



Universidad Autónoma
de Madrid

Departamento de Física de Materiales
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

Resonadores Microcapilares Transparentes para la Caracterización Multiparamétrica de Células

Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias Físicas
presentada por:

Alberto Martín Pérez

Dirigida por los doctores:

Montserrat Calleja Gómez

Daniel Ramos Vega

Tutelada por el doctor:

Fabrice Leardini



Instituto de Micro y Nanotecnología

(Centro Nacional de Microelectrónica)

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Resonadores Microcapilares Transparentes para la Caracterización Multiparamétrica de Células (Resumen)

Los microcanales suspendidos resonantes han demostrado ser una técnica muy útil para la detección y caracterización de partículas suspendidas en medios líquidos (especialmente células) a través de la medida de su masa. Gracias a la integración de un canal microfluídico dentro de un resonador mecánico, estos dispositivos permiten aprovechar la gran sensibilidad en masa de un resonador mecánico oscilando en vacío (o atmósfera gaseosa) mientras se trabaja con partículas o células suspendidas en un medio líquido (que fluye a través del microcanal integrado en el dispositivo). En los trabajos previos al desarrollo de esta tesis doctoral en este tipo de dispositivos, sólo podían medir la masa boyante de las partículas (diferencia entre la masa de la partícula y del líquido desplazado por la misma), no obstante, este parámetro no permite una distinción unívoca entre distintos tipos de partículas ya que, partículas distintas en tamaño y material pueden presentar el mismo valor de masa boyante.

Para superar este problema, en la presente tesis doctoral, *Resonadores Microcapilares Transparentes para la Caracterización Multiparamétrica de Células*, se proponen nuevos conceptos para el desarrollo de microcanales suspendidos resonantes a fin de conseguir la medida simultánea de múltiples parámetros físicos de estas partículas coloidales, poniendo especial interés en su aplicación a la caracterización de células en entornos fisiológicos. Para ello, se ha desarrollado un proceso de fabricación de microcanales suspendidos resonantes basado en la integración de un capilar de sílice sobre un sustrato reflectante (resonador microcapilar transparente, RMT). Para la transducción de estos dispositivos se ha empleado un sistema interferométrico, que permite medir simultáneamente y en tiempo real la frecuencia de resonancia (señal mecánica) y la potencia de luz reflejada (señal óptica) por estos dispositivos.

En primer lugar, en esta tesis, se ha demostrado experimentalmente la utilidad de los métodos propuestos para la caracterización de distintas propiedades físicas de fluidos. Para este fin, se han medido los cambios producidos tanto en

la señal mecánica como óptica que se producen cuando se cambia el fluido contenido en el canal del dispositivo. De esta manera, se ha conseguido medir parámetros físicos como la densidad o la compresibilidad, a través de la señal mecánica, y el índice de refracción, a través de la señal óptica.

Posteriormente, también se ha demostrado la utilidad de la técnica propuesta para la caracterización de micropartículas dieléctricas suspendidas en medios líquidos mediante la medida de los cambios que producen éstas en las señales mecánica y óptica al atravesar la zona sensible del dispositivo. La medida de estos cambios en las señales mecánica y óptica de los dispositivos permiten obtener de manera simultánea dos parámetros de cada partícula individual: masa boyante y cambio en reflectividad. Además, se ha demostrado que la adquisición simultánea de estos dos parámetros permite realizar una distinción unívoca entre distintas poblaciones de micropartículas.

Así mismo, se ha desarrollado en esta tesis un estudio de las fuerzas hidrodinámicas que actúan sobre una partícula cuando atraviesa la zona sensible del dispositivo para poder relacionar la anchura de los eventos en las señales mecánica y óptica con el tamaño de la partícula. Lo que finalmente se ha utilizado para distinguir entre partículas de distinto tamaño, demostrando que la técnica propuesta en esta tesis permite realizar una caracterización basada en tres parámetros físicos independientes que se adquieren de manera simultánea para cada partícula individual.

Finalmente, se aplican los métodos desarrollados a lo largo de toda la tesis a la caracterización mecano-óptica de distintas líneas celulares, midiendo para cada célula individual parámetros de interés biofísico tales como: masa, tamaño y densidad. También se demuestra que el método desarrollado en esta tesis es capaz de realizar una distinción libre de marcadores entre dos líneas celulares de un mismo tejido (tejido epitelial mamario), una sana (MCF-10A) y otra de adenocarcinoma (MCF-7), con una precisión del 76%.

La presente tesis doctoral ha sido realizada en el Instituto de Micro y Nanotecnología (IMN-CNM), perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), bajo la supervisión de los doctores Montserrat Calleja Gómez y Daniel Ramos Vega y con la tutoría de Fabrice Leardini (UAM).

Este trabajo ha sido apoyado por el programa de investigación e innovación de la Unión Europea Horizon 2020 del European Research Council a través del proyecto Liquidmass (681275-LIQUIDMASS-ERC-CoG-2015).

Así mismo, este trabajo ha contado con el apoyo del servicio de Micro y Nanofabricación (MiNa) del IMN, el cual está financiado por la Comunidad de Madrid a través del proyecto S2013/ICE-2822 (Space-Tec) con soporte de la UE (FEDER, FSE). También se ha contado con el apoyo del laboratorio X-SEM del IMN, el cual está financiado por el MINECO a través del proyecto CSIC13-4E-1794 con soporte de la Unión Europea (FEDER, FSE).

© 2021

Alberto Martín Pérez

Todos los derechos reservados / All rights reserved

A Manuel,
Alfonsa
y Lucía

«Experiencia es el nombre que uno da a sus errores»

- Oscar Wilde -

Índice

| | |
|---|----|
| Agradecimientos | 11 |
| Introducción | 13 |
| Nanomecánica | 16 |
| Microfluídica | 18 |
| Microcanales Suspendidos Resonantes | 20 |
| Motivación y Objetivos | 23 |
| Estructura de la tesis | 24 |
| Bibliografía | 26 |
| Capítulo 1: Fundamentos Teóricos | 33 |
| 1.1. Descripción del sólido elástico | 33 |
| 1.2. Ley de Hooke | 38 |
| 1.3. Modelo de Euler-Bernouilli: vibración de barras y palancas | 40 |
| 1.4. Modelo del Oscilador Armónico | 47 |
| 1.5. Modelo de Euler-Bernouilli con una fuerza de excitación | 50 |
| 1.6. Descripción de un fluido | 52 |
| 1.7. Flujo laminar | 57 |
| 1.8. Interacción fluido-sólido | 63 |
| 1.9. Conclusiones | 67 |
| Bibliografía | 67 |
| Capítulo 2: Fabricación de Dispositivos | 69 |
| 2.1. Fabricación de dispositivos RMT a partir de sustratos con trinchera .. | 70 |
| 2.2. Fabricación de dispositivos RMT a partir de capilares elongados | 76 |
| 2.3. Fabricación de resistores microfluídicos | 80 |

| | |
|---|------------|
| 2.4. Conclusiones..... | 85 |
| Bibliografía..... | 86 |
| Capítulo 3: Sistema Transducción Óptica y Caracterización de Dispositivos..... | 89 |
| 3.1. Sistema de lectura interferométrica..... | 91 |
| 3.2. Caracterización óptica de los dispositivos | 96 |
| 3.3. Caracterización mecánica de los dispositivos | 100 |
| 3.4. Conclusiones..... | 105 |
| Bibliografía..... | 106 |
| Capítulo 4: Medida de Propiedades Físicas de Fluidos | 109 |
| 4.1. Medida de la densidad..... | 111 |
| 4.2. Medida de la concentración en tiempo real..... | 113 |
| 4.3. Medida del índice de refracción | 115 |
| 4.4. Efectos de la presión en la frecuencia de resonancia | 116 |
| 4.5. Conclusiones..... | 122 |
| Bibliografía..... | 124 |
| Capítulo 5: Detección Mecano-Óptica de Partículas | 127 |
| 5.1. Principio de detección mecano-óptica de partículas..... | 128 |
| 5.2. El problema de la masa boyante..... | 133 |
| 5.3. Análisis de la señal óptica | 135 |
| 5.4. Espectrometría mecano-óptica de micropartículas..... | 139 |
| 5.5. Conclusiones..... | 141 |
| Bibliografía..... | 142 |
| Capítulo 6: Espectrometría Multiparamétrica de Partículas Asistida por Fuerzas Hidrodinámicas..... | 147 |
| 6.1. Medida de la velocidad de las partículas | 149 |
| 6.2. Migración inercial de partículas: componente radial de la fuerza hidrodinámica..... | 150 |
| 6.3. Velocidad Límite: Componente Axial de la Fuerza Hidrodinámica..... | 153 |
| 6.4. Espectrometría hidrodinámica de partículas | 158 |

| | |
|--|------------|
| 6.5. Medida de longitud de partículas: análisis de la señal óptica | 160 |
| 6.6. Conclusiones..... | 162 |
| Bibliografía..... | 163 |
| Capítulo 7: Detección y Caracterización de Células | 165 |
| 7.1. Preparación y caracterización previa de células | 167 |
| 7.2. Espectrometría mecano-óptica de células: distinción entre células sanas y tumorales | 168 |
| 7.3. Medida de la densidad en células..... | 172 |
| 7.4. Conclusiones..... | 173 |
| Bibliografía..... | 174 |
| Conclusiones Generales..... | 177 |
| Perspectivas Futuras | 181 |
| Detección de agentes infecciosos..... | 181 |
| Nuevos conceptos de fabricación..... | 184 |
| Nuevos fenómenos hidrodinámicos | 185 |
| Trabajos publicados durante la realización de esta tesis | 187 |
| Patentes solicitadas durante la realización de esta tesis..... | 187 |

Agradecimientos

Pensar que una única persona puede hacer un trabajo es un gran error: en todo lo que hacemos, siempre contamos con otras personas que, en mayor o menor medida y de manera más o menos indirecta, nos aportan un sinfín de cosas que una única persona por sí sola no podría conseguir. Así que, para evitar caer en la egolatría, quiero aprovechar estas primeras páginas para reconocer y reivindicar el papel que han jugado todas esas personas que han aportado su granito de arena.

En primer lugar, quiero agradecer a Javi y Montse que me dieran la oportunidad de unirme a su grupo a pesar de mi poco impresionante currículum y de mi aún menos sorprendente entrevista. También agradezco a David Esteban, que se ocupase de transmitirles una imagen de mí mucho mejor de la que yo mismo mostré en aquella entrevista.

También quiero dar las gracias a todos mis compañeros del grupo de Bionanomecánica por tantas horas que he pasado con ellos y por tantas horas que me han tenido que aguantar. Han sido muchos momentos de ayuda, de prestarnos/robarnos material y de eternas discusiones sobre aspectos técnico. Pero, por suerte, también me habéis dado muchos momentos de desconexión, de risas y descanso mental. Desde Óscar poniendo música –que lo mismo pincha a Rachmaninov que a Delfín hasta el fin–, los shows del muelle con Edu y Juan (que seguramente hayamos disfrutado más nosotros que nuestro público), Sergio con sus bailes, canciones y buen rollo general, Vero y su falsa taciturnidad –que cuando menos te lo esperas habla y tiembla el mundo–, Carmen con su sentido del humor, mis discusiones a medio camino entre lo absurdo y lo trascendente con Xavi o, simplemente, el día a día en el laboratorio con Alicia, Adrián, Priscila o Marina. Aunque estas puedan parecer cuestiones anecdóticas, superfluas e intrascendentes, para mí han sido tan importantes como toda la ayuda de carácter puramente técnico: con este ambiente habéis conseguido que mantenga el ánimo a diario durante todo este tiempo y me habéis animado a seguir esforzándome salieran o no las cosas.

Estoy muy agradecido por haber pasado tantos buenos momentos (y también algunos no tan buenos) junto a vosotros, pero hay dos personas a las que se lo quiero agradecer especialmente. Una es Álvaro, que, a pesar de que sus momentos de insufribilidad, siempre he podido contar con él para lo que fuera... además, me aburriría mucho si no estuviese por aquí –¿Quién lo hubiera dicho al principio?– Y la otra es Dani, que siempre me ha ofrecido su ayuda, en todo momento y desde el primer día, con su característico y genial estilo a medio camino entre ese profesor que disfruta transmitiendo lo mucho que sabe y el hermano mayor vacilón pero bienintencionado.

Debo decir que este buen ambiente no ha sido algo exclusivo del grupo del grupo de Bionanomecánica, sino que se ha hecho extensivo a todo el instituto. Gracias a Joaquín, Elías, Cris, Raquel (persona sin la cual el IMN quedaría paralizado), Margarita (que, a pesar de todo, siempre ayuda mucho), Manu, Carol, Alba, Pedro... y tanta otra gente de la que me estaré olvidando ahora pero que ha estado ahí. Todas esas comidas, cafés, charlas por los pasillos, quedadas y cañas (con las que ni si quiera un apocalipsis pudo acabar) me han hecho sentirme siempre muy bien acogido y acompañado.

Por último, quiero dar las gracias a mi familia y amigos (los ajenos al IMN) que durante todo este tiempo han sido en ocasiones una válvula de escape a todos los problemas del laboratorio y en otras me han ayudado ver las cosas en perspectiva.

Estos han sido unos años intensos; he pasado muchos momentos de alegría y también unos cuantos momentos de fracaso y frustración, pero siempre guardaré muy buen recuerdo de esta etapa y de todas las personas que me habéis acompañado a lo largo de ella. En definitiva, muchas gracias a todos.

Introducción

La presente tesis doctoral se engloba dentro del ámbito de la nanotecnología, que consiste en un conjunto de ciencias y técnicas dirigidas al estudio, manipulación y/o aplicación de estructuras, materiales o sistemas en los que al menos una de sus dimensiones está en el rango de los nanómetros. Para conseguir este fin, la nanotecnología emplea conceptos que proceden de diversos ámbitos: física, química, biología, ciencia de materiales, etc., es por ello que se considera a la nanotecnología como un campo interdisciplinar.

Existen diversos ejemplos a lo largo de la historia de la humanidad en los que se han aprovechado (de manera fortuita) distintas estructuras o partículas en el rango de los nanómetros, para obtener productos con propiedades mejoradas. Entre otros ejemplos podemos citar el uso de cosméticos que contenían nanopartículas en el Antiguo Egipto¹, el uso de minerales nanoporosos por parte de algunos pueblos precolombinos para la preparación de pinturas² o la aparición de nanotubos de carbono en el acero de Damasco del siglo XVII³. En estos casos, la presencia de nanoestructuras confería unas propiedades a los materiales nunca antes vistas, sin embargo, el uso de estructuras submicrométricas no se hizo de manera consciente y controlada. Por ello, suele considerarse como el origen de la nanotecnología la famosa charla de Richard Feynman «There's plenty room at the bottom» en el congreso anual de la Sociedad Americana de Física (APS) de 1959⁴. En esta charla Feynman sugirió que la manipulación de la materia en escalas cercanas a la atómica podría permitir el desarrollo de aplicaciones nuevas, abriendo todo un nuevo campo de estudio.

Utilizar sistemas de dimensiones nanométricas resulta interesante principalmente por tres razones. En primer lugar, reducir el tamaño de ciertos sistemas permite optimizar algunas aplicaciones. Este es el caso de la industria electrónica que, gracias a los avances de la nanotecnología, ha podido reducir el tamaño de los transistores hasta 4 órdenes de magnitud desde la década de 1970⁵. Esta reducción en el tamaño ha permitido incrementar hasta 8 órdenes

de magnitud la capacidad de empaquetado en los microprocesadores, lo que ha aumentado las capacidades de dichos dispositivos. En segundo lugar, trabajar en escalas próximas al nanómetro propicia la aparición de nuevos fenómenos físicos (imposibles de medir en otras escalas) como el transporte balístico electrónico, el efecto túnel o la resonancia de plasmón. Por último, llevar los materiales a la nanoescala permite variar de forma controlada ciertas propiedades físicas mediante el control del tamaño, lo que abre la puerta a una ingeniería de materiales «a la carta»⁶.

Además del interés científico que suscita la nanoescala por la aparición de nuevos fenómenos, la nanotecnología cuenta actualmente con múltiples aplicaciones comerciales que abarcan desde el ámbito de las tecnologías de la información y la comunicación (como la aparición de los microprocesadores mencionados previamente) hasta la síntesis de nuevos productos cosméticos y farmacéuticos (como es el caso de las cremas de protección solar que emplean nanopartículas de óxido de zinc para conseguir una absorción eficiente de la radiación ultravioleta⁷). No obstante, la nanotecnología tiene mucho potencial de cara a múltiples aplicaciones en ámbitos muy diversos que no cuentan con una aplicación comercial directa en la actualidad. En este aspecto, la biología y la medicina suscitan un gran interés por posibles aplicaciones nanotecnológicas, ya que muchas entidades biológicas (proteínas, ADN, viriones, orgánulos celulares, etc.) presentan tamaños característicos en la escala del nanómetro. Disponer de un conjunto de técnicas que permitan tanto la manipulación como la caracterización de estas entidades individualmente abre la puerta a una comprensión sin precedentes de los seres vivos y los procesos fisicoquímicos que tienen lugar en sus componentes más elementales. Estas aplicaciones podrían, en última instancia, permitir la detección precoz de enfermedades y la mejora de los tratamientos existentes, así como el desarrollo de la bioingeniería desde los componentes más fundamentales de los seres vivos.

También existen muchas otras entidades biológicas que, aunque presentan tamaños lo suficientemente grandes como para no poder considerarse nanoescala, tampoco pueden ser considerados como objetos macroscópicos (mesoescala)⁸. Este es el caso de las células animales y vegetales, así como de los microorganismos unicelulares, cuyos tamaños se encuentran en un rango entre unas pocas decenas de micrómetros (en el caso de las células animales) y el micrómetro (como es el caso de las bacterias). Es por esta razón (amén de otras aplicaciones ajenas a la biología) que en las últimas décadas también se han desarrollado múltiples técnicas para el control y manipulación de objetos

en esta escala, microtecnología: ámbito en el que también podría enmarcarse esta tesis.

Tanto en la micro como en la nanoescala, la medida de propiedades físicas de partículas de estas dimensiones es un aspecto de gran importancia para la caracterización, análisis y distinción de las mismas. Actualmente, existe una gran variedad de técnicas de microscopía en la nanoescala que permiten la caracterización de distintos parámetros. Estas técnicas de microscopía se agrupan en dos grandes tipos de microscopías: microscopía electrónica (de barrido, SEM*, y de transmisión, TEM), que permiten la caracterización morfológica de las muestras, y microscopías de sonda local, que permiten caracterizar la topografía de una muestra (microscopía de fuerzas atómicas, AFM, y microscopía de barrido de efecto túnel, STM). Asimismo, las técnicas de microscopía de sonda local también permiten caracterizar otras propiedades de las muestras: ópticas (microscopía óptica de campo cercano, SNOM), magnéticas (microscopía de fuerzas magnéticas, MFM), eléctricas (microscopía de fuerzas electrostáticas, EFM), etc. No obstante, todas estas técnicas de microscopía presentan un bajo rendimiento, ya que el tiempo empleado en el análisis de cada muestra es elevado y, además, en muchos casos las muestras a analizar requieren una preparación previa. Este bajo rendimiento hace difícil una implementación generalizada de estas técnicas, lo que ha motivado el desarrollo de técnicas alternativas que permitan una medida más eficiente de propiedades físicas de partículas en la micro y nanoescala.

En el caso de las aplicaciones biológicas existe un especial interés en conseguir técnicas de caracterización de las propiedades físicas de partículas inmersas en una disolución acuosa y a temperatura ambiente, ya que este es el medio natural de las entidades biológicas. Trabajar con partículas biológicas en condiciones tales como vacío y/o temperaturas criogénicas, requeridas por algunas de las técnicas anteriormente descritas, puede causar la desnaturalización (e incluso la destrucción) en estas partículas, así como la inhibición de procesos biológicos. Entre las técnicas que mejor se ajustan a estas condiciones específicas destacan la nanomecánica y la microfluídica, cuyas características se detallan a continuación.

* Este acrónimo, y los siguientes corresponden al nombre en inglés de cada técnica.

