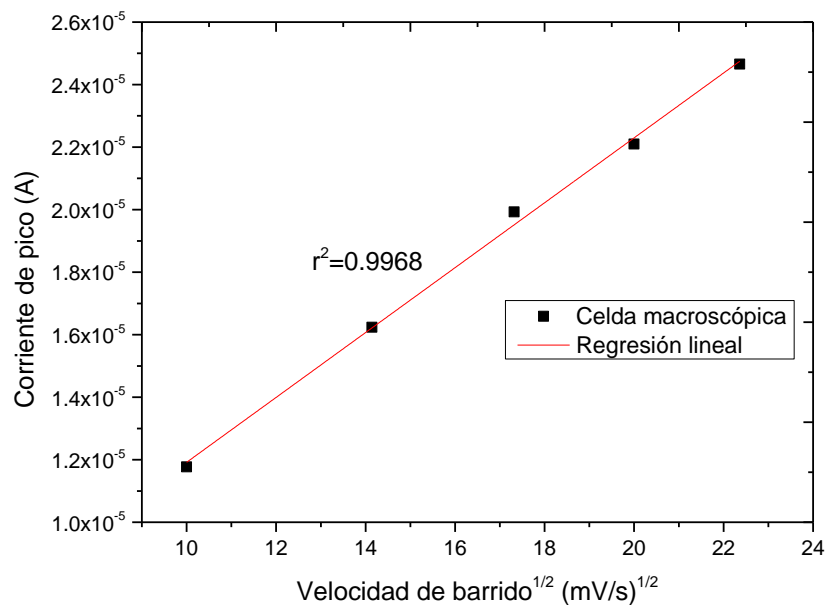


Figura 5. 7. Gráfica de la corriente de pico en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido del voltamperograma cíclico de  $K_3[Fe(CN)_6]$  0.002 M en KCl 3 M, electrodo de trabajo de oro.

De estos voltamperogramas de la Figura 5.6., se obtuvieron los potenciales de pico anódico y catódico, para obtener la diferencia de pico.

Tabla 10 Diferencia de potencial de pico a diferentes velocidades de barrido para una celda macroscópica

Velocidad de Barrido (mV/s)	Diferencia de potencial de pico (mV)	Desviación estándar (mV)
100	58.86	2.57
200	59.82	1.84
300	57.78	1.73
400	58.33	1.47
500	59.68	1.77

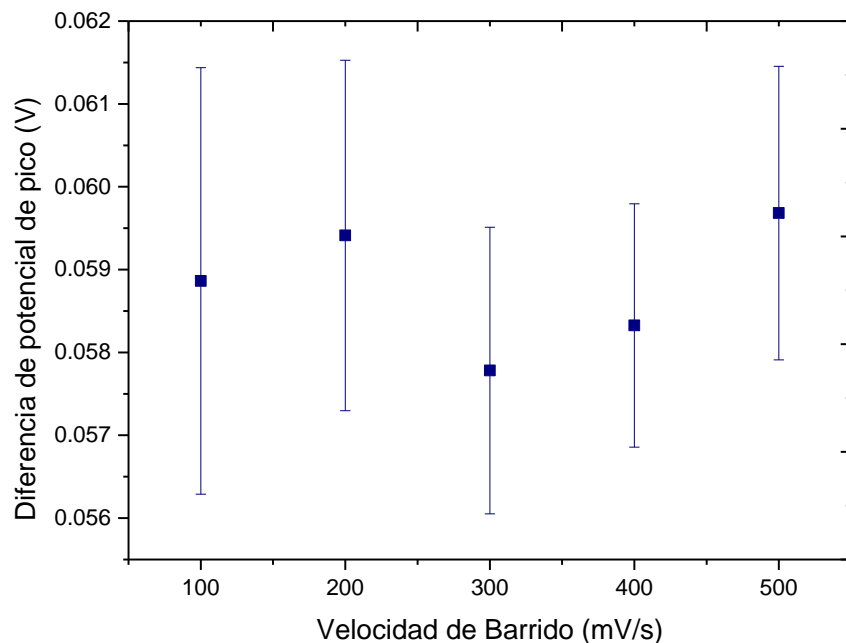


Figura 5. 8. Diferencia de pico de los potenciales anódicos y catódicos a velocidades de barrido de 100, 200, 300, 400 y 500 mV/s, en una celda macroscópica.

En la tabla 10 y Figura 5.8. se puede observar que la diferencia de potencial de pico en promedio para diferentes velocidades de barrido es de aproximadamente 59 mV, lo cual comprueba que la reacción efectivamente es reversible de acuerdo con la literatura para un electrón transferido y procesos controlados por difusión.[13]

### 5.6.2 Cálculo de resistencia del oro

Se realizaron experimentos para medir la resistividad del oro mediante la técnica de las 4 puntas, usando el instrumento Keithley SourceMeter 2450 para estas pruebas, obteniendo una curva de potencial vs corriente y, calculando a partir de ésta la pendiente que es la resistencia del oro (Figura 5.9.).