Nanomecánica

Dentro de la nanotecnología, la nanomecánica se encarga del estudio del movimiento y las fuerzas en la nanoescala. Los orígenes de la nanomecánica suelen situarse en 1986 con el desarrollo del primer microscopio de fuerzas atómicas (AFM)⁹. Este microscopio consta de en una palanca de longitud micrométrica y espesor nanométrico dotada de una punta muy afilada (la punta termina en un solo átomo) en su extremo. Cuando la punta se acerca a la superficie de una muestra (a una distancia de pocos nanómetros) experimenta una fuerza de tipo Van der Waals hacia la muestra. La micropalanca se usa como transductor de esta fuerza, bien a través de la deflexión de la misma (modo estático) o bien a través de los cambios en su frecuencia de resonancia (modo dinámico). De esta manera, cuando la muestra se monta sobre unos posicionadores, se pueden realizar barridos con la punta sobre la muestra obteniendo perfiles o mapas de la topografía de la muestra con resolución atómica.

La técnica del AFM supuso una revolución en el análisis de superficies, ya que permitió por primera vez la obtención de imágenes en la escala nanométrica de cualquier tipo de superficie y en condiciones de temperatura ambiente y presión atmosférica (e incluso en líquidos). Este éxito motivó la posterior aplicación de micropalancas (sin punta) como sensores de distintos parámetros físicos como temperatura¹⁰, humedad¹¹, o viscosidad¹² durante la década de 1990.

Prácticamente desde su origen, la nanomecánica se empezó a aplicar al desarrollo de biosensores, detectando por primera vez la hibridación del ADN en tiempo real en el año 2000. En dicho trabajo, se midió la deflexión de una palanca cuya superficie estaba funcionalizada con oligonucleótidos en una de sus caras (Fig. I.1a). Al introducir los oligonucleótidos con la cadena complementaria, estos se hibridan con los adheridos a la micropalanca produciendo una diferencia de tensión entre ambas caras (superior e inferior), causando la deflexión de la palanca (modo estático, Fig. I.1a)¹³. En paralelo a ese trabajo también se propuso el uso de micropalancas para medir la masa de bacterias *Escherichia Coli* en una micropalanca a través de los cambios en la frecuencia de resonancia de la micropalanca (modo dinámico, Fig. I.1b)¹⁴. En este trabajo se tomaron múltiples micropalancas idénticas sobre las que se depositaron bacterias con una distribución aleatoria, demostrando que la frecuencia de resonancia de la micropalanca se reducía de manera directamente proporcional con el número de bacterias adheridas sobre la superficie y, por tanto, de su masa.

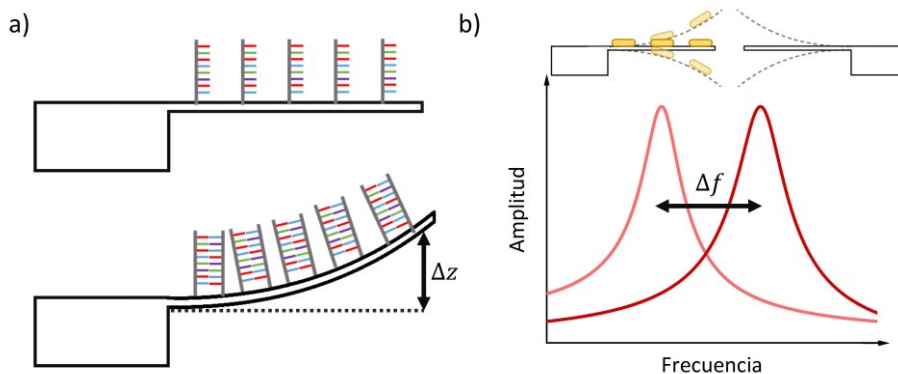


Figura 1.1: Estrategias de medida en nanomecánica. **a)** Modo estático. (arriba) palanca funcionalizada con oligonucleótidos (abajo) la misma palanca tras la hibridación de los oligonucleótidos con sus cadenas complementarias. La diferencia de tensión superficial entre ambas caras produce una deflexión de la palanca (Δz). **b)** Modo dinámico. Una palanca tiene una cierta frecuencia de resonancia (derecha). Cuando se depositan objetos sobre esta (p. ej. bacterias) su frecuencia de resonancia cambia un cierto valor (Δf) que está directamente relacionado con la masa depositada.

Durante los años posteriores, la idea de la medida de masa utilizando resonadores mecánicos en su modo dinámico se desarrolló hasta conseguir un límite de detección en masa de un yoctogramo (aproximadamente, 1 unidad de masa atómica) en el año 2012 para un nanotubo de carbono oscilando en un modo tipo cuerda de guitarra¹⁵. En cuanto al análisis de entidades biológicas, las entidades de menor masa que se han conseguido medir hasta el momento han sido proteínas (~ 100 zg) con una resolución en el orden de 0.1 zg¹⁶. Para esto se depositaron proteínas enteras sobre un resonador tipo puente mediante la técnica de electrospray. Esta estrategia supone una gran ventaja con respecto a la espectrometría de masa convencional, en la que es necesario romper las proteínas en sus distintos péptidos para poder conseguir partículas ionizadas. Cabe destacar que en ambos trabajos la alta resolución en masa se consiguió gracias al uso de condiciones de ultra-alto vacío y temperaturas criogénicas, condiciones que desnaturalizan las proteínas.

Sin embargo, una alta resolución en masa no es suficiente para distinguir partículas de forma unívoca, ya que varias partículas muy distintas en forma, tamaño o composición química pueden presentar masas similares (independientemente de que sean o no biológicas). Para evitar este tipo de problemas se ha propuesto la medida de propiedades mecánicas complementarias de manera simultánea a la masa, como puede ser la rigidez. En el año 2006 se demostró que el cambio en la frecuencia de un resonador causado por la deposición de una partícula resulta del efecto combinado de dos términos de signo opuesto: masa (que reduce la frecuencia) y rigidez (que

aumenta la frecuencia)^{17,18}. El balance entre ambos términos puede producir que la frecuencia de resonancia aumente o disminuya al depositar una partícula dependiendo de la posición en la esta que quede depositada. Este fenómeno ha abierto la puerta a la espectrometría nanomecánica de partículas en la que midiendo simultáneamente tres modos de un resonador se extrae información acerca de la masa, la rigidez y la posición de cada partícula depositada en el resonador¹⁹. Aparte de introducir un nuevo parámetro que permita una mejor distinción entre partículas, se ha demostrado que la rigidez es un parámetro de interés biofísico²⁰.

Actualmente se están empezando a introducir nuevas aproximaciones en las que el propio analito biológico se comporta como un resonador nanomecánico. De esta manera, se ha conseguido medir los modos flexurales de cadenas de ADN²¹ o distintos modos de vibración de una bacteria²². Estas técnicas permitirían medir las propiedades mecánicas de las partículas biológicas de una manera más directa.

Microfluídica

La microfluídica se encarga del estudio y manipulación de volúmenes pequeños de fluidos. Suele establecerse como límites entre 1 nL y 1 μ L²³. La manipulación de fluidos en esta escala presenta varias ventajas comparativas respecto al uso de volúmenes mayores. En primer lugar, el uso de volúmenes tan pequeños permite realizar análisis consumiendo cantidades ínfimas de una muestra. Además, en esta escala, comienzan a cobrar importancia fenómenos que, o bien no se aprecian, o bien son poco significativos en la macroescala (tensión superficial, capilaridad) en el comportamiento de los fluidos. Por último, confinar el movimiento de un fluido en canales de dimensiones micrométricas permite obtener con facilidad un flujo laminar (aquel en el que todas las líneas de flujo son paralelas entre sí). En este sentido, trabajar con un flujo laminar presenta el gran atractivo de permitir modelizar con relativa facilidad el movimiento de un fluido y las fuerzas que este pueda ejercer sobre una partícula, en contraposición con el flujo turbulento (aquel en el que las líneas de flujo no son paralelas entre sí), que en la mayoría de ocasiones resulta en un sistema caótico.

A lo largo del siglo XX se desarrollaron diversas técnicas en las que se hace pasar un fluido a través de tubos capilares de diámetro interno micrométrico. Algunas de estas técnicas son la citometría de flujo²⁴, la cromatografía²⁵ o la electroforesis capilar²⁶. No obstante, no fue hasta finales de la década de 1970 cuando se empezó a desarrollar la microfluídica como tal gracias a los avances

de las técnicas de micro y nanofabricación desarrolladas para la industria electrónica que permitieron una fabricación controlada de canales de dimensiones micrométricas y geometrías controladas tanto en silicio como en óxido de silicio²⁷. En sus orígenes, los circuitos microfluídicos se utilizaron principalmente para su utilización como reactores químicos ya que, gracias a las condiciones de flujo laminar la mezcla de dos compuestos miscibles estará gobernada por la difusión, lo que permite un control altamente preciso en las concentraciones.

No obstante, la fabricación de microcanales en silicio resulta compleja y costosa siendo, por tanto, poco accesible a la mayoría de laboratorios del mundo. Por esta razón no fue hasta finales de la década de 1990 cuando esta técnica demostró todo su potencial gracias al desarrollo de las técnicas de fabricación basadas en litografía blanda²⁸. Estas técnicas consisten en la fabricación de circuitos microfluídicos vertiendo un polímero sobre una estructura rígida previamente fabricada mediante fotolitografía (molde). Al aplicar calor y/o radiación ultravioleta, en este polímero se producen reacciones químicas («cross-link») cambiando sus propiedades físico-químicas. Tras este paso, molde y polímero pueden separarse obteniendo una réplica complementaria de la estructura contenida en el molde. De esta manera, las partes salientes en el molde serán oquedades en la réplica y viceversa. Finalmente, la réplica se adhiere y sella sobre un sustrato (habitualmente de sílice) para conseguir la presurización de los canales obtenidos.

Esta técnica de fabricación supuso una revolución en la microfluídica gracias a la rapidez, simplicidad, bajo coste y alta reproducibilidad en los dispositivos obtenidos. Además, los polímeros empleados habitualmente en la litografía blanda (poliestireno, PS, y polidimetilsiloxano, PDMS) son transparentes, lo que permite la introducción de técnicas ópticas y de análisis de imagen. La oportunidad de tomar imágenes de los microcanales permite estudiar la trayectoria que una micropartícula sigue dentro del microcanal, abriendo la puerta a un gran abanico de aplicaciones. En este aspecto, uno de los fenómenos más utilizados es la migración inercial de partículas, gracias al cual al introducir en un circuito microfluídico una suspensión de partículas inicialmente desordenadas, estas terminan ocupando una posición determinada en el microcanal debido al equilibrio entre distintas fuerzas hidrodinámicas. Esta posición de equilibrio está determinada por la geometría de la partícula y el caudal aplicado, lo que permite la separación y clasificación pasiva de las partículas con una eficiencia muy alta ($\sim 10^7$ partículas/min)²⁹⁻³¹.

Sin embargo, este ordenamiento pasivo de las partículas no permite un análisis de las mismas (más allá de propiedades geométricas), por lo que se hace necesaria la introducción de técnicas adicionales para poder distinguir entre partículas de igual geometría pero distintos materiales. Para resolver este aspecto se han propuesto distintas técnicas que pasan por el análisis de imágenes y la medida de propiedades ópticas o eléctricas. El análisis de imagen permite estudiar cómo se deforman las partículas a causa de la aparición de estas fuerzas hidrodinámicas³². Por otra parte, la combinación de la microfluídica con técnicas ópticas (optofluídica), permite obtener propiedades como el índice de refracción³³⁻³⁵ así como la detección de la presencia de ciertas sustancias químicas, ya sea mediante la introducción de marcadores fluorescentes^{36,37}, o bien mediante la adquisición de espectros Raman^{37,38}. Por otra parte, también se ha planteado la medida de la impedancia eléctrica de las partículas a analizar introduciendo electrodos dentro de los microcanales³⁹.

Por otra parte, la microfluídica también ha dado origen a la técnica de «órgano en un chip». Esta técnica permite el cultivo de células en un dispositivo en el que, mediante microcanales, se recrean las condiciones de un órgano vivo⁴⁰. Esta técnica resulta muy prometedora en medicina ya que permitiría probar distintos fármacos en un órgano cultivado en un chip con células de un paciente concreto antes de suministrar un tratamiento a dicho paciente. Esto abre la puerta a la utilización de terapias personalizadas.

Microcanales Suspendidos Resonantes

Dadas las grandes ventajas que aportan tanto la nanomecánica como la microfluídica, se han desarrollado técnicas que combinan ambos campos: es el caso de los microcanales suspendidos resonantes (SMR, por sus siglas en inglés «Suspended Microchannel Resonator»). Los SMR consisten en un resonador nanomecánico con un microcanal integrado, por el que circulan partículas suspendidas en un medio líquido. Comparados con los resonadores mecánicos convencionales inmersos en líquidos, los SMR permiten una resolución en masa mucho mayor, ya que el resonador puede realizar su movimiento oscilatorio en vacío o atmósfera gaseosa, minimizando el rozamiento viscoso y la masa añadida por la columna de fluido. Además, mientras que en un resonador inmerso en un líquido las partículas van precipitando de manera aleatoria en la superficie del resonador, en los SMR las partículas se mueven a través de la longitud del resonador siguiendo una trayectoria determinista.

El primer SMR fue desarrollado en el año 2003⁴¹ por los investigadores del Massachusetts Institute of Technology (MIT) Thomas P. Burg y Scott R. Manalis.

En ese trabajo, presentaron el método de fabricación de un resonador en forma de micropalanca anclada en un extremo con un microcanal en forma de «U» integrado (Fig. 1.2). Este resonador fue utilizado para hacer fluir distintos líquidos que contenían proteínas, las cuales se iban acumulando en la pared del canal. La acumulación de las proteínas producía un incremento en la masa del resonador, que se detectó a través de la medida del cambio en la frecuencia de resonancia de la palanca. Esta tecnología se ha continuado desarrollando hasta conseguir poder medir la masa de bacterias individuales⁴² y llegando a conseguirse en 2010 una resolución en masa de 10 ag, lo que sería suficiente para medir individualmente la masa de algunos virus como el del VIH⁴³. Al margen de las medidas de masa, este tipo de resonadores también se han utilizado para medir otras propiedades mecánicas de interés biofísico como son la rigidez de células o su compresibilidad^{44,45}.

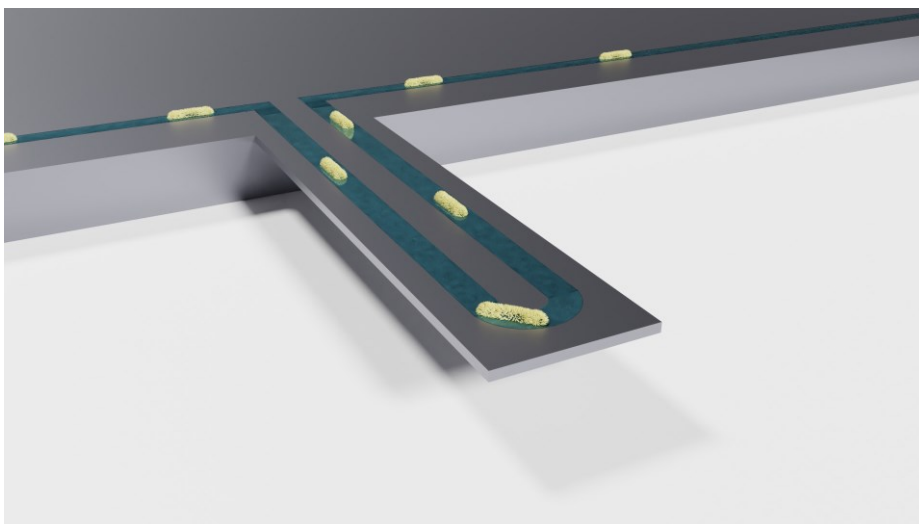


Figura 1.2: Microcanal suspendido resonante. Representación artística de un resonador SMR del que se hace pasar una muestra que contiene bacterias (en amarillo).

Este tipo de sensores tienen un gran potencial de cara a ser aplicados en biotecnología y medicina habiéndose llegado a utilizar incluso para el estudio de procesos biológicos en células vivas utilizando varios resonadores conectados en serie, permitiendo la medida de la variación de la masa de células individuales en el tiempo, lo que ha permitido comprobar la susceptibilidad de células a fármacos^{46,47}. De hecho, ya existe una empresa que emplea estos dispositivos de manera comercial para la realización de estudios personalizados de susceptibilidad a fármacos a partir de muestras reales de pacientes oncológicos, empleando células obtenidas mediante biopsia⁴⁸.

Sin embargo, a pesar de las aplicaciones anteriormente descritas, esta técnica presenta dos grandes limitaciones que la hacen difícilmente accesible al gran público: su fabricación altamente costosa y el hecho de que la medida de la masa boyante no permite distinguir de manera inequívoca entre partículas distintas (el cambio en masa medido por estos dispositivos resultará de la diferencia de masa entre dicha partícula y el volumen de líquido desplazado para que esta pueda entrar en la zona sensible, masa boyante, por lo que, partículas de distinto tamaño y densidad pueden producir el mismo cambio de masa). En cuanto al problema de la masa boyante, se ha propuesto como solución en trabajos anteriores la medida secuencial de cada partícula individual en dos líquidos de densidades diferentes lo que, no solo permite conocer la masa de la partícula sino también su volumen y densidad⁴⁹, ambos parámetros de gran interés biofísico. No obstante, esta solución reduce drásticamente el rendimiento de la técnica, requiriendo además una fabricación e implementación de los dispositivos más compleja y, por ende, más costosa. Asimismo, esta solución resulta especialmente delicada en el caso de la medida de entidades biológicas como las células ya que ambos medios deben ser escogidos adecuadamente para que, además de tener densidades diferentes tengan las propiedades compatibles con la actividad de las células. Si en una de las disoluciones empleadas alguna de sus propiedades (tonicidad, osmolaridad o pH) no es adecuada, las propiedades físicas de las células pueden cambiar⁵⁰ llegando incluso en algunos casos a la destrucción de las mismas.

De cara a permitir una implementación más generalizada de los SMR, el grupo de Bionanomecánica del Instituto de Micro y Nanotecnología (IMN-CNM-CSIC) propuso por primera vez el uso de SMR basados en capilares de sílice comerciales en un trabajo publicado en 2015⁵¹. El uso de estos capilares presenta dos grandes ventajas. Por una parte, los capilares de sílice se usan de manera generalizada en otras técnicas de caracterización biofísica convencionales (cromatografía, citometría de flujo o electroforesis capilar), por lo que existe una amplia gama comercial de capilares de diversos tamaños: abaratando y simplificando la implementación de estos dispositivos. Por otra parte, al ser transparente, la sílice permite el acceso óptico a las partículas que pasan por el resonador, abriendo la puerta a complementar las medidas de la masa boyante (obtenidas a través del cambio en frecuencia) con una caracterización óptica de las partículas en flujo. Para probar este concepto, en el trabajo anteriormente citado, se tomó un capilar de sílice comercial y se anclaron sus dos extremos, dejándolo suspendido unos centímetros, de tal manera que podía oscilar en un modo flexural. La frecuencia de este resonador se midió utilizando métodos ópticos mientras se introducían disoluciones acuosas de distintas densidades demostrando una sensibilidad de 50 $\mu\text{g/mL}$. El

éxito del concepto propuesto en ese trabajo motivó varios trabajos de otros grupos de investigación⁵²⁻⁵⁴ y ha supuesto un punto de partida para el desarrollo de esta tesis.

Motivación y Objetivos

La caracterización de partículas suspendidas en entornos líquidos mediante el uso de resonadores con microcanales integrados ha demostrado ser una técnica muy versátil para la medida de propiedades físicas de partículas presentando una eficiencia de hasta 6800 partículas por minuto empleando solo un resonador⁵⁵. Además, esta técnica permite operar con muestras en un entorno fisiológico lo que la hace ideal de cara aplicaciones biológicas y ha demostrado una gran capacidad para medir diversas propiedades físicas en células (masa, volumen, densidad, compresibilidad...) así como el estudio de algunos procesos biológicos. Sin embargo, esta técnica presenta diversos problemas (fabricación costosa y la indeterminación de la masa boyante) que impiden su implementación como una técnica ampliamente generalizada.