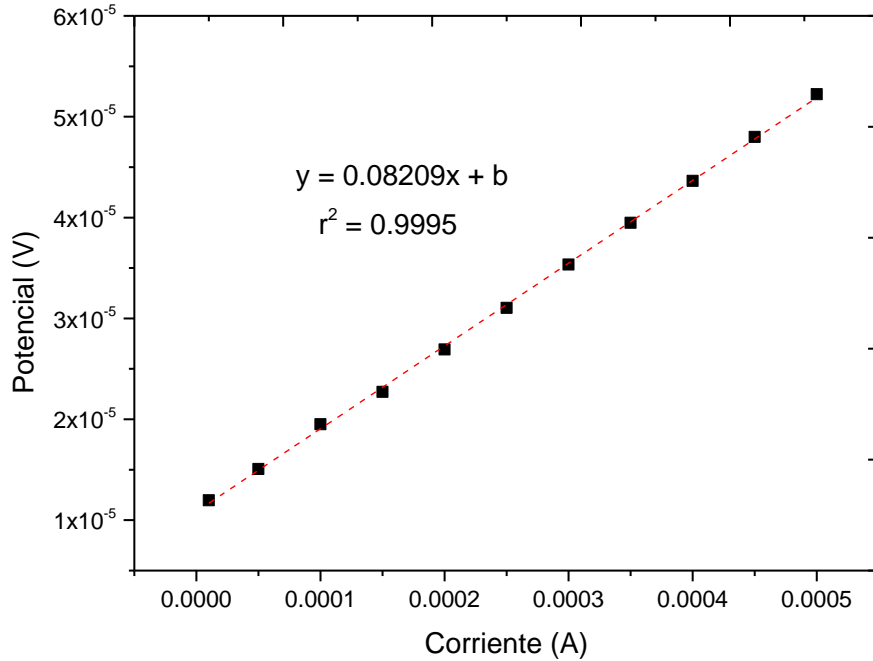


Figura 5. 9. Cálculo de la resistencia del oro a partir de la curva de potencial vs corriente

Utilizando la ecuación de resistividad de un material:

$$\rho = R \frac{S}{\ell}$$

donde  $R$  es la resistencia del material,  $S$  es la sección transversal del material y  $\ell$  la longitud, se obtiene la resistividad del material de  $4.0226 \times 10^{-8} \Omega \cdot m$ , el cual tiene el mismo orden de magnitud con respecto a lo reportado en la literatura.[25]

### 5.6.3 Cálculo de la caída óhmica

Teniendo los datos de la diferencia de potencial de pico en una celda electroquímica macroscópica, y usándolos como referencia, se procede a realizar las voltamperometrías cíclicas de la reacción de Ferri/Ferrocianuro de potasio en las celdas electroquímicas microfluídicas.

Tabla 11 Cálculo del área del electrodo y el conector

Ancho de conector ( $\mu\text{m}$ )	Área del electrodo( $\text{cm}^2$ )
4	$7.07 \times 10^{-4}$
20	$7.19 \times 10^{-4}$
26	$7.49 \times 10^{-4}$
40	$9.03 \times 10^{-4}$
50	$9.38 \times 10^{-4}$
100	$1.35 \times 10^{-3}$

En la tabla 11 se muestra el área de los electrodos medida a partir de análisis de imagen mostrado en la sección 5.4., las cuales se utilizan para calcular la densidad de corriente,  $\text{mA}/\text{cm}^2$ .

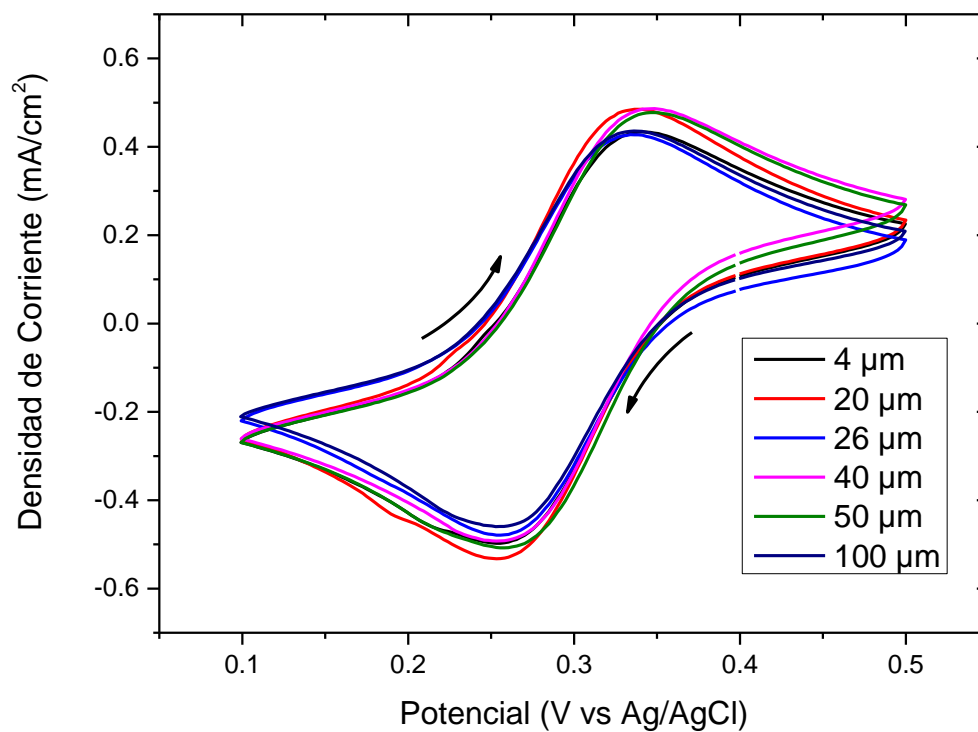


Figura 5. 10. Voltamperometría Cíclica de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  0.002 M en KCl 3 M a una velocidad de barrido de 100  $\text{mV}/\text{s}$ , electrodo de trabajo de oro con diferentes anchos de conector.

En la Figura 5.10. se observa la reacción reversible del par ferri/ferrocianuro de potasio, en el que se aprecian los picos anódicos y catódicos de la reacción. Estos experimentos de voltamperometría cíclica se hicieron con diferentes anchos del conector del electrodo de trabajo. Las corrientes están normalizadas por el área de electrodo de cada conector.

A partir de estos voltamperogramas, se obtuvieron las corrientes de pico para cada ancho de conector a una velocidad de barrido de 500 mV/s, y en conjunto con la resistencia del oro obtenida mediante la técnica de cuatro puntas, se utilizaron para calcular la caída óhmica causada por el conector de oro.

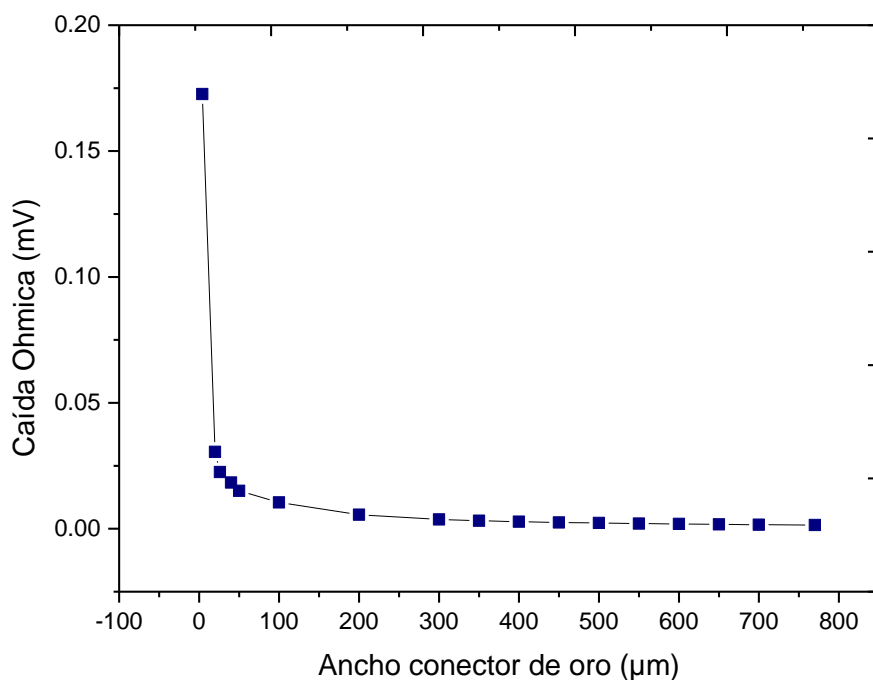


Figura 5. 11. Caída Óhmica calculada a diferentes anchos de conector.

A partir de la resistividad del oro se calcula la resistencia para cada ancho de electrodo, y utilizando la corriente de pico, se calcula la caída óhmica utilizando la ley de Ohm:

$$E_{iR} = i_p R$$

En la Figura 5.11. se observa que la caída óhmica calculada más alta es de 0.17 mV, por lo que la contribución del conector a la resistencia del sistema es despreciable para las mediciones electroquímicas que se lleven a cabo en la celda electroquímica microfluídica.

La caída óhmica es despreciable en los microelectrodos en general[14, 16, 17], pero al fabricar los conectores a las dimensiones más pequeñas posibles por las técnicas de microfabricación, era necesario calcular la caída óhmica para estos casos y comprobar que la caída óhmica es despreciable.

Una vez comprobado que la contribución del conector a la resistencia es despreciable, se procede a obtener la diferencia de potencial de pico para cada conector (Tabla 12), esto se realiza para comprobar que efectivamente el ancho del conector no afecta en la diferencia de potencial de pico en los voltamperogramas.

Tabla 12. Diferencia de potencial de pico a diferentes velocidades de barrido y ancho de conector para una celda microfluídica.

Velocidad Barrido (mV/s)	Ancho de conector ( $\mu\text{m}$ )								
	4	20	26	40	50	100	200	300	400
100	68.08	68.36	67.14	66.83	66.18	62.39	62.39	63.17	63.48
200	65.10	67.14	66.41	60.76	61.84	61.30	63.47	63.20	63.75
300	63.47	64.83	63.20	60.49	59.95	60.22	61.84	62.66	62.26
400	62.39	62.74	63.23	58.32	60.22	59.13	60.76	61.30	62.94
500	62.12	62.01	60.54	59.95	59.67	60.22	61.57	62.11	60.23
	<b>Diferencia de potencial de pico (mV)</b>								