Siguiendo la estrategia propuesta por Malvar *et al.* en 2015⁵¹ consistente en el uso de SMR basados en capilares de sílice comerciales, en esta tesis se propone conseguir una implementación más reproducible, simple y accesible de los SMR de cara a su aplicación para la caracterización de células y micropartículas individualmente. Para este fin se definen los siguientes objetivos.

- Desarrollo de un proceso de fabricación que permita conseguir dispositivos con microcanales suspendidos resonantes basados en capilares de sílice para conseguir dispositivos de menores dimensiones que los empleados hasta el momento de inicio de esta tesis.
- Construcción de un sistema de transducción óptica para la caracterización, tanto mecánica como óptica, de los dispositivos fabricados.
- Caracterización de propiedades físicas de fluidos a través de la medida de los cambios medidos en las propiedades ópticas y mecánicas de los dispositivos cuando se cambia el fluido que contienen en su interior.
- Desarrollo de un método para la caracterización de micropartículas suspendidas en entornos líquidos a través de la medida de los cambios en las propiedades ópticas y mecánicas de los dispositivos producido por el paso de estas a través de la zona sensible.

- Estudio de las fuerzas hidrodinámicas resultantes sobre una partícula dentro de los dispositivos fabricados para relacionar la anchura de los eventos mecánicos y ópticos registrados por el paso de la misma con su tamaño.
- Caracterización de distintas líneas celulares empleando los dispositivos, el sistema de transducción y la metodología desarrollados.

Estructura de la tesis

Esta tesis se estructura en 7 capítulos, cada uno de ellos dedicado a un aspecto concreto de la técnica de análisis que se propone.

En el capítulo 1 se hace una revisión de los fundamentos físicos que rigen los SMR. Para esto, los SMR se estudiarán a nivel teórico como resonadores mecánicos y como microcanales, razón por la cual, el capítulo se puede subdividir en dos partes: estando los primeros 5 epígrafes dedicados a la mecánica del sólido elástico y los 3 epígrafes restantes dedicados a la mecánica de fluidos. En la primera parte, se mostrará la descripción del movimiento en un sólido elástico para, finalmente aplicarlo al caso de las oscilaciones flexurales de un sólido. Por otra parte, en la sección dedicada a fluidos, se mostrará la descripción del movimiento de un fluido para aplicarla finalmente al caso de un fluido incompresible en régimen laminar con distintas constricciones. El último epígrafe se dedica al estudio de las fuerzas que un fluido en movimiento aplica sobre una superficie sólida (o viceversa), lo que dará origen a distintos fenómenos de interacción entre el resonador y el fluido.

El capítulo 2 se encuentra dedicado a la fabricación de los dispositivos, proponiendo nuevos conceptos para la fabricación de microcanales suspendidos resonantes basados en el uso de capilares de vidrio comerciales dando lugar a los resonadores microcapilares transparentes (RMT). Detallaremos dos aproximaciones distintas para la fabricación de estos dispositivos. Además, en este capítulo también se muestran los distintos sistemas utilizados para bombeo de los fluidos por el interior del dispositivo RMT, así como el método de fabricación de resistores microfluídicos, que permitirán un control más preciso del flujo dentro de los dispositivos fabricados.

En el capítulo 3 se presenta el sistema de transducción interferométrica que se emplea para medir en tiempo real la frecuencia de resonancia de los dispositivos fabricados. Demostraremos que este sistema óptico permite

medir, en tiempo real y de manera simultánea a la frecuencia, la potencia de luz reflejada por el dispositivo. Además, en este capítulo se caracterizan los dispositivos fabricados tanto mecánica como ópticamente, demostrando la aparición de distintos fenómenos ópticos y mecánicos que optimizan la medida gracias al uso de luz coherente. Estos fenómenos serán aprovechados en los siguientes capítulos.

En el capítulo 4 se usan los dispositivos RMT fabricados y el sistema interferométrico para la medida de distintas propiedades de fluidos (densidad, índice de refracción, composición química, compresibilidad y masa molecular). Para ello se sigue la frecuencia de resonancia (señal mecánica) y la reflectividad normalizada (señal óptica) en función del tiempo mientras se pasan distintas disoluciones a través del dispositivo o bien mientras se comprime hidrostáticamente el fluido. Los resultados experimentales obtenidos se complementan con el desarrollo de modelos teóricos.

El capítulo 5 es el primer capítulo dedicado a la detección de partículas en un entorno líquido empleando los dispositivos RMT. En este capítulo se demuestra que la medida de la frecuencia de resonancia en función del tiempo (señal mecánica) no permite una distinción inequívoca entre partículas diferentes (debido a la dependencia de la densidad y el tamaño de la masa boyante) y se propone complementar la medida mecánica con la medida simultánea de la potencia reflejada en función del tiempo (señal óptica). Se demuestra que la medida combinada de las señales óptica y mecánica permite una distinción inequívoca entre distintas poblaciones de partículas que no serían distinguibles si se midiesen las señales óptica y mecánica de manera independiente.

En el capítulo 6, se estudian las fuerzas hidrodinámicas que actúan sobre las partículas introducidas en los dispositivos. El estudio de estas fuerzas se realiza tanto con la introducción de modelos analíticos como mediante la realización de simulaciones por elementos finitos. La validez de estos modelos se comprueba experimentalmente mediante la medida de la velocidad de las partículas, lo que además supone un parámetro de medida adicional. Finalmente, se demuestra que la introducción de este parámetro permite una distinción de las partículas aún más inequívoca ya que se puede obtener individualmente para cada partícula de manera simultánea a las medidas de cambio en frecuencia y reflectividad.

En el capítulo 7 se aplican los métodos de detección mecano-óptica y análisis de fuerzas hidrodinámicas, desarrollados en los dos capítulos precedentes, a la caracterización de dos líneas celulares del mismo tejido (una línea sana y otra línea tumoral). En este capítulo se demuestra la utilidad de la técnica

desarrollada para su aplicación en biología y medicina obteniendo parámetros biofísicos de gran interés que se pueden relacionar tanto con la fase del ciclo celular en el que se encuentra cada célula (densidad y tamaño), como con el tipo de línea celular a la que pertenecen (reflectividad/índice de refracción). Además, en este capítulo se demuestra que esta técnica permite distinguir entre las dos líneas celulares empleadas con una precisión del 76%.

Al final de esta tesis se incluye un capítulo de conclusiones generales, en el que se hace un resumen de los resultados más significativos conseguidos a lo largo de esta tesis, y otro capítulo de perspectivas futuras, en el que se señalan posibles líneas de investigación a seguir en los próximos años partiendo de los resultados mostrados en esta tesis.

Bibliografía

- 1 Walter, P. *et al.* Early Use of PbS Nanotechnology for an Ancient Hair Dyeing Formula. *Nano Letters* **6**, 2215-2219, doi:10.1021/nl061493u (2006).
- 2 Chiari, G., Giustetto, R., Druzik, J., Doehne, E. & Ricchiardi, G. Pre-columbian nanotechnology: reconciling the mysteries of the maya blue pigment. *Applied Physics A* **90**, 3-7, doi:10.1007/s00339-007-4287-z (2008).
- 3 Reibold, M. *et al.* Carbon nanotubes in an ancient Damascus sabre. *Nature* **444**, 286-286, doi:10.1038/444286a (2006).
- 4 Feynman, R. P. There's plenty of room at the bottom [data storage]. *Journal of Microelectromechanical Systems* **1**, 60-66, doi:10.1109/84.128057 (1992).
- 5 Waldrop, M. M. The chips are down for Moore's law. *Nature* **530**, 4, doi:10.1038/530144a (2016).
- 6 Capasso, F. Band-Gap Engineering: From Physics and Materials to New Semiconductor Devices. *Science* **235**, 172, doi:10.1126/science.235.4785.172 (1987).
- 7 James, S. A. *et al.* Quantification of ZnO Nanoparticle Uptake, Distribution, and Dissolution within Individual Human Macrophages. *ACS Nano* **7**, 10621-10635, doi:10.1021/nn403118u (2013).
- 8 Whitesides, G. M. The 'right' size in nanobiotechnology. *Nature Biotechnology* **21**, 1161-1165, doi:10.1038/nbt872 (2003).

- 9 Binnig, G., Quate, C. F. & Gerber, C. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters* **56**, 930-933, doi:10.1103/PhysRevLett.56.930 (1986).
- 10 Thundat, T., Warmack, R. J., Chen, G. Y. & Allison, D. P. Thermal and ambient-induced deflections of scanning force microscope cantilevers. **64**, 2894-2896, doi:10.1063/1.111407 (1994).
- 11 Thundat, T., Chen, G. Y., Warmack, R. J., Allison, D. P. & Wachter, E. A. Vapor Detection Using Resonating Microcantilevers. *Analytical Chemistry* **67**, 519-521, doi:10.1021/ac00099a006 (1995).
- 12 Oden, P. I., Chen, G. Y., Steele, R. A., Warmack, R. J. & Thundat, T. Viscous drag measurements utilizing microfabricated cantilevers. **68**, 3814-3816, doi:10.1063/1.116626 (1996).
- 13 Fritz, J. *et al.* Translating Biomolecular Recognition into Nanomechanics. **288**, 316-318, doi:10.1126/science.288.5464.316 %J Science (2000).
- 14 Ilic, B. *et al.* Mechanical resonant immunospecific biological detector. **77**, 450-452, doi:10.1063/1.127006 (2000).
- 15 Chaste, J. *et al.* A nanomechanical mass sensor with yoctogram resolution. *Nature Nanotechnology* **7**, 301-304, doi:10.1038/nnano.2012.42 (2012).
- 16 Naik, A. K., Hanay, M. S., Hiebert, W. K., Feng, X. L. & Roukes, M. L. Towards single-molecule nanomechanical mass spectrometry. *Nature Nanotechnology* **4**, 445-450, doi:10.1038/nnano.2009.152 (2009).
- 17 Ramos, D., Tamayo, J., Mertens, J., Calleja, M. & Zaballos, A. Origin of the response of nanomechanical resonators to bacteria adsorption. *Journal of Applied Physics* **100**, 106105-106108, doi:10.1063/1.2370507 (2006).
- 18 Tamayo, J., Ramos, D., Mertens, J. & Calleja, M. Effect of the adsorbate stiffness on the resonance response of microcantilever sensors. *Applied Physics Letters* **89**, 224104-224107, doi:10.1063/1.2388925 (2006).
- 19 Malvar, O. *et al.* Mass and stiffness spectrometry of nanoparticles and whole intact bacteria by multimode nanomechanical resonators. *Nature Communications* **7**, 13452, doi:10.1038/ncomms13452 (2016).
- 20 Kulasinski, K., Guyer, R., Keten, S., Derome, D. & Carmeliet, J. Impact of Moisture Adsorption on Structure and Physical Properties of Amorphous

Biopolymers. *Macromolecules* **48**, 2793-2800, doi:10.1021/acs.macromol.5b00248 (2015).

21 Stassi, S. *et al.* Nanomechanical DNA resonators for sensing and structural analysis of DNA-ligand complexes. *Nature Communications* **10**, 1690, doi:10.1038/s41467-019-09612-0 (2019).

22 Gil-Santos, E. *et al.* Optomechanical detection of vibration modes of a single bacterium. *Nature Nanotechnology* **15**, 469-474, doi:10.1038/s41565-020-0672-y (2020).

23 Whitesides, G. M. The origins and the future of microfluidics. *Nature* **442**, 368-373, doi:10.1038/nature05058 (2006).

24 Moldavan, A. PHOTO-ELECTRIC TECHNIQUE FOR THE COUNTING OF MICROSCOPICAL CELLS. *Science* **80**, 188-189, doi:10.1126/science.80.2069.188 (1934).

25 Martin, A. J. P. Partition Chromatography. **19**, 517-542, doi:10.1146/annurev.bi.19.070150.002505 (1950).

26 Monnig, C. A. & Kennedy, R. T. Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry* **66**, 280-314, doi:10.1021/ac00084a013 (1994).

27 Terry, S. C., Jerman, J. H. & Angell, J. B. A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer. *IEEE Transactions on Electron Devices* **26**, 1880-1886, doi:10.1109/T-ED.1979.19791 (1979).

28 Xia, Y. & Whitesides, G. M. SOFT LITHOGRAPHY. **28**, 153-184, doi:10.1146/annurev.matsci.28.1.153 (1998).

29 Amini, H., Lee, W. & Di Carlo, D. Inertial microfluidic physics. *Lab on a Chip* **14**, 2739-2761, doi:10.1039/C4LC00128A (2014).

30 Chung, A. J. *et al.* Microstructure-induced helical vortices allow single-stream and long-term inertial focusing. *Lab on a Chip* **13**, 2942-2949, doi:10.1039/C3LC41227J (2013).

31 Di Carlo, D., Edd, J. F., Humphry, K. J., Stone, H. A. & Toner, M. Particle Segregation and Dynamics in Confined Flows. *Physical Review Letters* **102**, 094503, doi:10.1103/PhysRevLett.102.094503 (2009).

32 Urbanska, M. *et al.* A comparison of microfluidic methods for high-throughput cell deformability measurements. *Nature Methods*, doi:10.1038/s41592-020-0818-8 (2020).

- 33 Leblanc-Hotte, A. *et al.* On-chip refractive index cytometry for whole-cell deformability discrimination. *Lab on a Chip* **19**, 464-474, doi:10.1039/C8LC00938D (2019).
- 34 Liang, X. J., Liu, A. Q., Lim, C. S., Ayi, T. C. & Yap, P. H. Determining refractive index of single living cell using an integrated microchip. *Sensors and Actuators A: Physical* **133**, 349-354, doi:<https://doi.org/10.1016/j.sna.2006.06.045> (2007).
- 35 Liu, P. Y. *et al.* Cell refractive index for cell biology and disease diagnosis: past, present and future. *Lab on a Chip* **16**, 634-644, doi:10.1039/C5LC01445J (2016).
- 36 Hamza, B. *et al.* Optofluidic real-time cell sorter for longitudinal CTC studies in mouse models of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**, 2232, doi:10.1073/pnas.1814102116 (2019).
- 37 Suzuki, Y. *et al.* Label-free chemical imaging flow cytometry by high-speed multicolor stimulated Raman scattering. **116**, 15842-15848, doi:10.1073/pnas.1902322116 %J Proceedings of the National Academy of Sciences (2019).
- 38 Nitta, N. *et al.* Raman image-activated cell sorting. *Nature Communications* **11**, 3452, doi:10.1038/s41467-020-17285-3 (2020).
- 39 Feng, Y., Huang, L., Zhao, P., Liang, F. & Wang, W. A Microfluidic Device Integrating Impedance Flow Cytometry and Electric Impedance Spectroscopy for High-Efficiency Single-Cell Electrical Property Measurement. *Analytical Chemistry* **91**, 15204-15212, doi:10.1021/acs.analchem.9b04083 (2019).
- 40 Bhatia, S. N. & Ingber, D. E. Microfluidic organs-on-chips. *Nature Biotechnology* **32**, 760-772, doi:10.1038/nbt.2989 (2014).
- 41 Burg, T. P. & Manalis, S. R. Suspended microchannel resonators for biomolecular detection. **83**, 2698-2700, doi:10.1063/1.1611625 (2003).
- 42 Burg, T. P. *et al.* Weighing of biomolecules, single cells and single nanoparticles in fluid. *Nature* **446**, 1066-1069, doi:10.1038/nature05741 (2007).
- 43 Lee, J., Shen, W., Payer, K., Burg, T. P. & Manalis, S. R. Toward Attogram Mass Measurements in Solution with Suspended Nanochannel Resonators. *Nano Letters* **10**, 2537-2542, doi:10.1021/nl101107u (2010).

- 44 Byun, S. *et al.* Characterizing deformability and surface friction of cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 7580-7585, doi:10.1073/pnas.1218806110 (2013).
- 45 Kang, J. H. *et al.* Noninvasive monitoring of single-cell mechanics by acoustic scattering. *Nature Methods* **16**, 263-269, doi:10.1038/s41592-019-0326-x (2019).
- 46 Cetin, A. E. *et al.* Determining therapeutic susceptibility in multiple myeloma by single-cell mass accumulation. *Nature Communications* **8**, 1613-1624, doi:10.1038/s41467-017-01593-2 (2017).
- 47 Calistri, N. L. *et al.* Microfluidic active loading of single cells enables analysis of complex clinical specimens. *Nature Communications* **9**, 4784-4790, doi:10.1038/s41467-018-07283-x (2018).
- 48 Travera LLC, <<https://travera.com/>> (2021).
- 49 Bryan, A. K. *et al.* Measuring single cell mass, volume, and density with dual suspended microchannel resonators. *Lab on a Chip* **14**, 569-576, doi:10.1039/C3LC51022K (2014).
- 50 Byun, S., Hecht, V. C. & Manalis, S. R. Characterizing Cellular Biophysical Responses to Stress by Relating Density, Deformability, and Size. *Biophys J* **109**, 1565-1573, doi:10.1016/j.bpj.2015.08.038 (2015).
- 51 Malvar, O. *et al.* Highly sensitive measurement of liquid density in air using suspended microcapillary resonators. *Sensors (Basel)* **15**, 7650-7657, doi:10.3390/s150407650 (2015).
- 52 Ko, J., Lee, D., Lee, B. J., Kauh, S. K. & Lee, J. Micropipette Resonator Enabling Targeted Aspiration and Mass Measurement of Single Particles and Cells. *ACS Sensors* **4**, 3275-3282, doi:10.1021/acssensors.9b01843 (2019).
- 53 Lee, D. *et al.* Pulled microcapillary tube resonators with electrical readout for mass sensing applications. *Scientific Reports* **6**, 33799-33807, doi:10.1038/srep33799
<https://www.nature.com/articles/srep33799#supplementary-information> (2016).
- 54 Calmo, R. *et al.* Monolithic glass suspended microchannel resonators for enhanced mass sensing of liquids. *Sensors and Actuators B: Chemical* **283**, 298-303, doi:<https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.12.019> (2019).

55 Stockslager, M. A. *et al.* Rapid and high-precision sizing of single particles using parallel suspended microchannel resonator arrays and deconvolution. *Review of Scientific Instruments* **90**, 085004-085013, doi:10.1063/1.5100861 (2019).

Capítulo 1:

Fundamentos Teóricos

En esta tesis se propone el uso de resonadores mecánicos huecos, que además contienen un fluido en movimiento en su interior, por lo que en estos resonadores aparecerán fenómenos propios tanto de la mecánica de sólidos como de la mecánica de fluidos. En este capítulo se expondrán diversos conceptos generales tanto de teoría de la elasticidad como de dinámica de fluidos que estarán presentes en el resto de capítulos de esta tesis. Los conceptos que se desarrollan en este capítulo describen fenómenos que tendrán lugar en los resonadores fabricados, por lo que aparecerán de manera recurrente en el resto de capítulos y se hará referencia a ellos.

En este capítulo, los epígrafes del 1.1. al 1.5. se dedican a la teoría de la elasticidad, desarrollada principalmente durante el s. XIX por Augustin L. Cauchy y Siméon D. Poisson. Además, se pone especial interés en su aplicación concreta al caso de barras en las que una de sus dimensiones es mucho mayor que las otras (modelo de Euler-Bernouilli), modelo al que se ajusta bien el movimiento de los resonadores empleados. Por otra parte, los epígrafes 1.6. y 1.7. se dedican a la dinámica de fluidos, desarrollada también en el s. XIX principalmente por Claude-Louis H. Navier y George G. Stokes, con especial interés en la aplicación al caso de los flujos laminares, que es el tipo de flujo que se dará en los experimentos con los resonadores. Por último, el epígrafe 1.8. se encuentra dedicado a la interacción entre fluidos y sólidos, estudiando las fuerzas que ejerce un fluido sobre un sólido.