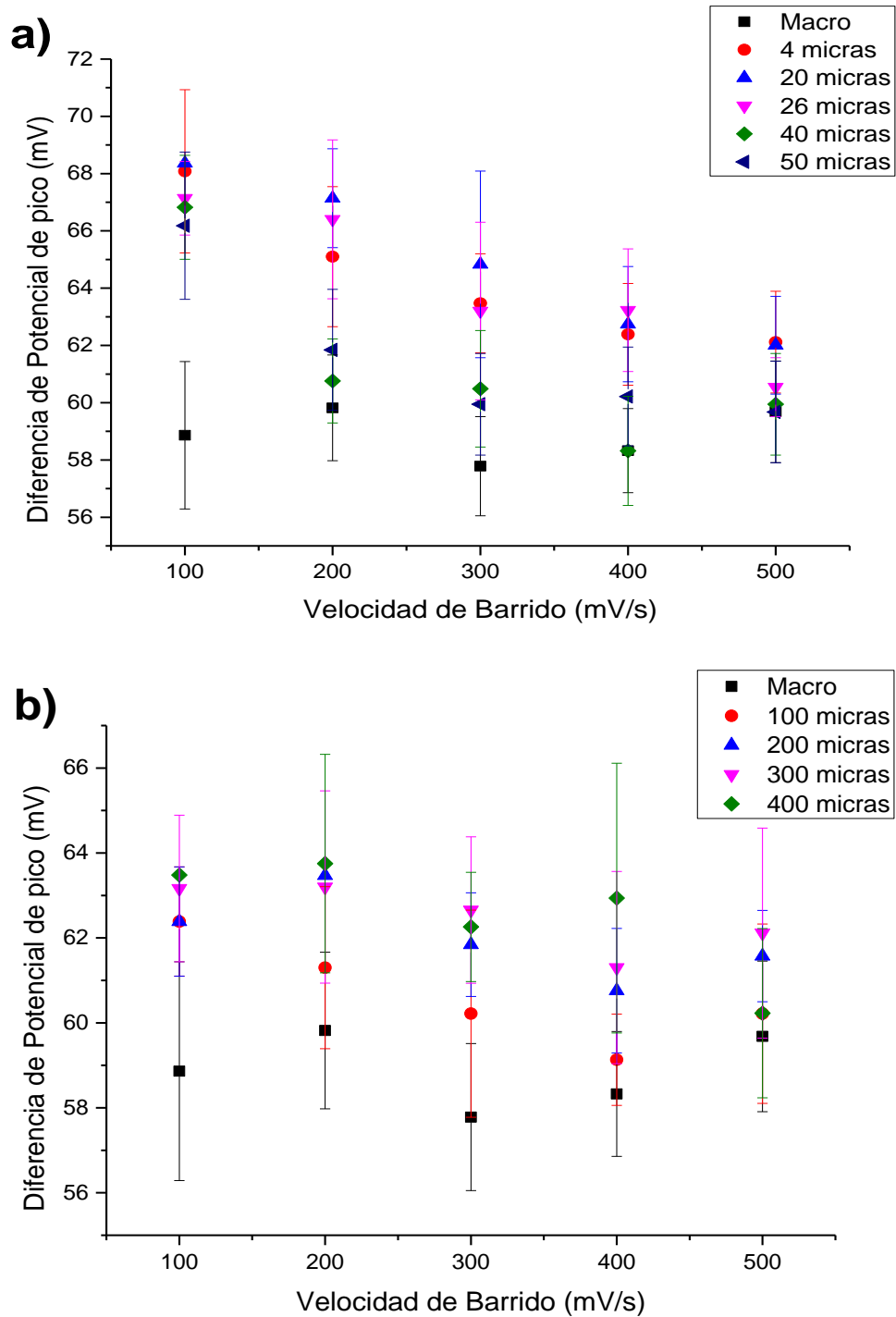


Figura 5. 12. Diferencia de potencial de pico,  $\Delta E_p$ , a diferentes velocidades de barrido, obtenidos de los voltamperogramas de  $K_3[Fe(CN)_6]$  0.002 M en KCl 3 M con diferentes anchos de conector. a) comparación de electrodos con conectores de 20 a 50  $\mu m$  con un electrodo convencional, b) Comparación de electrodos con conectores de 100 a 400  $\mu m$  con un electrodo convencional.

En la tabla 11 y Figura 5.12. se obtuvieron la diferencia de potencial de pico, para cada conector y velocidad de barrido, a partir de los experimentos realizados en las celdas electroquímicas microfluídicas. Como se puede observar en la Figura 5.12.b, los conectores de 100 a 400  $\mu\text{m}$  presentan una diferencia de potencial de pico,  $\Delta E_p$ , promedio de 62.85 mV a una velocidad de barrido de 100 mV/s. En estas condiciones, la incertidumbre de  $\Delta E_p$  para los electrodos con diferentes anchos de conector se traslapan entre ellos. Por lo tanto, al estar los valores de  $\Delta E_p$  cerca uno con otro, no son significativamente diferentes entre sí. Estos valores de  $\Delta E_p$  con sus incertidumbres se traspalan con la incertidumbre de la celda electroquímica macroscópica. El  $\Delta E_p$  de los conectores de 4 a 50  $\mu\text{m}$  una velocidad de barrido de 100 mV/s no están dentro de la incertidumbre la celda macroscópica, al tener una diferencia de potencial de pico promedio de 67.13 mV (Figura 5.12.a). Al aumentar la velocidad de barrido, la  $\Delta E_p$  de los conectores de 100 a 400  $\mu\text{m}$  se mantienen dentro de la incertidumbre de la celda macroscópica, mientras que en los conectores de 4 a 50  $\mu\text{m}$ , la diferencia de potencial de pico va reduciéndose hasta que al llegar a una velocidad de barrido de 500 mV/s, esta diferencia de potencial de pico entra dentro de la incertidumbre de la celda electroquímica macroscópica (Figura 5.13.).