1.1. Descripción del sólido elástico

Un sólido elástico es aquel en el que al aplicar una fuerza externa puede cambiar tanto su forma como su volumen. Cuando esta fuerza deja de actuar, el sólido elástico recupera su volumen y forma originales (la deformación es reversible). La deformación del sólido y las tensiones que actúan sobre el

mismo pueden expresarse mediante el tensor de deformación y el tensor de tensiones respectivamente. A continuación se desarrollan estos tensores.

Tensor de deformación

Para definir el tensor de deformación (ϵ_{ij}) tomaremos dos puntos (P, Q) de un sólido infinitesimalmente próximos que, tras aplicar una fuerza, pasarán a ocupar unas nuevas posiciones (P', Q' , Fig. 1.1.). Inicialmente, la separación entre estos puntos (dx) tendrá la siguiente forma (Ec. 1.1).

$$dx_i = Q_i - P_i \quad (1.1)$$

Tanto en la ecuación 1.1 como en las siguientes se va a emplear el convenio de suma de Einstein para índices repetidos, denotando como x_1, x_2, x_3 las coordenadas espaciales cartesianas x, y, z .

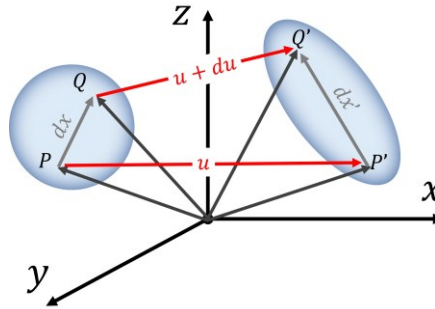


Figura 1.1.: Deformación del sólido elástico. El mismo sólido elástico en ausencia de fuerzas externas (izquierda) y tras aplicar una fuerza externa (derecha). Los puntos P y Q en el sólido inicial pasan a tomar nuevas posiciones, P' y Q' , tras la aplicación de la fuerza.

Tras aplicar una fuerza, la diferencia entre la posición inicial (x) y la posición final (x') de cada punto estará dada por el vector desplazamiento (u , Ec.1.2).

$$u_i = x'_i - x_i \quad (1.2)$$

Por lo tanto, la nueva separación entre estos puntos (dx') dependerá de la diferencia entre el vector desplazamiento en ambos puntos (du , Ec. 1.3).

$$dx'_i = Q'_i - P'_i = dx_i + du_i \quad (1.3)$$

Calculando la longitud entre los puntos P' y Q' se llega a la siguiente expresión (Ec. 1.4).

$$\begin{aligned} |dx'|^2 &= (dx_i + du_i)(dx_j + du_j) \\ &= dx_i dx_j + dx_i du_j + dx_j du_i + du_i du_j \end{aligned} \quad (1.4)$$

Sustituyendo en la ecuación 1.4 $du_i = (\partial u_i / \partial x_j) dx_j$ y, teniendo en cuenta que $|dx|^2 = dx_i dx_i$, la anterior expresión se reduce de la siguiente forma (Ec. 1.5).

$$|dx'|^2 = |dx|^2 + \left(\frac{\partial u_i}{\partial x_j} + \frac{\partial u_j}{\partial x_i} + \frac{\partial u_k}{\partial x_i} \frac{\partial u_k}{\partial x_j} \right) dx_i dx_j \quad (1.5)$$

En la ecuación 1.5 el primer sumando es el valor inicial de la distancia relativa entre ambos puntos, mientras que el segundo representa la variación de la distancia relativa entre estos dos puntos y es lo que se define como tensor deformación (ε_{ij}). Utilizando la notación $u_{i,j} = \frac{\partial u_i}{\partial x_j}$, el tensor deformación adquiere la siguiente forma (Ec. 1.6).

$$\varepsilon_{ij} = \frac{1}{2} (u_{i,j} + u_{j,i} + u_{k,i} u_{j,k}) \quad (1.6)$$

Si se consideran deformaciones pequeñas (mucho menores que el tamaño característico del sólido) el término cruzado, $u_{k,i} u_{j,k}$, puede despreciarse (aproximación lineal, Ec. 1.7).

$$\varepsilon_{ij} = \frac{1}{2} (u_{i,j} + u_{j,i}) \quad (1.7)$$

El tensor deformación puede expresar tanto deformaciones en las que la forma del sólido cambia manteniendo constante su volumen (deformación de corte) como deformaciones en las que el sólido cambia de volumen pero mantiene su forma (compresión hidrostática). El tensor deformación se puede expresar como la combinación de una deformación de corte y una compresión hidrostática¹ (Ec. 1.8). Para esto, debe tenerse en cuenta que, en el caso de la deformación de corte, la traza del tensor deformación debe ser nula mientras que, en el caso de una compresión hidrostática, el tensor deformación tomará una forma diagonal.

$$\varepsilon_{ij} = \left(\varepsilon_{ij} - \frac{1}{3} \delta_{ij} \varepsilon_{kk} \right) + \frac{1}{3} \delta_{ij} \varepsilon_{kk} \quad (1.8)$$

Siendo δ_{ij} la delta de Kronecker.

Tensor de tensiones

Definiremos el tensor de tensiones (σ_{ij}) a partir del estudio de las fuerzas que actúan sobre un diferencial de volumen del sólido. Cuando se aplica una fuerza externa que deforma el sólido, aparecerán en este fuerzas internas de dirección opuesta a las externas para alcanzar el equilibrio mecánico (Fig 1.2.). Estas fuerzas internas tienen su origen en las fuerzas de cohesión interatómicas. La fuerza resultante será la integral de las distintas fuerzas que actúan sobre dicho diferencial de volumen (Ec. 1.9). Aplicando el Teorema de Gauss² sabemos que la integral de volumen de una magnitud vectorial se corresponde con la integral del gradiente de una magnitud escalar en la superficie que delimita el volumen. En el caso de estas fuerzas esta magnitud escalar es el tensor de tensiones (σ_{ij} , Ec. 1.9).

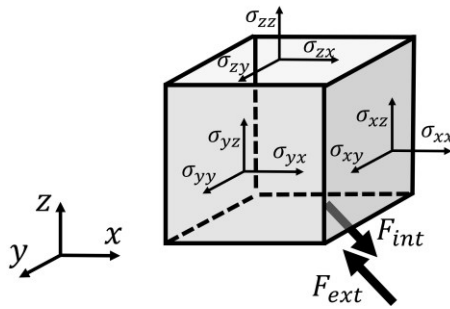


Figura 1.2.: Tensor de tensiones y fuerza aplicada. Al aplicar una fuerza externa (F_{ext}) sobre un volumen del sólido elástico, aparecerá en este una fuerza interna (F_{int}) de igual magnitud y sentido opuesto a la fuerza externa para que el sólido se mantenga en equilibrio mecánico. Esta fuerza interna se puede entender como la integral del tensor de tensiones (σ_{ij}) en la superficie.

$$F_i = \int_V F_i dV = \int_V \nabla \sigma dV = \int_V \frac{\partial \sigma_{ij}}{\partial x_j} dV = \int_S \sigma_{ij} dS_j \quad (1.9)$$

Para conocer algunas propiedades del tensor de tensiones se puede calcular el momento que actúa sobre el sólido. El momento (M_{ij}) se define como el producto vectorial de la fuerza y la posición, que, teniendo en cuenta la relación entre fuerza y tensor de tensiones (Ec. 1.9), toma la siguiente forma (Ec. 1.10).

$$M_{ij} = \int_V (F_i x_j - F_j x_i) dV = \int_V \left(\frac{\partial \sigma_{ik}}{\partial x_k} x_j - \frac{\partial \sigma_{jk}}{\partial x_k} x_i \right) dV \quad (1.10)$$

Desarrollando la anterior expresión se llega al siguiente resultado (Ec. 1.11).

$$M_{ij} = \int_V \frac{\partial(\sigma_{ik}x_k - \sigma_{jk}x_i)}{\partial x_k} dV - \int_V \left(\sigma_{ik} \frac{\partial x_j}{\partial x_k} - \sigma_{jk} \frac{\partial x_i}{\partial x_k} \right) dV \quad (1.11)$$

En la primera integral de la ecuación 1.11 se puede aplicar el teorema de Green² para obtener una integral de superficie, mientras que en la segunda integral se puede sustituir $\partial x_j / \partial x_k$ como el tensor identidad. De esta manera se simplifica la expresión del momento de fuerzas (Ec. 1.12).

$$M_{ij} = \int_S (\sigma_{ik}x_k - \sigma_{jk}x_i) dS - \int_V (\sigma_{jk} - \sigma_{kj}) dV \quad (1.12)$$

Para que el momento se pueda expresar como una integral de superficie la integral de volumen tendrá que anularse, por lo que se deduce que el tensor de tensiones tiene que ser simétrico (Ec. 1.13).

$$\sigma_{jk} = \sigma_{kj} \quad (1.13)$$

Termodinámica de las deformaciones

Con los tensores de tensiones y deformación definidos ahora se puede calcular el trabajo realizado por una deformación: lo que permitirá posteriormente obtener relaciones termodinámicas para poder relacionar el tensor deformación y el de tensiones. El trabajo realizado por las fuerzas internas (W) para una pequeña deformación tendrá la siguiente forma (Ec. 1.14).

$$\int \delta W dV = \int F_i \delta u_i dV = \int \frac{\partial \sigma_{ij}}{\partial x_j} \delta u_i dV \quad (1.14)$$

La ecuación 1.14 se puede expandir como una integral por partes (Ec. 1.15).

$$\int \delta W dV = \int \sigma_{ij} \delta u_i ds_j - \int \sigma_{ij} \frac{\partial \delta u_i}{\partial x_j} dV \quad (1.15)$$

Si la ecuación 1.15 se aplica a un sólido ilimitado, que no está deformado en el infinito, entonces la primera integral deberá ser nula y el trabajo realizado por la deformación se puede reescribir de la siguiente forma (Ec. 1.16).

$$\int \delta W dV = -\frac{1}{2} \int \sigma_{ij} \delta \left(\frac{\partial u_i}{\partial x_j} + \frac{\partial u_j}{\partial x_i} \right) dV = - \int \sigma_{ij} \delta \epsilon_{ij} dV \quad (1.16)$$

En la ecuación 1.16 se pueden igualar los integrandos, lo que permite conseguir una relación diferencial entre trabajo, tensor de tensiones y tensor deformación (Ec. 1.17).

$$\delta W = -\sigma_{ij}\delta\varepsilon_{ij} \quad (1.17)$$

Una vez conocido el trabajo realizado por las deformaciones se pueden definir la energía interna (\mathbb{U} , Ec. 1.18) y la energía libre de Helmholtz* (\mathcal{F} , Ec. 1.19) para el sistema.

$$d\mathbb{U} = d\mathbb{Q} - dW = TdS + \sigma_{ij}\delta\varepsilon_{ij} \quad (1.18)$$

$$d\mathcal{F} = d\mathbb{U} - SdT = -SdT + \sigma_{ij}\delta\varepsilon_{ij} \quad (1.19)$$

Siendo \mathbb{Q} el calor, T la temperatura y S la entropía del sistema.

Con las relaciones obtenidas en las ecuaciones 1.18 y 1.19 se puede definir el potencial termodinámico (Φ , Ec. 1.20).

$$\Phi = \mathbb{U} - TS - \sigma_{ij}\delta\varepsilon_{ij} = \mathcal{F} - \sigma_{ij}\varepsilon_{ij} \quad (1.20)$$

Finalmente, se puede derivar este potencial e igualando $d\Phi = 0$ se obtiene la ecuación de estado (Ec. 1.21).

$$\sigma_{ij} = \left(\frac{\partial\mathbb{U}}{\partial\varepsilon_{ij}}\right)_S = \left(\frac{\partial\mathcal{F}}{\partial\varepsilon_{ij}}\right)_T \quad (1.21)$$

1.2. Ley de Hooke

Una vez definidos los tensores deformación y de tensiones se va a estudiar la relación entre ambos (Ley de Hooke). Para deducir esta relación se va a estudiar la energía del sólido en función del tensor deformación, para lo cual se supondrán deformaciones pequeñas y que el sólido mantiene una temperatura constante en todo momento. Al no conocer la forma explícita de la energía libre, se puede tratar a esta como una función desarrollada en serie de potencias (Ec. 1.22).

$$\mathcal{F} = \sum_n a_{ij,n} \varepsilon_{ij}^n \quad (1.22)$$

Para definir esta energía libre se considera que el estado de reposo es aquel en el que el sólido se encuentra en ausencia de fuerzas externas. Esta condición

* De aquí en adelante la energía libre de Helmholtz se expresará simplemente como «energía libre» ya que, como en ningún momento se hará referencia a la energía libre de Gibbs, no cabe lugar a confusión.

implica que para $\varepsilon_{ij} = \mathbf{0}$ el tensor de tensiones es $\sigma_{ij} = \mathbf{0}$. Además, como la energía libre tiene que ser escalar se descartan los términos impares del desarrollo. Por otra parte, como se están considerando deformaciones pequeñas se pueden despreciar los términos de orden superior a 2. Tras aplicar estas simplificaciones, se obtiene que la energía libre tiene la siguiente forma (Ec. 1.23).

$$\mathcal{F} = \mathcal{F}_0 + \frac{\chi}{2} \varepsilon_{ii}^2 + \frac{\eta}{2} \varepsilon_{ij}^2 \quad (1.23)$$

Siendo \mathcal{F}_0 la energía libre sin deformar, χ y η los coeficientes de Lamé.

Si se sustituye el tensor deformación por su expresión en función de la deformación de corte y compresión hidrostática (Ec. 1.8), la expresión de la energía libre quedará expresada de la siguiente forma (Ec. 1.24).

$$\mathcal{F} = \mathcal{F}_0 + \eta \left(\varepsilon_{ij} - \frac{1}{3} \delta_{ij} \varepsilon_{kk} \right)^2 + \frac{K}{2} \varepsilon_{kk}^2 \quad (1.24)$$

Siendo $\chi + \frac{2}{3}\eta$ el módulo de compresión hidrostática (K)¹.

Una vez se ha definido la energía libre en función del tensor deformación se podrá calcular la relación entre tensor de tensiones y tensor deformación despejando en la ecuación de estado (Ec. 1.21). Para lo cual se va a calcular primero el diferencial de la energía libre (Ec. 1.25).

$$\begin{aligned} d\mathcal{F} &= 2\eta \left(\varepsilon_{ij} - \frac{1}{3} \delta_{ij} \varepsilon_{kk} \right) d\varepsilon_{ij} + K \varepsilon_{kk} d\varepsilon_{kk} \\ &= \left(2\eta \left[\varepsilon_{ij} - \frac{1}{3} \delta_{ij} \varepsilon_{kk} \right] d\varepsilon_{ij} + K \delta_{ij} \varepsilon_{kk} \right) d\varepsilon_{ij} \end{aligned} \quad (1.25)$$

Ahora, despejando en la ecuación de estado para una temperatura constante (Ec. 1.21), se llega a que el tensor de tensiones tiene la siguiente forma (Ec. 1.26).

$$\sigma_{ij} = 2\eta \left(\varepsilon_{ij} - \frac{1}{3} \delta_{ij} \varepsilon_{kk} \right) + K \delta_{ij} \varepsilon_{kk} \quad (1.26)$$

La ecuación 1.26 se puede despejar para conseguir una expresión del tensor deformación como función lineal del tensor de tensiones. Esta expresión es conocida como Ley de Hooke (Ec. 1.27).

$$\varepsilon_{ij} = \frac{1}{2\eta} \left(\sigma_{ij} - \frac{1}{3} \delta_{ij} \sigma_{kk} \right) + \frac{1}{9K} \delta_{ij} \sigma_{kk} \quad (1.27)$$

También es común expresar la ley de Hooke en función del módulo de Young (E , Ec. 1.28) y el coeficiente de Poisson (ν , Ec. 1.29).

$$E = \frac{9K\eta}{3K + \eta} \quad (1.28)$$

$$\nu = \frac{3K - 2\eta}{6K + 2\eta} \quad (1.29)$$

Al sustituir las ecuaciones 1.28 y 1.29 en la ecuación 1.27 se obtiene Ley de Hooke en función del módulo de Young y el coeficiente de Poisson (Ec. 1.30 y 1.31).

$$\sigma_{ij} = \frac{E}{1 + \nu} \left(\varepsilon_{ij} + \frac{\nu}{1 - 2\nu} \delta_{ij} \varepsilon_{kk} \right) \quad (1.30)$$

$$\varepsilon_{ij} = \frac{1}{E} \left([1 + \nu] \sigma_{ij} - \nu \delta_{ij} \sigma_{kk} \right) \quad (1.31)$$

1.3. Modelo de Euler-Bernouilli: vibración de barras y palancas

El modelo de Euler-Bernouilli es un caso concreto dentro de la teoría de la elasticidad válido para los casos en los que el sólido tiene un espesor pequeño (o, dicho de otra manera, una de sus dimensiones es mucho más grande que las otras) y sus deformaciones son pequeñas (comparadas con su espesor). Además, en este modelo solo se consideran las deformaciones flexurales, es decir, aquellas que se producen en la dirección normal a la superficie de la estructura y manteniendo las secciones transversales del elemento paralelas entre sí. Además, para mayor simplicidad, se tendrá en cuenta que el material en el que se producen las deformaciones es lineal, isótropo y homogéneo. Por lo general, este modelo resulta muy útil para describir el movimiento de resonadores nanomecánicos, como es el caso de los dispositivos desarrollados en esta tesis.

Condiciones del modelo

Supongamos una barra delgada que es deformada flexuralmente: en algunos lugares, la barra tendrá una curvatura cóncava (donde la barra se contrae) y en otros lugares, será convexa (donde la barra se dilata). La deformación en las zonas dilatadas tiene signo opuesto a la deformación en las zonas contraídas,

por lo que la deformación cambiará continuamente entre una zona y otra dando lugar a una superficie (o eje) en la que la deformación es nula (superficie o eje neutro, Fig.1.3.). En el caso de un material isótropo y homogéneo, este eje neutro se encuentra a mitad del espesor de la palanca (h).

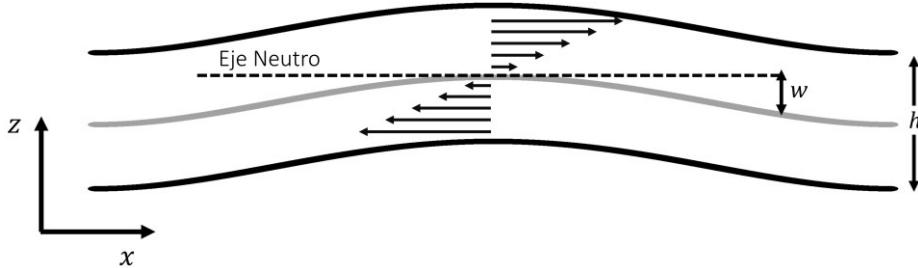


Figura 1.3.: Eje neutro. Cuando una barra de espesor h se deforma, una de sus superficies será cóncava y la otra convexa. La línea (o superficie) en la que se produce el cambio de curvatura (línea gris) recibe el nombre de eje (o superficie) neutro. En el modelo de Euler-Bernoulli las deformaciones (w) se pueden referir respecto al eje neutro en ausencia de fuerzas externas (línea discontinua).