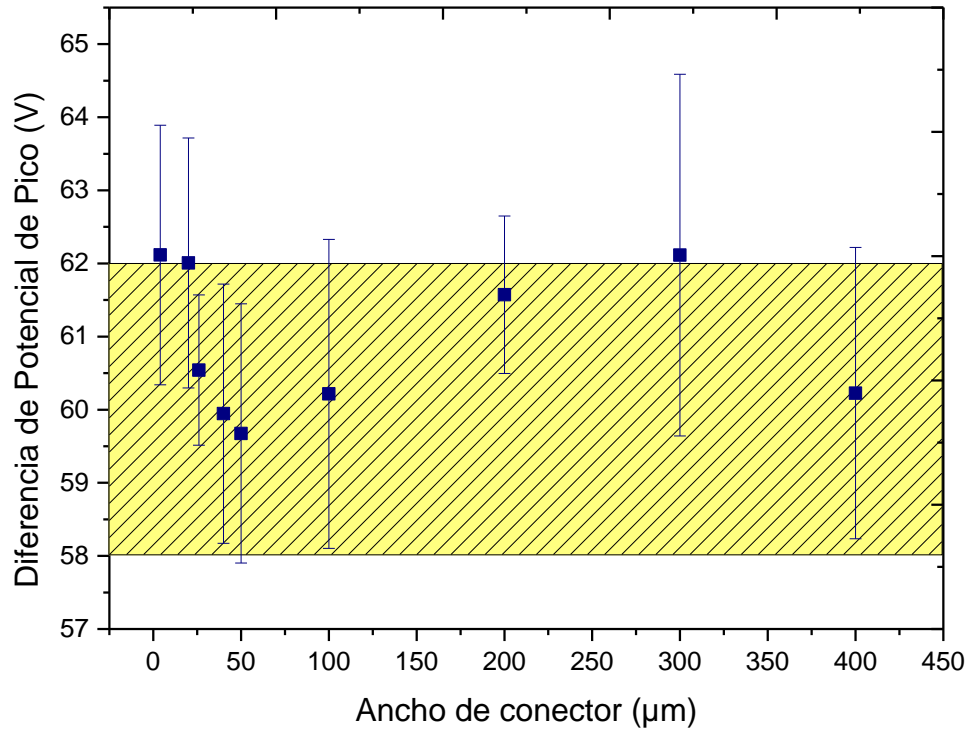


Figura 5. 13. Diferencia de potencial de pico,  $\Delta E_p$ , para cada ancho de conector a una velocidad de barrido de 500 mV/s. En amarillo la incertidumbre del  $\Delta E_p$  de la celda macroscópica.

Se esperaba que, a mayores velocidades de barrido, la caída óhmica fuera mayor. Esto es debido a que la corriente depende de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido de acuerdo con la ecuación de Randles-Sevcik, lo cual no sucede, sino que decrece. Tal como se observa en la Figura 2.6., los picos del voltamperograma en un microelectrodo se definen de mejor manera a medida que la velocidad de barrido aumenta, comportándose como un electrodo convencional. Esto es debido a que, a bajas velocidades, hay un alto transporte de masa por difusión hacia los microelectrodos, provocando que los voltamperogramas tengan forma sigmoideal, y al aumentar la velocidad de barrido, los picos de los voltamperograma se definen mejor y el  $\Delta E_p$  se reduce. Por lo tanto, se concluye que el  $\Delta E_p$  en los conectores de 4 a 50  $\mu\text{m}$  están en un régimen de transición entre el comportamiento de los electrodos convencionales y los microelectrodos.