Como en la superficie neutra la deformación axial se mantiene nula, será un buen sistema al que referir el movimiento de la palanca, siendo esta superficie el plano xy . Las deformaciones de la palanca en las direcciones x e y serán muy pequeñas en comparación con las deformaciones en la dirección ortogonal a la superficie neutra (z), por lo que se pueden despreciar. De esta manera, el vector desplazamiento de la palanca tendrá la siguiente forma (Ec. 1.32).

$$u_x = 0 \quad u_y = 0 \quad u_z = w(x, y) \quad (1.32)$$

Las fuerzas que habrá que aplicar sobre la barra para deformarla son muy pequeñas en comparación con las tensiones internas, por lo que podemos considerar nulos los elementos fuera de la diagonal del tensor de tensiones así como la componente zz (Ec. 1.33).

$$\sigma_{xz} = \sigma_{yz} = \sigma_{zz} = 0 \quad (1.33)$$

Al tomar como nulas estas componentes del tensor de tensiones (Ec. 1.33) y despejarlas en las ecuaciones de la ley de Hooke (Ec.1.31), se obtienen las siguientes condiciones (Ec. 1.34).

$$\frac{\partial u_x}{\partial z} = -\frac{\partial u_z}{\partial x} = -\frac{\partial w}{\partial x} \quad \frac{\partial u_y}{\partial z} = -\frac{\partial u_z}{\partial y} = -\frac{\partial w}{\partial y} \quad (1.34)$$

$$u_{zz} = -\frac{\nu}{1-\nu}(u_{xx} + u_{yy})$$

De las condiciones anteriores, se deduce el valor de u_x y u_y (Ec. 1.35).

$$u_x = -z \frac{\partial w}{\partial x} \quad u_y = -z \frac{\partial w}{\partial y} \quad (1.35)$$

Lo que permite determinar las componentes del tensor de tensiones de la palanca (Ec. 1.36).

$$\begin{aligned} \varepsilon_{xx} &= -z \frac{\partial^2 w}{\partial x^2} & \varepsilon_{yy} &= -z \frac{\partial^2 w}{\partial y^2} & \varepsilon_{zz} &= z \left(\frac{\partial^2 w}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 w}{\partial y^2} \right) \\ \varepsilon_{xy} &= -z \frac{\partial^2 w}{\partial x \partial y} & \varepsilon_{xz} &= 0 & \varepsilon_{yz} &= 0 \end{aligned} \quad (1.36)$$

Todo esto permite llegar a la versión de la ley de Hooke para barras y palancas (Ec. 1.37).

$$\sigma_{xx} = \frac{E}{1 - \nu^2} \varepsilon_{xx} = -E^* z \frac{\partial^2 w}{\partial x^2} \quad (1.37)$$

Siendo $E^* = \frac{E}{1 - \nu^2}$ el módulo de elasticidad biaxial, el cual se puede igualar al módulo de Young en caso de que la estructura se pueda considerar unidimensional.

Deducción de la Ecuación de Euler-Bernouilli

Para obtener la ecuación de Euler-Bernouilli se estudia la dinámica de una sección transversal de una palanca que se encuentra en equilibrio mecánico, de esta manera, la suma de las fuerzas y momentos externos es igual a cero (Fig. 1.4.). Aplicando la segunda ley de Newton³ en esta sección se obtiene la ecuación 1.38.

$$\sum F_{int} = \frac{\partial F_z}{\partial x} dx = \rho A \frac{\partial^2 w}{\partial t^2} dx \quad (1.38)$$

Por otra parte, al calcular la suma de momentos internos según la ecuación 1.12 y aplicando las condiciones del modelo de Euler-Bernouilli se obtiene que la única componente no nula tiene la siguiente forma (Ec. 1.39).

$$M_y = - \iint E z^2 \frac{\partial^2 w(x)}{\partial x^2} dy dz \quad (1.39)$$

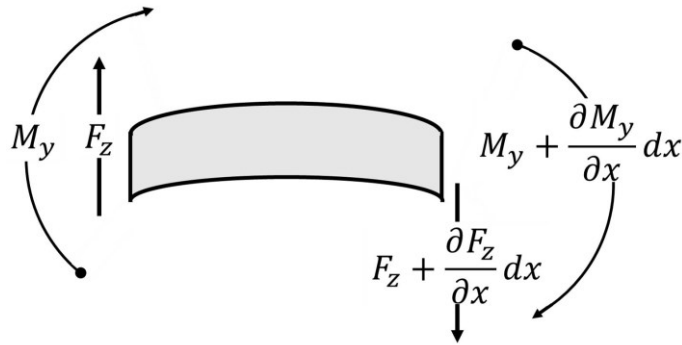


Figura 1.4.: Dinámica en la sección transversal de una barra. Diagrama de fuerzas y momentos que actúan en la sección transversal de una barra.

Tanto el módulo de Young como la curvatura, $\partial^2 w(x)/\partial x^2$, son independientes de las variables z e y , por lo que se pueden sacar de la integral, lo que permite dejar el momento de fuerzas en función del segundo momento de área (I_y , Ec. 1.40).

$$M_y = -E \frac{\partial^2 w(x)}{\partial x^2} \iint z^2 dydz = -E \frac{\partial^2 w(x)}{\partial x^2} I_y \quad (1.40)$$

Como la palanca se encuentra en equilibrio mecánico, la suma de los momentos internos y los momentos producidos por las fuerzas externas se anularán (Ec. 1.41).

$$M_y = \frac{\partial M^{int}}{\partial x} dx + F_j dx_k = 0 \quad (1.41)$$

De la anterior ecuación (Ec. 1.41) se deduce la relación entre momento y fuerza (Ec. 1.42).

$$F_z = -\frac{\partial M^{int}_y}{\partial x} \quad (1.42)$$

Sustituyendo con las igualdades obtenidas anteriormente (Ec 1.38 y Ec. 1.42) se llega finalmente a la Ecuación de Euler-Bernouilli (Ec. 1.43).

$$\rho A \frac{\partial^2 w}{\partial t^2} + \frac{\partial}{\partial x^2} \left(EI_y \frac{\partial^2 w(x)}{\partial x^2} \right) = 0 \quad (1.43)$$

Si la palanca tiene una sección uniforme[†] el segundo momento de área se puede sacar de la integral y la ecuación de Euler-Bernouilli tendrá la siguiente forma (Ec. 1.44).

$$\rho A \frac{\partial^2 w(t, x)}{\partial t^2} + EI \frac{\partial^4 w(t, x)}{\partial x^4} = 0 \quad (1.44)$$

Resolución de la Ecuación de Euler-Bernouilli

Para resolver esta ecuación se supone que el desplazamiento del resonador, $w(t, x)$, se puede expresar como el producto de una función que depende solo del tiempo y otra que depende solo de la posición (método de separación de variables⁴, Ec. 1.45).

$$w(t, x) = g(t)\psi(x) \quad (1.45)$$

Al despejar la función con variable separadas en la ecuación de Euler-Bernouilli (1.44) se obtiene la siguiente ecuación diferencial (Ec. 1.46).

$$\frac{EI}{\rho A} \cdot \frac{1}{\psi(x)} \cdot \frac{d^4 \psi(x)}{dx^4} = - \frac{1}{g(t)} \cdot \frac{d^2 g(t)}{dt^2} \quad (1.46)$$

La única forma de satisfacer la anterior ecuación diferencial (Ec. 1.46) es que ambos términos sean iguales a un valor constante, ω_n^2 . Por lo tanto, el anterior problema de ecuaciones diferenciales en derivadas parciales se convierte en un problema de dos ecuaciones diferenciales ordinarias: una ecuación diferencial para la parte espacial (Ec. 1.47) y otra para la parte temporal (Ec. 1.48).

$$\frac{d^2 g(t)}{dt^2} + \omega_n^2 g(t) = 0 \quad (1.47)$$

$$\frac{d^4 \psi(x)}{dx^4} - \omega_n^2 \frac{\rho A}{EI} \psi(x) = 0 \quad (1.48)$$

La ecuación temporal (Ec. 1.47) se puede resolver suponiendo que la solución es una función exponencial (Ec. 1.49).

[†] Aunque en los siguientes capítulos se mencionará que en los resonadores fabricados la sección transversal varía a lo largo de su dirección axial, esta variación es lo suficientemente pequeña como para poder despreciarla de cara al cálculo del segundo momento de área.

$$g(t) = e^{i\omega_n t + \varphi} \quad (1.49)$$

Siendo φ un desfase.

En cuanto a la resolución de la ecuación espacial (Ec. 1.48), para mayor simplicidad se introduce la constante $k_n^4 = \omega_n^2(\rho A/EI)$. La ecuación 1.48 también se puede resolver suponiendo que la solución es una función exponencial de argumento complejo. Sin embargo, resulta conveniente expresar esta función como una combinación de funciones trigonométricas e hiperbólicas (Ec. 1.50).

$$\psi(x) = c_1 \cosh(k_n x) + c_2 \cos(k_n x) + c_3 \sinh(k_n x) + c_4 \sen(k_n x) \quad (1.50)$$

Siendo c_1, c_2, c_3, c_4 constantes de integración que se despejarán con las condiciones de contorno del problema.

Nótese que hasta aquí la resolución del problema es igualmente válida para el caso de una barra con un extremo libre y otro fijo (palanca) que para una barra con sus dos extremos fijos (puente). La diferencia entre estos dos casos estará determinada por las condiciones de contorno. En el caso de un resonador tipo puente, se tendrá como condiciones que tanto la función como su derivada primera se anulen en los extremos (Ec. 1.51).

$$\begin{aligned} \psi(0) = \psi(L) = 0 \\ \frac{d\psi(0)}{dx} = \frac{d\psi(L)}{dx} = 0 \end{aligned} \quad (1.51)$$

Al aplicar las condiciones de contorno en la ecuación 1.50 se llega a la ecuación 1.52, que no tiene solución analítica. Al resolver la ecuación 1.52 por métodos numéricos se obtiene que esta admite infinitas soluciones discretas (Ec.1.53)⁵, lo que demuestra la existencia de infinitos modos de vibración.

$$\cosh(k_n L) \cos(k_n L) = 1 \quad (1.52)$$

$$k_n L = \alpha_n = 4.7300, 7.8532, 10.9956, 14.1372 \dots \quad (1.53)$$

Finalmente, se despeja con las soluciones de la ecuación 1.52 en la ecuación 1.50, obteniendo la solución de la forma espacial, a la que, a partir de aquí, nos referiremos como forma del modo ($\psi_n(x)$, Ec. 1.54 y Fig. 1.5.).

$$\psi_n(x) = \cosh\left(\alpha_n \frac{x}{L}\right) - \cos\left(\alpha_n \frac{x}{L}\right) + \frac{\cos(\alpha_n) - \cosh(\alpha_n)}{\sin(\alpha_n) - \sinh(\alpha_n)} \left[\sin\left(\alpha_n \frac{x}{L}\right) - \sinh\left(\alpha_n \frac{x}{L}\right) \right] \quad (1.54)$$

La forma del modo aquí presentada (Ec. 1.54) se ha normalizado para que se cumpla $\int_0^L \psi_n^2(x) dx = 1$.

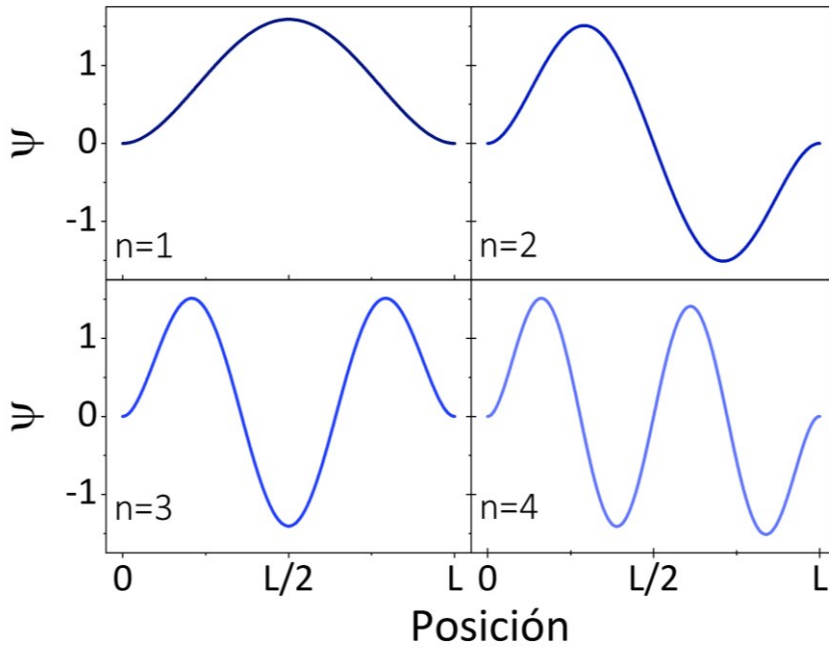


Figura 1.5.: Forma del modo. Forma de los primeros cuatro modos de oscilación para un resonador tipo puente obtenidos mediante la resolución de la Ecuación de Euler-Bernoulli. Estas curvas están normalizadas para que la integral del cuadrado de la forma del modo a lo largo de todo el eje sea igual a la unidad.

Nótese que la aparición de infinitos modos de oscilación no afecta solo a la parte espacial de la función, sino también a la parte temporal (Ec. 1.49), en la que habrá infinitos valores discretos para ω_n y, por tanto, infinitas frecuencias de oscilación (Ec. 1.55).

$$f_n = \frac{\alpha_n^2}{2\pi L^2} \sqrt{\frac{EI}{\rho A}} \quad (1.55)$$

Por último, la solución más general a la ecuación de Euler-Bernoulli (y la que se suele encontrar experimentalmente) será una combinación lineal de todos los modos de oscilación (Ec. 1.56).

$$w(t, x) = \sum_n c_n \psi_n(x) e^{i\omega_n t + \varphi} \quad (1.56)$$

Siendo c_n un valor constante para cada modo que indica la amplitud de cada modo. Esta combinación lineal de los modos de vibración es válida siempre que los distintos modos sean ortogonales (descomposición de Galerkin), lo que se cumplirá para primeros modos de oscilación. Sin embargo, para modos superiores, éstos se acoplarán haciendo que esta expresión no sea válida.

1.4. Modelo del Oscilador Armónico

En el epígrafe anterior se ha mostrado que la oscilación de una barra es una función con variables separadas en la que uno de los términos depende de la posición y el otro del tiempo. A continuación, se va a demostrar que, para un modo de oscilación dado, si se toma un punto cualquiera de la barra su movimiento se puede describir como un oscilador armónico simple. Esta analogía permitirá aplicar varios conceptos originales del oscilador armónico simple a la vibración de palancas y barras.

Caso ideal (Oscilador Armónico Simple)

Para el modelo del oscilador armónico simple, se supone una masa puntual (m) unida a un muelle (sin masa). Esta masa tendrá una posición de equilibrio (que se tomará como el origen de coordenadas) y si se desplaza de esta posición, el muelle ejercerá una fuerza de recuperación sobre la masa, que tenderá a devolverla a su posición de equilibrio (Fig. 1.6.). Esta fuerza tendrá, para desplazamientos pequeños, una dependencia lineal con la posición (Ley de Hooke). El lagrangiano⁶ (\mathcal{L}) de este sistema tendrá la siguiente forma (Ec. 1.57).

$$\mathcal{L} = E_C - V = \frac{1}{2} m \dot{z}^2 - \frac{1}{2} k z^2 \quad (1.57)$$

Siendo, E_C la energía cinética del sistema, V la energía potencial y k la constante de elasticidad del muelle.

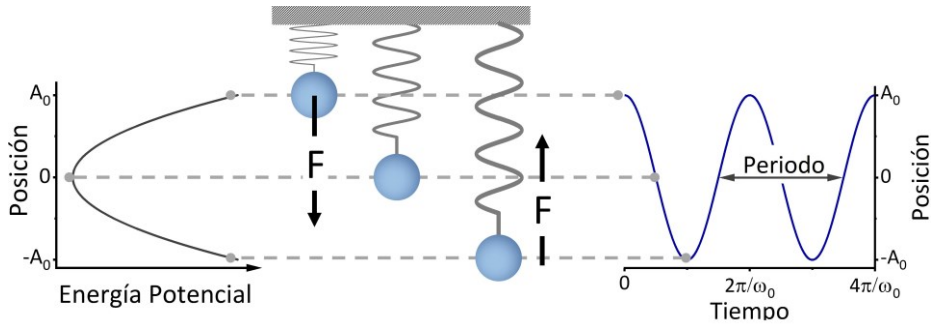


Figura 1.6.: Oscilador armónico simple. Una masa unida a un muelle presenta una posición de equilibrio y si esta abandona esa posición aparecerán fuerzas recuperadoras que tienden a devolver a la partícula a la posición de equilibrio (centro). Estas fuerzas pueden expresarse como un potencial parabólico (izquierda). Si la partícula se perturba, esta oscilará en torno a la posición de equilibrio como consecuencia del balance entre energía potencial y cinética (izquierda).

Aplicando las ecuaciones de Lagrange⁶ a este sistema se obtiene la siguiente ecuación diferencial ordinaria (1.58).

$$\ddot{z} + \frac{k}{m}z = \ddot{z} + \omega_0^2z = 0 \quad (1.58)$$

Esta solución es completamente análoga a la ecuación de la parte temporal en la ecuación de Euler-Bernouilli (Ec. 1.47), por lo que se resuelve de la misma manera y da como resultado una solución en forma de exponencial compleja (Ec. 1.59, Fig. 1.6.).

$$z(t) = A_0 e^{i\omega_0 t + \varphi} \quad (1.59)$$

Siendo A_0 , la amplitud máxima de la oscilación y φ una fase.

Como ya se ha visto, la ecuación diferencial que describe este problema es equivalente a la de la solución temporal en la ecuación de Euler-Bernouilli (Ec. 1.47). Por tanto, en barras y palancas, cada punto se mueve igual que un oscilador armónico simple cuya amplitud máxima de oscilación está dada por la forma del modo.

Oscilador armónico amortiguado forzado

Para conseguir una aproximación más general y realista se puede considerar que sobre el oscilador se ejerce una fuerza externa que varía armónicamente en el tiempo. Además, también se van a considerar pérdidas disipativas a causa de un rozamiento viscoso (véase el epígrafe 1.8. para mayor detalle sobre el rozamiento viscoso). En los experimentos mostrados en esta tesis, el rozamiento viscoso vendrá dado por el movimiento del resonador en el aire mientras que la fuerza de excitación se aplicará mediante un dispositivo

piezoeléctrico acoplado al resonador. Con todo lo anterior, la ecuación diferencial que da el movimiento tendrá la siguiente forma (Ec. 1.60).

$$(m + m_{cf})\ddot{z} + \zeta\dot{z} + kz = F_0 e^{i\Omega t} \quad (1.60)$$

Siendo m_{cf} la masa añadida por la columna de fluido, ζ el coeficiente de rozamiento viscoso, F_0 la amplitud de la fuerza de excitación y Ω la frecuencia angular de la fuerza de excitación.

Para la resolución de esta ecuación diferencial se va a aplicar la transformada Fourier a ambos lados de la ecuación 1.60. Las propiedades de las transformadas de Fouier van a ayudar a simplificar el problema (Ec. 1.61 y 1.62)⁴.

$$-\omega^2(m + m_{cf})\tilde{z} + (i\omega)\zeta\tilde{z} + k\tilde{z} = 2\pi F_0 \delta(\omega - \Omega) \quad (1.61)$$

$$\tilde{z} = \frac{2\pi F_0 \delta(\omega - \Omega)}{-\omega^2(m + m_{cf}) + (i\omega)\zeta + k} \quad (1.62)$$

Conocida la transformada Fourier de la solución (\tilde{z}), la solución del problema se obtendrá aplicando la transformada de Fourier inversa (Ec. 1.63).

$$\begin{aligned} z(t) &= \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{2\pi F_0 \delta(\omega - \Omega)}{-\omega^2(m + m_{cf}) + (i\omega)\zeta + k} e^{i\omega t} d\omega \\ &= \frac{F_0}{\sqrt{(k - \Omega^2[m + m_{cf}])^2 + (\Omega\zeta)^2}} e^{i\left(\Omega t + \arctan\left[\frac{\Omega\zeta}{k - \Omega^2(m + m_{cf})}\right]\right)} \end{aligned} \quad (1.63)$$

Por lo tanto, un oscilador sometido a disipación y a una excitación armónica se moverá también de forma armónica (Ec. 1.63) con una frecuencia igual a la de excitación. En este movimiento, la amplitud (A) y la fase (con respecto a la fuerza de excitación, φ) dependerán del valor de la frecuencia de excitación (Ec. 1.64).

$$z(t) = A(\Omega) e^{i(\Omega t + \varphi(\Omega))} \quad (1.64)$$

Despreciando la masa añadida por la columna de fluido e introduciendo el factor de calidad ($Q_f = m\omega_0/\zeta$), se simplifica de la siguiente forma (Ec. 1.65 y Ec. 1.66).

$$A(\Omega) = \frac{F_0}{m \sqrt{(\omega_0^2 - \Omega^2)^2 + \left(\frac{\omega_0 \Omega}{Q_f}\right)^2}} \quad (1.65)$$

$$\varphi(\Omega) = \arctan\left(\frac{\omega_0 \Omega}{Q_f [\omega_0^2 - \Omega^2]}\right) \quad (1.66)$$

Nótese que la máxima amplitud se da para una frecuencia (frecuencia de resonancia) que no se corresponde con la frecuencia natural de oscilación, aunque tiende a esta cuando el factor de calidad tiende a infinito (Fig. 1.7.). Además, la fase en función de la frecuencia se puede simplificar suponiendo que para frecuencias mayores que la de resonancia, el resonador se encuentra en fase respecto a la fuerza de excitación ($\varphi = 0$) mientras que para valores de la frecuencia menores al de resonancia se encuentra en contrafase ($\varphi = \pi$). Asimismo, cerca de la frecuencia de resonancia, la fase varía linealmente con la frecuencia tomando el valor $\frac{\pi}{2}$ cuando la frecuencia es igual a la de resonancia (Fig. 1.7.).