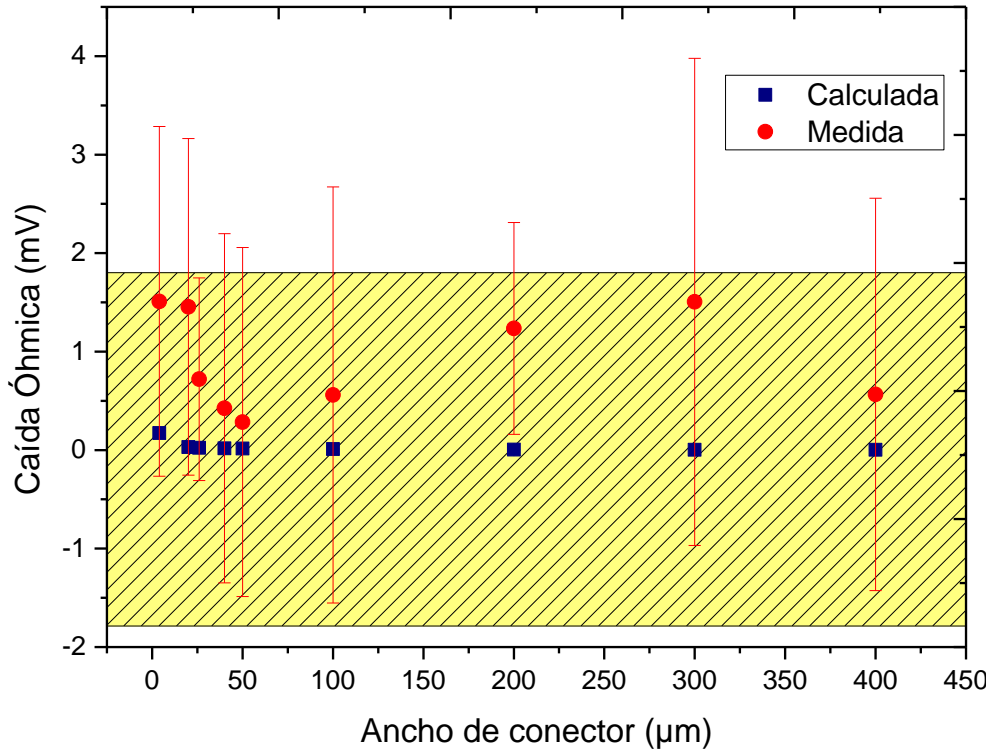


Figura 5.14. Caída óhmica calculada y medida a una velocidad de barrido de 500 mV/s. En amarillo la incertidumbre de la caída óhmica en la celda macroscópica.

La caída óhmica de los voltamperogramas de la celda electroquímica microfluídica se calculó con la siguiente ecuación:

$$E_{iR} = \frac{\Delta E_p - 59.1 \text{ mV}}{2}$$

Como se muestra en la Figura 5.14., la caída óhmica medida a partir de los voltamperogramas a 500 mV/s es mayor al de la caída óhmica calculada mediante la técnica de 4 puntas, pero estos valores están dentro de la incertidumbre de la celda macroscópica, por lo que la caída óhmica es despreciable a esta velocidad de barrido, y, por lo tanto, se pueden utilizar los conectores más pequeños para fabricar dispositivos electroquímicos confiables.

## 6. CONCLUSIONES

El desempeño de las celdas electroquímicas es muy importante debido a su alta sensibilidad. Por eso es necesario que el problema de las fugas en estos dispositivos sea resuelto, al tener el riesgo de falsas lecturas en las mediciones electroquímicas. Por ello los diferentes grupos de investigación han hecho un esfuerzo por buscar soluciones a este problema.

En este trabajo se utilizó como una variable el ancho del conector, en el método de sellado con plasma, el cual es de fácil aplicación, y ahorra tiempo y dinero, en comparación a otros métodos que atacan el problema de las fugas.

Se caracterizaron los procesos de litografía suave y lift-off satisfactoriamente para reproducir los diseños realizados en Layout Editor, para la posterior fabricación de los dispositivos electroquímicos microfluídicos.

Se utilizó microscopía de fluorescencia para analizar la fuga del electrolito que ocurre en cada uno de los anchos de los electrodos analizados en este trabajo. Debido a su alta sensibilidad óptica se pudieron obtener datos precisos de la presión de fuga, los cuales dieron como resultado que en un rango de ancho de conector de 770-400  $\mu\text{m}$  la presión de fuga promedio de 32 kPa, pero al ir reduciendo el ancho de conector de 350-4  $\mu\text{m}$  se obtienen presiones de fuga de 44 a 238 kPa. Por lo tanto, el conector de 4  $\mu\text{m}$  es la mejor opción para estos problemas de fuga, al concordar con los datos de presión de fuga con dispositivos microfluídicos sin electrodos hechos de PDMS y vidrio.

Se procedió a analizar el comportamiento de la presión de fuga al reducir el ancho del conector visto en la experimentación. Con este fin, se llevó a cabo una simulación simple de un material de polidimetilsiloxano, al cual se le aplicó una presión en una longitud determinada por los anchos de conector utilizados en la experimentación. Los resultados de la simulación tienen una tendencia similar a los

resultados experimentales, con lo que se concluyó que la deformación del PDMS tiene influencia en la presión de fuga.

Se calculó la caída óhmica de cada conector para demostrar que ésta no afecta en las mediciones electroquímicas. Se obtuvo que la caída óhmica máxima es de 0.17 mV para el conector de 4  $\mu\text{m}$ , por lo que se considera que es despreciable en las mediciones electroquímicas.

También se hicieron voltamperometrías cíclicas en celdas electroquímicas microfluídicas con diferentes anchos de conector. En un rango de ancho de conector de 20-50  $\mu\text{m}$ , se observó una diferencia de potencial de pico de 68 mV a una velocidad de barrido de 100 mV/s, pero al aumentar la velocidad de barrido hasta 500 mV/s, esta diferencia de potencial de pico se reduce hasta entrar en el rango de incertidumbre de la celda macroscópica. Esto se debe a que estos anchos de conector tienen un comportamiento de microelectrodo, donde a mayor velocidad de barrido mejor se define la forma de los picos catódicos y anódicos.

Con las pruebas de medición de fuga y la evaluación electroquímica se puede concluir que el uso de conectores de 4  $\mu\text{m}$  como un nuevo parámetro de fabricación que nos ayudará a tener dispositivos electroquímicos confiables.

## **6.1 Trabajo a Futuro**

El método de sellado por carboxil-amina se ha reportado anteriormente, obteniendo buenos resultados en las pruebas de fugas. Sin embargo, este método solo se ha probado con un ancho de electrodo. Por lo que a futuro se puede abordar este tema en los siguientes puntos:

- Caracterizar el proceso de modificación de las superficies de PDMS y sustratos de vidrio con oro, para tener un buen sellado.
- Realizar los experimentos de presión de fuga en los dispositivos sellados mediante este método.