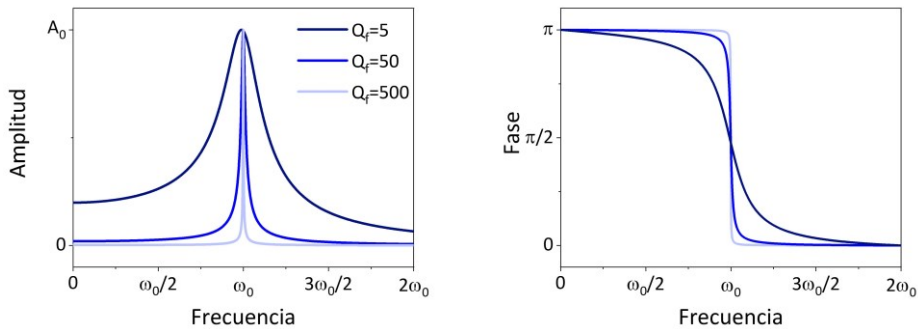


Figura 1.7.: Oscilador Armónico Amortiguado Forzado. La amplitud (izquierda) y la fase (derecha) del oscilador dependen de la frecuencia con la que es excitado. El factor de calidad del resonador es inversamente proporcional a la magnitud de las fuerzas disipativas a las que está expuesto, por lo tanto, cuanto mayor sea el factor de calidad, menor será la anchura de la resonancia.

1.5. Modelo de Euler-Bernoulli con una fuerza de excitación

En un caso más general se puede añadir, igual que en el caso del oscilador armónico (Ec. 1.60), un término disipativo a la ecuación de Euler-Bernoulli y una fuerza de excitación armónica (Ec. 1.67).

$$EI \frac{\partial^4 w(x, t)}{\partial x^4} + \rho A \frac{\partial^2 w(x, t)}{\partial t^2} - \zeta \frac{\partial w(x, t)}{\partial t} = F_0 e^{i\Omega t} \quad (1.67)$$

Al igual que en el caso de la resolución de la Ecuación de Euler-Bernouilli (Ec. 1.44), esta ecuación diferencial (Ec. 1.67) se puede resolver de igual manera; asumiendo que la solución es el producto de una función que depende del tiempo y otra que depende solo de la variable espacial. En el caso de la parte espacial de la función se obtiene el mismo resultado que en el caso sin disipación (Ec. 1.54), mientras que la parte temporal será distinta (Ec. 1.68).

$$\rho A \frac{d^2 g(t)}{dt^2} - \zeta \frac{dg(t)}{dt} + \rho A \omega_n^2 g(t) = F_0 e^{i\Omega t} \quad (1.68)$$

Dada la analogía con el oscilador armónico se pueden definir una masa (m'_n , Ec. 1.69), un coeficiente de rozamiento (ζ'_n , Ec. 1.70) y una constante de elasticidad (k'_n , Ec. 1.71), una frecuencia (ω'_n , Ec. 1.72) y un factor de calidad ($Q'_f n$, Ec. 1.73) efectivos⁷ de tal forma que no tengamos que resolver la ecuación de Euler y podamos simplemente resolver la ecuación del oscilador armónico.

$$m'_n = \rho A \int_0^L \frac{\psi_n^2(x)}{\psi_n^2(x_{max})} dx \quad (1.69)$$

$$\zeta'_n = \zeta \int_0^L \frac{\psi_n^2(x)}{\psi_n^2(x_{max})} dx \quad (1.70)$$

$$k'_n = EI \int_0^L \frac{1}{\psi_n^2(x_{max})} \frac{d^2(\psi_n^2(x))}{dx^2} dx \quad (1.71)$$

$$\omega'_n = \sqrt{\frac{k_n}{m_n}} \quad (1.72)$$

$$Q'_f n = \frac{m_n \omega_n}{\zeta_n} \quad (1.73)$$

Estos valores efectivos permiten utilizar la solución del oscilador armónico (Ec. 1.63) para cada modo de oscilación de una palanca o puente. Por tanto, la solución más general para la ecuación de Euler-Bernouilli con disipación y una excitación externa tendrá la siguiente forma (Ec. 1.74). Nótese que estos valores efectivos cambian para los distintos modos de un mismo resonador.

$$w(t, x) = \sum_{n=1}^{\infty} A_n(\Omega) \psi_n(x) e^{i\Omega t + \varphi_n(\Omega)} \quad (1.74)$$

Siendo $A_n(\Omega)$ la amplitud y $\varphi_n(\Omega)$ la fase de cada modo calculadas según las ecuaciones 1.65 y 1.66 con los valores de masa, frecuencia y factor de calidad efectivos.

1.6. Descripción de un fluido

Al contrario que en el sólido elástico, en los fluidos las fuerzas de cohesión interatómicas son, por lo general, despreciables[‡], lo que causará que al ejercer una fuerza sobre un fluido este no tienda a volver a suposición inicial. Dada esta particularidad de los fluidos, la descripción de su movimiento será distinta a la descrita anteriormente para el sólido elástico, aunque ambos guardan algunos paralelismos. El movimiento de un fluido se caracteriza mediante su campo de velocidades (el vector velocidad del fluido en cada punto) y su campo de presiones. A continuación, se va a estudiar la relación entre el campo de presión y de velocidades. Estos resultados se van a aplicar posteriormente a casos concretos de fenómenos que se producirán en los resonadores empleados en esta tesis.

Ecuación de continuidad

Supongamos un cierto volumen (V) dentro de un fluido en movimiento. El flujo que atraviesa la superficie que delimita este volumen (S) estará determinado por la integral de superficie del campo de velocidades. Este flujo también se puede expresar como la variación de la masa en el tiempo dentro de este volumen, por lo que se puede llegar a la siguiente igualdad (Ec. 1.75).

$$\int_S \rho U_i dS_i = - \frac{d}{dt} \left(\int_V \rho dV \right) \quad (1.75)$$

Siendo ρ la densidad del fluido y U el campo de velocidades del fluido.

[‡] Estas fuerzas de cohesión se hacen notables cuando el fluido es finito (p. ej. en una gota), dando lugar a fenómenos como la tensión superficial. Debido a que en la presente tesis se estudia en todo momento el movimiento de un fluido dentro de una tubería y muy alejado de los extremos de la misma la aproximación de fluido infinito es válida, pudiéndose despreciar estas fuerzas.

La anterior integral de superficie (Ec. 1.75) se puede convertir en integral de volumen aplicando el teorema de Green², lo que permite unir los dos términos dentro de la misma integral (Ec. 1.76).

$$\int_V \left(\frac{d\rho}{dt} + \frac{d(\rho U_i)}{dx_i} \right) dV = 0 \quad (1.76)$$

Esta igualdad (Ec. 1.76) tiene que cumplirse para cualquier volumen, por lo que el integrando tiene que ser siempre nulo, lo que permite llegar a la ecuación de continuidad (Ec. 1.77).

$$\frac{d\rho}{dt} + \frac{d(\rho U_i)}{dx_i} = 0 \quad (1.77)$$

En el caso de un fluido incompresible (aquel en el que puede considerarse que su densidad se mantiene constante en todo punto del fluido y en todo momento), la ecuación de continuidad se simplifica aún más (Ec. 1.78).

$$\frac{dU_i}{dx_i} = 0 \quad (1.78)$$

Ecuación de Euler (fluido ideal)

La ecuación de continuidad introduce una condición importante para el movimiento de un fluido pero no permite la descripción total de este, por lo que es necesario obtener una expresión que relacione presión y campo de velocidades. Para obtener una expresión de este tipo se analizan las fuerzas resultantes sobre un diferencial de volumen en el fluido. Por su parte, la magnitud ρU representa el momento lineal del fluido en un diferencial de volumen. La derivada temporal de esta magnitud será, por tanto, igual a la suma de las fuerzas que actúan sobre el diferencial de volumen (segunda ley de Newton³). Entonces, el movimiento de un fluido se podrá describir de la siguiente forma (Ec. 1.79).

$$\frac{d}{dt} \left(\int (\rho U_i) dV \right) = \int \left(\rho \frac{\partial U_i}{\partial t} + \frac{\partial \rho}{\partial t} U_i \right) dV = - \int F_i dV \quad (1.79)$$

Por la ecuación de continuidad (Ec. 1.77) se conoce que $\partial \rho / \partial t = -\nabla(\rho U)$. También, debe tenerse en cuenta que $\partial U_i / \partial t$ se refiere a la variación de la velocidad en función del tiempo de una partícula fluida (es decir, que su posición cambia con el tiempo). Para poder desarrollar esta ecuación resulta más sencillo referir estas ecuaciones a puntos fijos del espacio en lugar de a

partículas fluidas, por lo que será necesario descomponer dU_i de la siguiente manera (Ec. 1.80).

$$dU_i = \left(dx_i \frac{\partial}{\partial x_i} \right) U_j \quad (1.80)$$

Al dividir la ecuación 1.80 entre dt se obtiene la derivada temporal del campo de velocidades (Ec. 1.81).

$$\frac{dU_i}{dt} = \frac{\partial U_i}{\partial t} + \left(U_i \frac{\partial}{\partial x_i} \right) U_j \quad (1.81)$$

De esta manera, sustituyendo este resultado (Ec. 1.81) en la ecuación 1.79 se obtiene lo siguiente (Ec. 1.82).

$$\int \left(\rho \left(\frac{\partial U_i}{\partial t} + \left(U_i \frac{\partial}{\partial x_i} \right) U_j \right) + \frac{\partial(\rho U_i)}{\partial x_i} U_j \right) dV = - \int F_i dV \quad (1.82)$$

Reordenando, se puede ver que los dos últimos sumandos en la primera integral (Ec. 1.82) se corresponden a la derivada del producto $\rho U_i U_j$, quedando la siguiente ecuación (Ec. 1.83).

$$\int \left(\rho \frac{\partial U_i}{\partial t} + \frac{\partial(\rho U_i U_j)}{\partial x_i} \right) dV = - \int F_i dV \quad (1.83)$$

Por otra parte, aplicando el teorema de Gauss² podemos expresar las fuerzas que actúan sobre el fluido como la integral del gradiente de un parámetro escalar (Ec. 1.84). A este parámetro escalar lo llamaremos, tensor de densidad de flujos de impulso (Π_{ij}).

$$\int \rho \frac{\partial U_i}{\partial t} dV = - \int \left(\frac{\partial \Pi_{ij}}{\partial x_i} + \frac{\partial(\rho U_i U_j)}{\partial x_i} \right) dV \quad (1.84)$$

Como esta igualdad se tiene que satisfacer en todo el fluido, se puede simplificar igualando ambos integrandos (Ec. 1.85).

$$\rho \frac{\partial U_i}{\partial t} = - \frac{\partial \Pi_{ij}}{\partial x_i} \quad (1.85)$$

Donde se ha incluido el término $\rho U_i U_j$ dentro del tensor densidad de flujos de impulso.

Para conocer las componentes del tensor densidad de flujos de impulso vamos a considerar las fuerzas que actúan sobre un volumen infinitesimal dentro del fluido. Para fluidos ideales, el resto del fluido ejercerá sobre este volumen una fuerza que será igual a la integral de la presión en la superficie que delimita este volumen (Ec. 1.86). Se transforma en integral de volumen siguiendo el teorema de Green² para convertirlo en integral de volumen (Ec. 1.86).

$$-\int_S p dS = -\int_V \frac{\partial p}{\partial x_i} dV \quad (1.86)$$

Por tanto, el tensor densidad de flujos de impulso tendrá la siguiente expresión para fluidos ideales (Ec. 1.87).

$$\Pi_{ij} = p\delta_{ij} + \rho U_i U_j \quad (1.87)$$

Sustituyendo este tensor de densidad de flujos de impulso (Ec. 1.87) se obtiene la ecuación de Euler para fluidos ideales (Ec. 1.88).

$$\rho \frac{\partial U_i}{\partial t} = \frac{\partial (p\delta_{ij})}{\partial x_j} + \frac{\partial (\rho U_i U_j)}{\partial x_j} \quad (1.88)$$

Ecuación de Navier-Stokes (fluidos viscosos)

La ecuación de Euler (Ec. 1.88) permite describir el movimiento de fluidos en condiciones ideales, sin embargo, en fluidos reales se produce una transferencia de flujo del impulso irreversible, por lo que debe añadirse un término más en el tensor densidad de flujos de impulso (Ec. 1.89).

$$\Pi_{ij} = \rho U_i U_j + (p\delta_{ij} - \sigma'_{ij}) = \rho U_i U_j + \sigma_{ij} \quad (1.89)$$

Siendo, σ_{ij} el tensor de tensiones del fluido y σ'_{ij} el tensor de tensiones de la viscosidad.

La disipación por viscosidad solo se producirá cuando haya una diferencia de velocidad entre distintas partes del fluido⁸, por ello, el tensor de tensiones dependerá de las derivadas espaciales de la velocidad. Suponiendo que dentro del fluido el gradiente de la velocidad toma valores pequeños se podrá asumir que el tensor de tensiones de la viscosidad dependerá solo de la derivada primera de la velocidad. Por otra parte, en un fluido tampoco se producirá disipación viscosa si se encuentra en una rotación uniforme. Para satisfacer ambas condiciones en tensor de tensiones de la viscosidad tendrá la siguiente forma (Ec. 1.90).

$$\sigma'_{ij} = a \left(\frac{\partial U_i}{\partial x_j} + \frac{\partial U_j}{\partial x_i} \right) + b \frac{\partial U_k}{\partial x_k} \delta_{ij} \quad (1.90)$$

Siendo a y b unos coeficientes que dependerán de las propiedades del fluido.

No obstante, resulta conveniente reordenar esta expresión (Ec. 1.89) de tal manera que sea la suma de un término que dé los elementos de la diagonal y otro término que se anule para los casos en los que $i = j$ (Ec. 1.91). Este desarrollo es análogo al que se hizo para el tensor deformación en el caso del sólido elástico (Ec. 1.8).

$$\sigma'_{ij} = \mu \left(\frac{\partial U_i}{\partial x_j} + \frac{\partial U_j}{\partial x_i} - \frac{2}{3} \frac{\partial U_k}{\partial x_k} \delta_{ij} \right) + \xi \frac{\partial U_k}{\partial x_k} \delta_{ij} \quad (1.91)$$

Siendo μ y ξ los coeficientes de viscosidad.

Ahora se puede añadir este término (Ec. 1.92) al tensor densidad de flujos de impulso (Ec. 1.89) para obtener la ecuación del movimiento del fluido. Suponiendo que los coeficientes de viscosidad no varían en el fluido la ecuación toma la siguiente forma (Ec. 1.92).

$$\rho \left(\frac{\partial U_i}{\partial t} + U_j \frac{\partial U_i}{\partial x_j} \right) = - \frac{\partial p}{\partial x_i} + \mu \frac{\partial^2 U_i}{\partial x_j \partial x_j} + \left(\xi + \frac{1}{3} \right) \frac{\partial}{\partial x_i} \frac{\partial U_k}{\partial x_k} \quad (1.92)$$

Para el caso de un fluido incompresible se cumple que $\partial U_k / \partial x_k = 0$, lo que permite simplificar la ecuación anterior (Ec. 1.92) llegando a la Ecuación de Navier-Stokes (1.93).

$$\rho \left(\frac{\partial U_i}{\partial t} + U_j \frac{\partial U_i}{\partial x_j} \right) = - \frac{\partial p}{\partial x_i} + \mu \frac{\partial^2 U_i}{\partial x_j \partial x_j} \quad (1.93)$$

También es habitual la forma vectorial de la ecuación de Navier-Stokes (Ec. 1.94). Esta forma de la ecuación de Navier-Stokes se utilizará en los siguientes epígrafes porque resultará más útil.

$$\rho \left(\frac{\partial \vec{U}}{\partial t} + (\vec{U} \nabla) \vec{U} \right) = - \vec{\nabla} p + \mu \nabla^2 \vec{U} \quad (1.94)$$

La ecuación de Navier-Stokes (Ec. 1.93) junto con la ecuación de continuidad (1.78) permiten describir el movimiento de cualquier fluido viscoso e incompresible.

1.7. Flujo laminar

La ecuación de Navier-Stokes suele ser difícil de resolver: en la mayoría de los casos no tiene una solución analítica y, en muchos casos, su resolución mediante métodos numéricos tiene grandes problemas de convergencia. No obstante, si el flujo es estacionario ($\partial \vec{U} / \partial t = 0$) y el fluido no se mueve a velocidades muy altas, se pueden despreciar el término $(\vec{U} \nabla) \vec{U}$, lo que permite la obtención de soluciones analíticas en algunos problemas (flujo laminar). Para los casos de flujo laminar estacionario, la ecuación de Navier-Stokes queda reducida a la siguiente forma (Ec. 1.95).

$$\vec{\nabla} p = \mu \nabla^2 \vec{U} \tag{1.95}$$

Número de Reynolds

Para determinar cuándo la velocidad del fluido es lo suficientemente pequeña como para poder hacer la aproximación del flujo laminar se utiliza el número de Reynolds (Re). Para obtener el número de Reynolds se combinan las magnitudes que caracterizarán el movimiento de un fluido (velocidad del flujo principal, U_0 , longitud característica, l , densidad, ρ , y viscosidad, μ) de tal forma que se obtenga una magnitud adimensional (Ec. 1.96).

$$Re = \frac{\rho l U_0}{\mu} \tag{1.96}$$

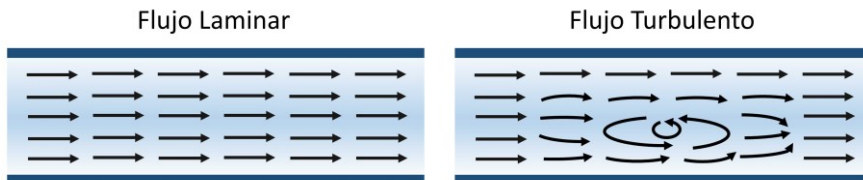


Figura 1.8.: Líneas de flujo para flujo laminar y flujo turbulento. En el flujo laminar (izquierda) las líneas de flujo permanecen paralelas entre sí mientras que en el flujo turbulento (derecha) no, lo que puede dar lugar a la aparición de vórtices e inestabilidades.

El número de Reynolds permite comparar flujos en distintos casos, por lo que, a igual número de Reynolds se puede decir que dos flujos son semejantes. Además, el número de Reynolds permite establecer el límite entre un flujo laminar (aquel que se mantiene estable frente a pequeñas perturbaciones en su flujo, número de Reynolds bajo⁸, Fig. 1.8) y un flujo turbulento (aquel en el que pequeñas perturbaciones pueden causar inestabilidades en el flujo⁸, Fig. 1.8). El límite entre el flujo laminar y turbulento se suele establecerse para un número de Reynolds entre 2000 y 3000 en el caso de una tubería⁹. Dadas las

dimensiones y velocidades empleadas en los resonadores, en esta tesis siempre se van a tener unas condiciones tales que siempre se mantienen en el régimen de flujo laminar.