- Comparar los resultados que se obtengan con los del método de plasma y concluir que método de sellado es mejor en los diferentes anchos a analizar.

En la simulación se optó por un modelo que nos permitió ver solo la tendencia de los experimentos debido a la deformación del PDMS y no toma en cuenta otros factores. Entonces para un futuro se propone un nuevo modelo para simular donde incluya todo el dispositivo y tome en cuenta el fluido, la interacción que hay entre la interfase PDMS/oro, el rompimiento de la interfase, y el fluido que se va filtrando en la interfase para así propagar el daño en la interfase.

Otra pregunta que surgió es que, si la deformación del PDMS afecta en el método de plasma, se podría modificar las propiedades mecánicas del PDMS para ver el efecto que tiene en la presión de fuga.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hardt S, Schönfeld F (2007) *Microfluidic Technologies for Miniaturized Analysis Systems*. Springer US, Boston, MA
2. Rios A, Escarpa A, Simonet B (2009) *Miniaturization of Analytical Systems: Principles, Designs and Applications*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK
3. Bruin GJM (2000) Recent developments in electrokinetically driven analysis on microfabricated devices. *Electrophoresis* 21:3931–3951 . doi: 10.1002/1522-2683(200012)21:18<3931::AID-ELPS3931>3.0.CO;2-M
4. Dolník V (2000) Capillary electrophoresis on microchip. *Electrophoresis* 21:41–54 . doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(20000101)21:1<41::AID-ELPS41>3.0.CO;2-7
5. McDonald JC, Duffy DC, Anderson JR, et al (2000) Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis* 21:27–40 . doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(20000101)21:1<27::AID-ELPS27>3.0.CO;2-C
6. McDonald JC, Whitesides GM (2002) Poly ( dimethylsiloxane ) as a Material for Fabricating Microfluidic Devices. *Acc Chem Res* 35:491–499 . doi: 10.1021/ac001132d
7. Nguyen NT, Wereley S (2006) *Fundamentals and applications of microfluidics*. Artech House Inc.
8. Sassa F, Morimoto K, Satoh W, Suzuki H (2008) Electrochemical techniques for microfluidic applications. *Electrophoresis* 29:1787–1800 . doi: 10.1002/elps.200700581
9. Rackus DG, Shamsi MH, Wheeler AR (2015) Electrochemistry, biosensors and microfluidics: a convergence of fields. *Chem Soc Rev* 44:5320–5340 . doi: 10.1039/C4CS00369A
10. Moreira NH, de Almeida ALDJ, Piazzeta MHDO, et al (2009) Fabrication of a multichannel PDMS/glass analytical microsystem with integrated electrodes for amperometric detection. *Lab Chip* 9:115–21 . doi: 10.1039/b807409g
11. Ouellet E, Yang CWT, Lin T, et al (2010) Novel carboxyl-amine bonding methods for poly(dimethylsiloxane)-based devices. *Langmuir* 26:11609–



- 11614 . doi: 10.1021/la1012582
12. Casanova-Moreno J, To J, Yang CWT, et al (2017) Fabricating devices with improved adhesion between PDMS and gold-patterned glass. *Sensors Actuators, B Chem* 246:904–909 . doi: 10.1016/j.snb.2017.02.109
  13. Bard AJ, Faulkner LR (2000) *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc.
  14. Wang J (2006) *Analytical Electrochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA
  15. Ohmic Drop I. Effect on measurements. Application note 27
  16. Stulík K, Amatore C, Holub K, et al (2000) Microelectrodes. Definitions, characterization, and applications (Technical report). *Pure Appl Chem* 72:1483–92 . doi: 10.1351/pac200072081483
  17. Schulte A, Schuhmann W (2007) Single-cell microelectrochemistry. *Angew Chemie - Int Ed* 46:8760–8777 . doi: 10.1002/anie.200604851
  18. Moretto L, Kalcher K (2014) *Environmental Analysis by Electrochemical Sensors and Biosensors*. Springer New York, New York, NY
  19. Lavacchi A, Bardi U, Borri C, et al (2009) Cyclic voltammetry simulation at microelectrode arrays with COMSOL Multiphysics®. *J Appl Electrochem* 39:2159–2163 . doi: 10.1007/s10800-009-9797-2
  20. Prakash C, Patankar S V. (1985) A control volume-based finite-element method for solving the navier-stokes equations using equal-order velocity-pressure interpolation. *Numer Heat Transf* 8:259–280 . doi: 10.1080/01495728508961854
  21. O. C. Z, Robert L. T (2000) *The Finite Element Method: The Basis*, 5th Editio. Butterworth-Heinemann, Oxford
  22. Versteeg HK, Malalasekera W (2007) *An Introduction to Computational Fluid Dynamics: The Finite Volume Method*, Second Edi. Pearson
  23. Kirby BJ (2010) *Micro- and Nanoscale Fluid Mechanics*, First Edit. Cambridge University Press
  24. Iannone E (2015) *Labs on Chip: Principles, Design, and Technology*, 1st Editio. CRC Press

25. Franssila S (2010) Introduction to Microfabrication, 2nd Editio. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK
26. Lin B (2011) Microfluidics: Technologies and Applications, First Edit. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
27. Viskari PJ, Landers JP (2006) Unconventional detection methods for microfluidic devices. *Electrophoresis* 27:1797–1810 . doi: 10.1002/elps.200500565
28. Pires NMM, Dong T, Hanke U, Hoivik N (2014) Recent developments in optical detection technologies in lab-on-a-chip devices for biosensing applications. *Sensors (Switzerland)* 14:15458–15479 . doi: 10.3390/s140815458
29. Chen Q, Li G, Nie Y, et al (2014) Investigation and improvement of reversible microfluidic devices based on glass-PDMS-glass sandwich configuration. *Microfluid Nanofluidics* 16:83–90 . doi: 10.1007/s10404-013-1222-9
30. Duffy D, McDonald J (1998) Rapid prototyping of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane). *Anal Chem* 70:4974–4984 . doi: 10.1021/ac980656z
31. Kim M, Lee SY, Choi H, et al (2006) On-chip Escherichia coli culture, purification, and detection of expressed proteins. *Eur Biophys J* 35:655–662 . doi: 10.1007/s00249-006-0072-8
32. Lim KS, Chang W-J, Koo Y-M, Bashir R (2006) Reliable fabrication method of transferable micron scale metal pattern for poly(dimethylsiloxane) metallization. *Lab Chip* 6:578–580 . doi: 10.1039/b514755g
33. Lee KJ, Fosser KA, Nuzzo RG (2005) Fabrication of stable metallic patterns embedded in poly (dimethylsiloxane) and model applications in non-planar electronic and lab-on-a-chip device patterning. *Adv Funct Mater* 15:557–566 . doi: 10.1002/adfm.200400189
34. Vakarelski IU, McNamee CE, Higashitani K (2007) Deposition of silica nanoparticles on a gold surface via a self-assembled monolayer of (3-mercaptopropyl)trimethoxysilane. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 295:16–20 . doi: 10.1016/j.colsurfa.2006.08.021
35. Séguin C, McLachlan JM, Norton PR, Laguné-Labarthe F (2010) Surface

- modification of poly(dimethylsiloxane) for microfluidic assay applications. *Appl Surf Sci* 256:2524–2531 . doi: 10.1016/j.apsusc.2009.10.099
36. Yang CWT, Martens I, Gyenge EL, et al (2016) Adsorption of a Carboxylated Silane on Gold: Characterization for Its Rational Use in Hybrid Glass/Gold Substrates. *J Phys Chem C* 120:2675–2683 . doi: 10.1021/acs.jpcc.5b09915
  37. Lee D, Xu G, Tay HK, et al (2006) Microfluidic device with asymmetric electrodes for cell and reagent delivery. In: Chiao J-C, Dzurak AS, Jagadish C, Thiel D V. (eds) *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*. p 64150U
  38. Debesset S, Hayden CJ, Dalton C, et al (2004) An AC electroosmotic micropump for circular chromatographic applications. *Lab Chip* 4:396–400 . doi: 10.1039/b314123c
  39. Martin RS, Gawron AJ, Lunte SM, Henry CS (2000) Dual-Electrode Electrochemical Detection for Poly(dimethylsiloxane)-Fabricated Capillary Electrophoresis Microchips. *Anal Chem* 72:3196–3202 . doi: 10.1021/ac000160t
  40. Toriello NM, Douglas ES, Mathies RA (2005) Microfluidic device for electric field-driven single-cell capture and activation. *Anal Chem* 77:6935–6941 . doi: 10.1021/ac051032d
  41. Kim J-H, Kang CJ, Kim Y-S (2005) Development of a microfabricated disposable microchip with a capillary electrophoresis and integrated three-electrode electrochemical detection☆. *Biosens Bioelectron* 20:2314–2317 . doi: 10.1016/j.bios.2005.01.015
  42. Perdue RK, Laws DR, Hlushkou D, et al (2009) Bipolar electrode focusing: The effect of current and electric field on concentration enrichment. *Anal Chem* 81:10149–10155 . doi: 10.1021/ac901913r
  43. Luo C, Yang X, Fu Q, et al (2006) Picoliter-volume aqueous droplets in oil: Electrochemical detection and yeast cell electroporation. *Electrophoresis* 27:1977–1983 . doi: 10.1002/elps.200500665
  44. Kumar S, Peng Z, Shin H, et al (2010) Ac dielectrophoresis of tin oxide nanobelts suspended in ethanol: Manipulation and visualization. *Anal Chem*

82:2204–2212 . doi: 10.1021/ac901287z

45. Zangeneh Kazemi P, Ravi Selvaganapathy P, Ching CY (2010) Effect of micropillar electrode spacing on the performance of electrohydrodynamic micropumps. *J Electrostat* 68:376–383 . doi: 10.1016/j.elstat.2010.05.008
46. Valeur B, Berberan-Santos MN (2012) Fluorescence Microscopy. In: *Molecular Fluorescence, Second Edi.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp 327–348
47. Lakowicz JR (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd Editio. Springer US, Boston, MA
48. Fluorescence Spectra Viewer.  
<https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html?icid=fr-af488-5>
49. Zarkadas GM, Stergiou A, Papanastasiou G (2005) Influence of citric acid on the silver electrodeposition from aqueous AgNO<sub>3</sub> solutions. *Electrochim Acta* 50:5022–5031 . doi: 10.1016/j.electacta.2005.02.081