Flujo laminar entre dos planos paralelos

La versión de la ecuación de Navier-Stokes para el flujo laminar (Ec. 1.95) permite resolver analíticamente el movimiento de un fluido dentro de un tubo de paredes rectas. Para ello se supone que el fluido está contenido entre dos planos paralelos e infinitos separados una distancia h en la dirección z (Fig. 1.9a). Los planos se mantendrán en reposo mientras que el fluido tendrá una velocidad determinada u_0 en el punto medio entre ambos planos. Como se trata de un fluido viscoso, se aplica la condición de no-deslizamiento: en la frontera entre el fluido y un sólido (u otro fluido inmisible), la velocidad debe ser igual para el fluido y el sólido. Por todo lo anterior, las condiciones de contorno serán las siguientes (Ec. 1.97).

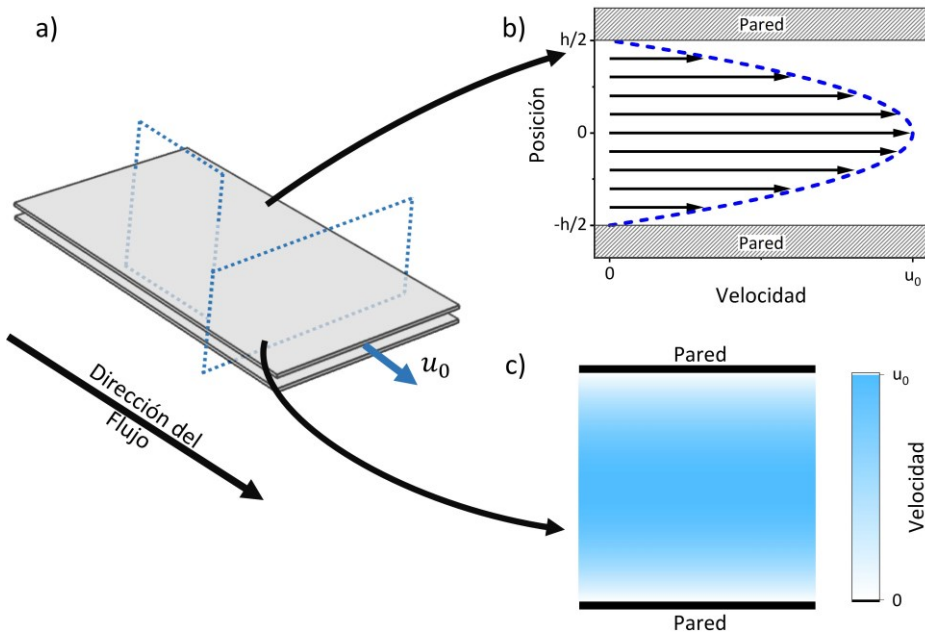


Figura 1.9.: Flujo entre planos paralelos. a) Geometría del problema del flujo entre planos paralelos. b) Perfil de velocidades en la sección longitudinal de los planos. c) Campo de velocidades en la sección transversal de los planos paralelos.

$$\begin{aligned} U_x(y = h/2) = 0 & \quad U_x(y = 0) = u_0 & \quad U_z = 0 \\ U_x(y = -h/2) = 0 & \quad U_y = 0 \end{aligned} \quad (1.97)$$

Dada la geometría del problema se deduce que el fluido se moverá solo en la dirección x mientras que la magnitud de esta velocidad variará a lo largo del eje z , permitiendo conseguir las siguientes condiciones para el problema (Ec. 1.98).

$$\frac{dp}{dy} = \frac{dp}{dz} = 0 \quad (1.98)$$

Finalmente, la ecuación de Navier-Stokes para este problema queda de la siguiente forma (Ec. 1.99).

$$\frac{\partial p}{\partial x} = \mu \frac{\partial^2 U_x(y)}{\partial z^2} \quad (1.99)$$

Por las condiciones del problema se conoce que la presión solo varía en la dirección x , por lo que se puede sacar la derivada de la presión de la integral (Ec. 1.100) obteniendo como resultado una función cuadrática para el perfil de velocidades resolviendo la integral (Ec. 1.101).

$$U_x(z) = \iint \frac{1}{\mu} \frac{\partial p}{\partial x} dz^2 = \frac{1}{\mu} \frac{\partial p}{\partial x} \iint dz^2 \quad (1.100)$$

$$U_x(z) = \frac{1}{\mu} \frac{\partial p}{\partial x} (az^2 + bz + c) \quad (1.101)$$

Siendo a , b , y c constantes de integración.

Por otra parte, la presión se calcula despejando el perfil de velocidades obtenido (Ec. 101) en la ecuación de continuidad (Ec. 1.78), de donde se obtiene que la derivada de la presión en la dirección x debe ser una constante y, por tanto, la presión es una función lineal (Ec. 1.102).

$$p = fx + g \quad (1.102)$$

Siendo f y g constantes de integración. Las constantes de integración se despejan aplicando las condiciones de contorno del problema (Ec. 1.97), llegando finalmente a la solución del flujo laminar entre dos planos paralelos (Ec. 1.103, Ec. 1.104 y Fig.1.9bc).

$$U_x(y) = u_0 \left(1 - \frac{4}{h^2} y^2 \right) \quad (1.103)$$

$$p = -\frac{8\mu u_0}{h^2} x \quad (1.104)$$

Flujo laminar en una tubería cilíndrica

Si en lugar de entre dos planos paralelos infinitos, el fluido se encuentra confinado en un cilindro de longitud infinita y radio R_{in} (Fig. 1.10a), también presentará un perfil de velocidades parabólico. Para demostrarlo, se utiliza la ecuación de Navier-Stokes para el flujo estacionario y laminar (Ec. 1.95) en coordenadas cilíndricas. En coordenadas cilíndricas el laplaciano y el gradiente tendrán la siguiente forma (Ec. 1.105 y 1.106)².

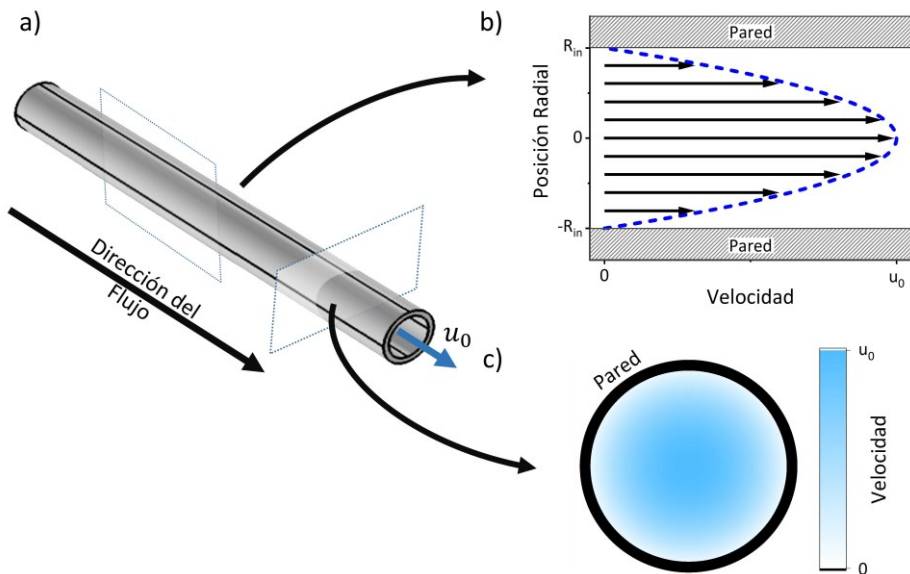


Figura 1.10.: Flujo en una tubería cilíndrica. a) Geometría del problema del flujo en la tubería cilíndrica. b) Perfil de velocidades en la sección longitudinal de la tubería. c) Campo de velocidades en la sección transversal de la tubería.

$$\vec{\nabla} p = \frac{\partial p}{\partial r} \vec{u}_r + \frac{1}{r} \frac{\partial p}{\partial \theta} \vec{u}_\theta + \frac{\partial p}{\partial x} \vec{u}_z \quad (1.105)$$

$$\nabla^2 \vec{U} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial \vec{U}}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 \vec{U}}{\partial \theta^2} + \frac{\partial^2 \vec{U}}{\partial x^2} \quad (1.106)$$

En este caso, el fluido solo se moverá en la dirección axial (x) y su magnitud variará en la dirección radial (r). En el eje del cilindro la velocidad del fluido será una determinada, u_0 . Aplicando lo anterior y la condición de no-deslizamiento las condiciones de contorno serán las siguientes (Ec. 107).

$$\begin{aligned} U_x(r = R_{in}) &= 0 & U_r &= 0 \\ U_x(r = 0) &= u_0 & U_\theta &= 0 \end{aligned} \quad (1.107)$$

De forma análoga al caso del prisma, el fluido solo se moverá en la dirección axial, por lo que la presión no variará en las otras direcciones (Ec. 1.108).

$$\frac{dp}{dr} = \frac{dp}{d\theta} = 0 \quad (1.108)$$

Finalmente, para este problema se obtiene la siguiente ecuación de movimiento.

$$\frac{\partial p}{\partial x} = \mu \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial U_z(r)}{\partial r} \right) \quad (1.109)$$

Al igual que en el caso anterior se conoce que $\partial p / \partial x$ debe ser constante, por lo que se puede sacar de la integral (Ec. 1.110).

$$U_x(r) = \int \frac{1}{r} \left(\int r \frac{1}{\mu} \frac{\partial p}{\partial x} dr \right) dr = \frac{1}{\mu} \frac{\partial p}{\partial x} \int \frac{1}{r} \left(\int r dr \right) dr \quad (1.110)$$

Tras resolver la integral y aplicar las condiciones de contorno (Ec. 1.107) se llega a que, igual que en el caso de los planos paralelos, el fluido sigue un perfil de velocidades parabólico (Ec. 111 y Fig. 1.10bc) y la presión tiene una dependencia lineal (Ec. 1.112).

$$U_x(r) = u_0 \left(1 - \frac{r^2}{R_{in}^2} \right) \quad (1.111)$$

$$p = -\frac{4\mu u_0}{R_{in}^2} x \quad (1.112)$$

Ley de Poiseuille

Una vez conocido el perfil de velocidades dentro de una tubería se puede calcular el caudal (Q) dentro de esta como la integral del campo de velocidades en la sección transversal de la tubería (Ec. 1.113).

$$Q = \int \vec{U} d\vec{S} \quad (1.113)$$

En el caso de la tubería cilíndrica, el caudal tendrá la siguiente forma (Ec. 1.114).

$$Q_{cilindro} = \int_0^{2\pi} \int_0^R r u_0 \left(1 - \frac{1}{R^2} r^2\right) dr d\theta = \frac{1}{2} \pi u_0 R_{in}^2 \quad (1.114)$$

También se puede calcular el caudal para una tubería prismática de sección rectangular (de altura h y anchura a) tomando una sección finita dentro del perfil de velocidades obtenido al resolver el movimiento de un fluido entre dos planos infinitos (Ec. 1.103). Esta aproximación será válida en los casos $w \gg h$ (Ec. 1.115).

$$Q_{prisma} = \int_{-a/2}^{a/2} \int_{-h/2}^{h/2} u_0 \left(1 - \frac{4}{h^2} y^2\right) dy dz = \frac{2}{3} u_0 ah \quad (1.115)$$

No obstante, experimentalmente es difícil de determinar la velocidad en el eje de la tubería (u_0), por lo que resulta conveniente expresar el caudal en función de la diferencia de presión. Tomando una longitud, L , finita dentro del cilindro o prisma, se puede definir una diferencia de presión (Δp) para expresar el caudal en función de esta diferencia de presión obteniendo la ley de Poiseuille (Ec. 1.116 y 1.117).

$$Q_{cilindro} = \left(\frac{\pi R_{in}^4}{8\mu L}\right) \Delta p \quad (1.116)$$

$$Q_{prisma} = \left(\frac{ah^3}{12\mu}\right) \Delta p \quad (1.117)$$

La Ley de Poiseuille predice que en una tubería caudal y diferencia de presión dependen linealmente. El inverso de los términos entre paréntesis en las anteriores ecuaciones (Ec. 1.116 y 1.117) son lo que se conoce como resistencia microfluídica (\mathbb{R} , Ec. 1.118 y Ec. 1.119), esta dependerá exclusivamente de la geometría de la tubería y de la viscosidad del fluido.

$$\mathbb{R}_{cilindro} = \frac{8\mu L}{\pi R_{in}^4} \quad (1.118)$$

$$\mathbb{R}_{prisma} = \frac{12\mu L}{wh^3} \quad (1.119)$$

1.8. Interacción fluido-sólido

En este apartado se va a estudiar cómo interactúa un fluido en movimiento con un cuerpo sólido (los razonamientos mostrados a continuación son igualmente válidos si en lugar de un sólido se trata de otro fluido inmiscible). Cabe destacar que los resultados que se obtendrán son igualmente válidos tanto si se considera que el sólido está en reposo dentro de un fluido en movimiento, como si se considera el sólido moviéndose dentro de un fluido inicialmente en reposo. La fuerza que ejerce un fluido sobre una determinada superficie (\mathbf{F}) se puede calcular como la integral de superficie del tensor densidad de flujos de impulso (Ec. 1.89) en dicha superficie (Ec. 1.120).

$$F_i = \int \Pi_{ij} dS_j \quad (1.120)$$

Si se quiere obtener la fuerza que ejerce el fluido sobre un sólido, en esta integral la superficie de integración será la frontera entre el sólido y el fluido. Además, dada la condición de no deslizamiento, el término $\rho U_i U_j$ se anula, por lo que el cálculo de la fuerza hidrodinámica se reduce a integrar el tensor de tensiones del fluido en la superficie del sólido (Ec. 1.121).

$$F_i = \int - \left(p \delta_{ij} + \mu \left[\frac{\partial U_i}{\partial x_j} + \frac{\partial U_j}{\partial x_i} \right] \right) dS_j \quad (1.121)$$

Ley de Stokes

Para obtener la relación entre fuerza hidrodinámica y velocidad se va a estudiar el caso de una esfera (en reposo) dentro de un fluido en movimiento. En el infinito, el fluido tiene una velocidad constante (\mathbf{u}_0) y es perturbado localmente cerca de la esfera, que se encuentra en el origen de coordenadas.

Resolver este problema aplicando la ecuación de Navier-Stokes resulta muy complicado en cualquiera de las versiones que se han visto (Ec. 1.94 y 1.95). Para resolver con mayor facilidad este problema se utilizará otra versión de la ecuación de Navier-Stokes⁸. Para ello, en primer lugar se aplica el operador

rotacional a la ecuación de Navier-Stokes para un flujo laminar estacionario (Ec. 1.95).

$$\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} p) = \vec{\nabla} \times (\mu \nabla^2 \vec{U}) \quad (1.122)$$

El rotacional de un gradiente es cero, por tanto, la ecuación de Navier-Stokes tendrá la siguiente forma (Ec. 1.123).

$$\nabla^2 (\vec{\nabla} \times \vec{U}) = 0 \quad (1.123)$$

Antes de resolver el problema de la esfera en un fluido se debe tener en cuenta algunas propiedades vectoriales que ayudarán a resolver el problema. En este caso, el campo de velocidades se podrá expresar como, $\vec{U} = \vec{\nabla} \times \vec{A} + \vec{u}_0$. El vector velocidad no será nulo en las direcciones radial y polar, por lo que A , tendrá que ser un vector axial. Además, en el plano de una esfera, la única manera de construir un vector axial es mediante un producto vectorial del tipo $\vec{r} \times \vec{u}_0$, por esta razón, el vector A tendrá la forma $f'(r)\hat{n} \times \vec{u}_0$, donde f' es una función escalar que depende de r y \hat{n} es el vector director de la velocidad. Finalmente, $f'(r)\hat{n}$ se puede expresar como el gradiente de otra función escalar que depende de r : $\vec{\nabla} f$. Por lo tanto, podemos escribir la velocidad de la siguiente forma (Ec. 1.124).

$$\vec{U} = \vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} f \times \vec{u}_0) + \vec{u}_0 = \vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times [f\vec{u}_0]) + \vec{u}_0 \quad (1.124)$$

Como \vec{u}_0 es constante, se ha podido sustituir $\vec{\nabla} f \times \vec{u}_0$ como $\vec{\nabla} \times (f\vec{u}_0)$. Con la velocidad expresada de esta forma (Ec. 1.124) se puede aplicar la siguiente igualdad al rotacional de la velocidad (Ec. 1.125).

$$\vec{\nabla} \times \vec{U} = \vec{\nabla} \times [\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times [f\vec{u}_0]) + \vec{u}_0] = -\nabla^2 (\vec{\nabla} \times [f\vec{u}_0]) \quad (1.125)$$

Finalmente, despejando el rotacional de la velocidad (Ec. 1.125) en la ecuación de Navier-Stokes (Ec. 1.123) y teniendo en cuenta que \vec{u}_0 es constante se llega a la ecuación 1.126.

$$\nabla^2 \left(-\nabla^2 (\vec{\nabla} \times [f\vec{u}_0]) \right) = \nabla^4 (\vec{\nabla} f \times \vec{u}_0) = \nabla^4 (\vec{\nabla} f) \times \vec{u}_0 = 0 \quad (1.126)$$

De la anterior ecuación se deduce que el operador ∇^4 aplicado a f debe ser constante (Ec. 1.127).

$$\nabla^4 f = cte \quad (1.127)$$

Como la derivada de velocidad debe ser nula en el infinito puede demostrarse que esta constante debe ser cero⁸. Expresando el operador laplaciano en coordenadas esféricas² se llega a la siguiente ecuación diferencial (Ec. 1.128).

$$\frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left(r^2 \frac{d}{dr} [\nabla^2 f] \right) = \frac{d^2(\nabla^2 f)}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{d(\nabla^2 f)}{dr} = 0 \quad (1.128)$$

Para facilitar la resolución del problema se resuelve la ecuación 1.128 despejando la función $\nabla^2 f$ (Ec. 1.129), para despejar posteriormente f .

$$\nabla^2 f = \frac{2c_1}{r} + c_2 \quad (1.129)$$

La constante de integración c_2 (Ec. 1.129) debe ser nula para satisfacer que la derivada de la velocidad sea nula en el infinito. Aplicando el operador laplaciano sobre f , lo que lleva a la siguiente ecuación diferencial (Ec. 1.130), que tiene como solución la combinación lineal de una recta y una hipérbola (Ec. 1.131).

$$\frac{d^2 f}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{df}{dr} = 2c_1 r \quad (1.130)$$

$$f = c_1 r + \frac{c_3}{r} \quad (1.131)$$

Conocida la función f se puede obtener el campo de velocidades del fluido (Ec. 1.132) aplicando la relación entre campo de velocidades y la función f (Ec. 1.124).

$$\vec{U} = \vec{u}_0 + c_1 \frac{\vec{u}_0 + \hat{n}(\vec{u}_0 \cdot \hat{n})}{r} + c_3 \frac{3\hat{n}(\vec{u}_0 \cdot \hat{n}) - \vec{u}_0}{r^3} \quad (1.132)$$

Las constantes de integración c_1 y c_3 se despejan aplicando la condición de no deslizamiento en la superficie de la esfera, obteniendo $c_1 = 3R_{part}/4$ y $c_3 = R_{part}^3/3$, siendo R_{part} el radio de la partícula. Por lo tanto, el campo de velocidades es el siguiente (Ec. 1.133 y Fig. 1.11a).

$$\begin{aligned} U_r &= u_0 \cos \theta \left(1 - \frac{3R_{part}}{2r} + \frac{R_{part}^3}{2r^3} \right) \\ U_\theta &= -u_0 \sin \theta \left(1 - \frac{3R_{part}}{4r} - \frac{R_{part}^3}{4r^3} \right) \end{aligned} \quad (1.133)$$

Conocido el campo de velocidades se puede calcular la presión despejando en la ecuación de Navier-Stokes, llegando al siguiente resultado (Ec. 1.134 y Fig. 1.11b).

$$p = p_0 - \frac{3\mu R_{part}}{2r^2} \cos \theta \quad (1.134)$$

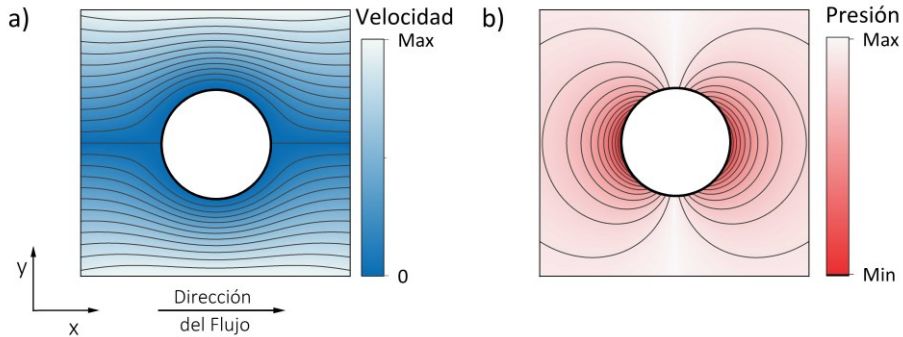


Figura 1.11.: Flujo alrededor de una esfera. Líneas de flujo (a) y campo de presiones (b) cerca de una esfera obtenidos al resolver la ecuación de Navier-Stokes.

Una vez conocidos los campos de velocidades y presión se puede obtener la fuerza que ejerce el fluido sobre la esfera integrando el tensor de tensiones del fluido en la superficie de esta (Ley de Stokes, Ec. 1.135).

$$\vec{F} = 6\pi\mu R_{part} \vec{u}_0 \quad (1.135)$$

La Ley de Stokes predice una dependencia de la fuerza con la velocidad inicial del fluido y la dimensión de la esfera. Dada la simetría del problema, la fuerza resultante sobre la partícula sólida tiene la misma dirección que el flujo, sin embargo, en los casos en los que la partícula tiene una forma arbitraria^{10,11} o el movimiento del fluido presente alguna constricción¹⁰⁻¹², esta fuerza puede presentar componentes no nulas en las direcciones ortogonales al flujo. No obstante, seguirá habiendo una dependencia lineal con la velocidad (Ec. 136)⁸ llegando a la forma matricial de la Ley de Stokes.

$$F_i = b_{ij} U_j \quad (1.136)$$

Siendo b_{ij} un tensor que depende de la geometría del problema.

1.9. Conclusiones

En este capítulo se han mostrado la descripción de un sólido elástico y un fluido. En el caso del sólido elástico, tras haber deducido la relación entre los tensores de deformación y de tensiones, se ha aplicado al movimiento de un cuerpo en el que una de sus dimensiones es mucho mayor que las otras (modelo de Euler-Bernouilli). Los límites de aplicabilidad de este modelo se adecúan a los dispositivos desarrollados durante la presente tesis doctoral, que se mostrarán en los siguientes capítulos, en los que su longitud es un orden de magnitud mayor que su diámetro. Seguidamente, se ha demostrado que la parte temporal de la solución a la ecuación de Euler-Bernouilli es análoga a la solución del oscilador armónico simple; tanto en su versión ideal como en su versión con excitación y amortiguamiento. Esta analogía permitirá, en los siguientes capítulos, considerar los resonadores utilizados como un oscilador armónico simple, lo que simplificará la interpretación de los resultados obtenidos.

Por otra parte, en los epígrafes dedicados a la mecánica de fluidos, se ha demostrado la relación entre los campos de velocidades y presión, permitiendo, junto con la ecuación de continuidad, describir el movimiento de un fluido. Esta descripción se ha aplicado seguidamente a un fluido incompresible en régimen laminar y estacionario confinado dentro de una tubería infinita. De esta manera se ha demostrado que el flujo dentro de una tubería de dimensiones micrométricas presenta un perfil de velocidades parabólico. También, se ha mostrado que dentro de una tubería el caudal es directamente proporcional a la diferencia de presión aplicada entre sus extremos, siendo esta constante de proporcionalidad la resistencia microfluídica (Ley de Poiseuille).

Finalmente, se ha estudiado la fuerza que ejerce el fluido sobre una partícula que se encuentra inmersa dentro de este, mostrando que esta fuerza es directamente proporcional a la velocidad del fluido y a las dimensiones de la partícula. La descripción de esta fuerza, junto con el perfil parabólico conocido dentro de la tubería permitirá en los próximos capítulos desarrollar modelos para el cálculo de la velocidad de las partículas.

Bibliografía

- 1 Landau, L. D. *Teoría de la elasticidad*. (Barcelona [etc.]:Reverté, 1969).
- 2 Marsden, J. E. (ed Anthony J. Tromba) (Madrid [etc.]:Pearson Educación/Addison-Wesley, Madrid [etc., 2004).

- 3 Newton, I., Cohen, I. B., Whitman, A. M. & Budenz, J. *The Principia: Mathematical Principles of Natural Philosophy*. (University of California Press, 2016).
- 4 Levaniuk, A. P. *Métodos matemáticos de la física : Método de Fourier*. (Madrid:Ediciones de la Universidad Autónoma de Madrid, 2006).
- 5 Tamayo, J., Kosaka, P. M., Ruz, J. J., San Paulo, Á. & Calleja, M. Biosensors based on nanomechanical systems. *Chemical Society Reviews* **42**, 1287-1311, doi:10.1039/C2CS35293A (2013).
- 6 LAGRANGE, J. L. *MECANIQUE ANALYTIQUE*. (1853).
- 7 Salapaka, M. V., Bergh, H. S., Lai, J., Majumdar, A. & McFarland, E. Multi-mode noise analysis of cantilevers for scanning probe microscopy. **81**, 2480-2487, doi:10.1063/1.363955 (1997).
- 8 Landau, L. D. *Fluid mechanics*. 2nd ed. reprinted with corr. edn, (Amsterdam [etc.]:Elsevier, 2012).
- 9 Avila, K. *et al.* The Onset of Turbulence in Pipe Flow. *Science* **333**, 192, doi:10.1126/science.1203223 (2011).
- 10 Amini, H., Lee, W. & Di Carlo, D. Inertial microfluidic physics. *Lab on a Chip* **14**, 2739-2761, doi:10.1039/C4LC00128A (2014).
- 11 Di Carlo, D., Edd, J. F., Humphry, K. J., Stone, H. A. & Toner, M. Particle Segregation and Dynamics in Confined Flows. *Physical Review Letters* **102**, 094503, doi:10.1103/PhysRevLett.102.094503 (2009).
- 12 Martín-Pérez, A. *et al.* Hydrodynamic assisted multiparametric particle spectrometry. *Scientific Reports* **11**, 3535, doi:10.1038/s41598-021-82708-0 (2021).

Capítulo 2:

Fabricación de Dispositivos

Uno de los objetivos principales de esta tesis es el desarrollo del proceso de fabricación de los microcanales suspendidos resonantes (SMR, por sus siglas en inglés) que aumenten la versatilidad y accesibilidad de la técnica, manteniendo una buena reproducibilidad en la fabricación de los dispositivos. Generalmente, los resonadores con microcanales suspendidos suelen consistir en micropalancas de silicio (o nitruro de silicio) con un canal integrado¹⁻⁵, lo que requiere de una larga secuencia de procesos de fabricación en sala blanca (litografía, deposición de materiales, ataques químicos y/o físicos, etc.). Aunque estos métodos de fabricación permiten una gran reproducibilidad y un control muy preciso de las dimensiones del resonador, cuentan con la desventaja de que el coste de un dispositivo individual resulta muy elevado, lo que hace que esta técnica sea difícilmente accesible y dificulta sus aplicaciones comerciales.

Con el fin de simplificar el proceso de fabricación de los resonadores mecánicos con microcanales integrados y hacerlos compatibles con técnicas ópticas (p. ej. citometría de flujo), en 2015 se propuso por primera vez el uso de tubos capilares comerciales de sílice fundida a modo de SMR demostrando una sensibilidad en densidad de masa próxima a los SMR basados en micropalancas de silicio⁶. Estos tubos capilares tienen la ventaja añadida de ser transparentes, lo que abre la puerta a la caracterización óptica de analitos suspendidos en un líquido que fluye por su interior, dando lugar a la caracterización mecano-óptica basada en resonadores microcapilares transparentes (RMT). A este trabajo le siguieron otros en los que se ha conseguido reducir el límite de detección en masa de este tipo de resonadores empleando tubos capilares comerciales cuyo diámetro es reducido localmente en el centro mediante deformación plástica⁷. Esta reducción en el diámetro ha permitido medir partículas con una masa boyante de ~ 10 ng⁸. En paralelo a esos trabajos, otros autores han propuesto la fabricación de este tipo de resonadores transparentes con microcanales integrados mediante la ablación láser de sustratos de sílice⁹, consiguiendo resonadores con diámetros de varias decenas

de micras y longitudes de cientos de micras en un proceso más sencillo que el de fabricación de micropalancas con canales integrados, pero más complejo que el propuesto en la presente tesis.

En esta tesis se seguirá la aproximación de resonadores basados en tubos capilares de sílice comerciales añadiendo como novedad la integración de los mismos en sustratos reflectantes mediante el uso de anclajes poliméricos fotolitografiados. Esta nueva estrategia permite la miniaturización de los dispositivos consiguiendo un control de la longitud de los resonadores a escala micrométrica gracias a la utilización de técnicas de fotolitografía. En este capítulo se presenta el proceso de fabricación de los dispositivos que se usarán a lo largo de toda esta tesis. Para el método de fabricación se han propuesto dos aproximaciones: los dispositivos basados en sustratos con trincheras y los dispositivos basados en capilares elongados. Además, en esta tesis también se han desarrollado dispositivos microfluídicos (resistores microfluídicos) que, conectados en serie con los dispositivos RMT, permiten un mayor control del flujo en la zona suspendida dispositivo.

2.1. Fabricación de dispositivos RMT a partir de sustratos con trinchera

La primera estrategia de fabricación que se ha utilizado en esta tesis consiste en la integración de tubos capilares de sílice comerciales en un sustrato de silicio que ha sido atacado para presentar una trinchera sobre la que el tubo queda suspendido, pudiendo oscilar libremente. El proceso de fabricación ideado consiste en dos pasos: preparación del sustrato (en el que se crea una trinchera) y la deposición de los anclajes mediante fotolitografía. Al terminar el proceso, se obtiene un tubo que queda fijado al sustrato mediante unos bloques poliméricos y suspendido sobre una trinchera en el sustrato, de tal manera que podrá oscilar en esa región. De esta manera, la longitud del resonador estará determinada por la anchura de la trinchera.

Para la preparación del sustrato con una trinchera, se ataca una oblea de silicio monocristalino con una disolución acuosa de hidróxido de potasio (KOH). Protegeremos la oblea de silicio con una máscara de tal modo que solo serán atacadas las partes expuestas. Se probaron diversos recubrimientos (óxido de silicio, nitruro de silicio, oro...) para la máscara protectora, optando finalmente por utilizar un sustrato de silicio con un recubrimiento continuo de nitruro de silicio en su cara posterior (Fig. 2.1.a) y una máscara de resina Pro-TEK¹⁰ en su cara pulida. Esta opción resulta la más rápida y sencilla ya que solo requiere un

proceso de fotolitografía para la preparación de la máscara, mientras que los otros recubrimientos requieren varios pasos intermedios (deposición de una capa, litografía, ataque y retirada de la capa de material de la máscara).

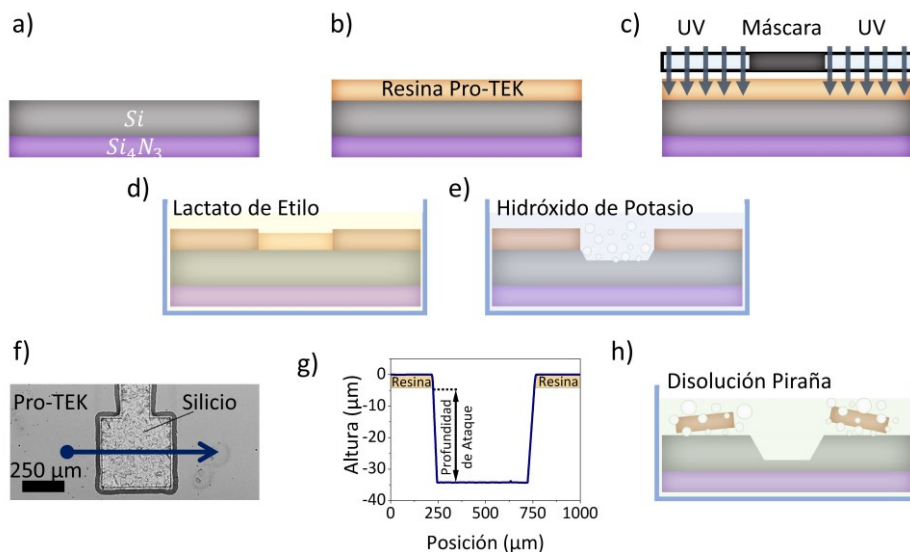


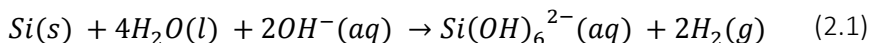
Figura 2.1.: Proceso de fabricación de la trinchera en el sustrato. Representación esquemática. **a)** Sustrato inicial. **b)** Deposición de una capa de resina Pro-Tek PSB 23 mediante centrifugado. **c)** Exposición a luz ultravioleta (UV) de la muestra con la resina. **d)** Revelado de la resina con lactato de etilo. **e)** Ataque húmedo del sustrato con una disolución acuosa de hidróxido de potasio. **f)** Imagen de microscopía óptica de la muestra tras el ataque con hidróxido de potasio. La flecha indica la posición y dirección del barrido realizado con el perfilómetro mostrado en g). **g)** Perfil de alturas medido en la trinchera mediante perfilometría. **h)** Representación esquemática de la limpieza del sustrato con disolución piraña.

Para la preparación de la máscara polimérica se sigue el siguiente procedimiento.

- **Primera deposición:** Se deposita una capa de resina ProTEK PSB Primer (Brewer Science Inc., EE.UU.) centrifugando la muestra a 1000 rpm durante 1 minuto.
- La muestra se calienta a 110° C durante 1 min y, posteriormente, a 220° C durante 5 min.
- Se lava la muestra con propilenglicol metil éter acetato (PGMEA) y se seca centrifugándola a 6000 rpm durante 2 min.
- **Segunda deposición:** Se deposita una capa de resina ProTEK PSB-23 (Brewer Science Inc., EE.UU.) centrifugando la muestra a 1300 rpm durante 1 minuto (Fig. 2.1.b.).

- Se calienta la muestra a 110° C durante 2 min.
- **Exposición:** Se expone la muestra a luz ultravioleta aplicando una dosis de 500 mJ/cm² (Fig. 2.1.c). Durante la exposición la muestra se encuentra cubierta con una máscara, consistente en un vidrio que permite el paso de la luz salvo en su centro donde tiene un motivo cromado con una forma de rectángulos de dimensiones 500 μm x 500 μm, 200 μm x 500 μm y 100 μm x 500 μm. Las dimensiones de estos rectángulos determinarán la forma de la trinchera.
- **Revelado:** La muestra se revela con lactato de etilo durante 1 min (Fig. 2.1.d). Como esta resina es negativa, las partes que no han sido expuestas a la luz ultravioleta se disuelven durante este paso. Los restos del revelador se retiran aclarando con alcohol isopropílico y centrifugando la muestra a 2000 rpm durante 2 min.
- Se calienta a 220° C durante 3 min.

Seguidamente, las muestras de silicio con la máscara polimérica fotolitografiada son introducidas en una disolución acuosa de hidróxido de potasio (KOH) con una concentración en masa del 30% a una temperatura de 80° C con agitación constante (Fig. 2.1e). Dentro de esta disolución, el silicio reacciona con el anión hidróxido y el agua produciendo hidrógeno gaseoso y el ion $Si(OH)_6^{2-}$ (Ec. 2.1). De esta manera, el silicio sólido en la superficie descubierta reaccionará, pasando a formar parte de la disolución, lo que creará la trinchera a una velocidad de ~1 μm/min, dadas la concentración y temperatura empleadas¹¹.



Tras 30 minutos, se sacan las muestras de la disolución, se limpian con agua ultra-pura y se secan con nitrógeno, obteniendo una oquedad con una profundidad de 30 μm, la cual se mide con un perfilómetro (Fig. 2.1f y Fig. 2.1g). Cabe resaltar que el KOH realiza un ataque anisótropo del silicio, siendo la dirección cristalográfica <111> aquella en la que la velocidad de ataque es despreciable. Por esta razón, entre la superficie sin atacar y la zona de mayor profundidad de ataque, la profundidad varía linealmente con una pendiente de 54.7°.

Posteriormente, se retira la resina Pro-Tek de las muestras introduciéndolas en disolución piraña (mezcla de ácido sulfúrico 96% con peróxido de hidrógeno 30% mezclados en proporción 3:1 en volumen). Pasados 10 min la capa de

resina se desprende (Fig. 2.1f), se retira la muestra de silicio de la disolución y se aclara con agua desionizada.

Una vez se ha conseguido un sustrato de silicio limpio y con una trinchera, se procede a fijar un capilar de vidrio en el mismo. Para ello, se toma un capilar de sílice comercial con unas dimensiones de 65 μm de diámetro externo, 20 μm de diámetro interno y 5 mm de longitud (TSP020090, Polymicro Technologies, EE.UU.). Este capilar dispone de un recubrimiento de poliimida de 12 μm que permite manipularlo sin romperlo. Sin embargo, este recubrimiento impide el acceso óptico al capilar de vidrio, por ello se retira localmente. Para esto, se adhiere el capilar a un porta-muestras de vidrio con cinta de Kapton en sus extremos de tal manera que solo queda sin tapar una zona de 1 mm en el centro. Este porta-muestras se introduce en disolución piraña y tras 12 min el recubrimiento se ha quitado por completo en la parte no protegida mientras se mantiene en la parte protegida. Seguidamente, este capilar se alinea para que su eje quede perpendicular con la trinchera y se adhieren sustrato y capilar con cinta de Kapton de tal manera que los extremos del capilar queden cubiertos (Fig. 2.2a). El uso de esta cinta evitará que capilar y sustrato se separen durante el centrifugado en la litografía, así como que entre fotoresina en el capilar (lo que lo inutilizaría).

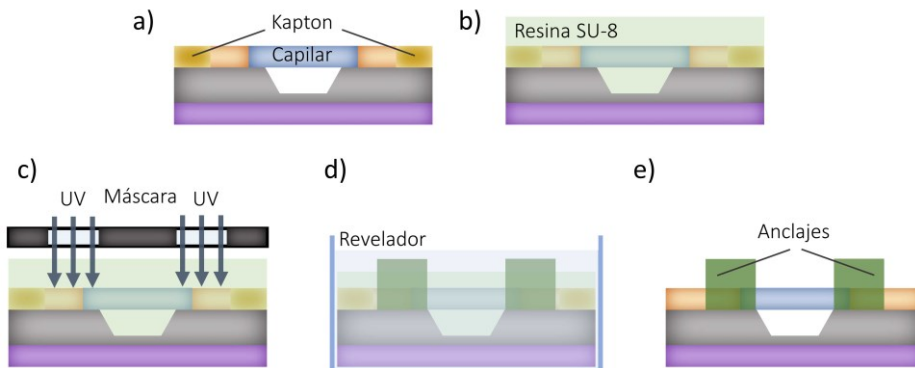


Figura 2.2.: Representación esquemática del proceso de fabricación de los anclajes poliméricos. **a)** Sustrato con trinchera y un capilar de sílice adherido con cinta Kapton. **b)** Deposición de la resina SU-8 mediante centrifugado. **c)** Exposición a luz ultravioleta (UV) de la muestra con la resina utilizando una máscara. **d)** Revelado de la resina. **e)** Dispositivo obtenido al final del proceso.

Finalmente se fabrican los anclajes poliméricos del capilar haciendo una fotolitografía de resina SU8-2150¹² mediante el siguiente procedimiento.

- **Limpieza:** Se limpia el capilar junto con el sustrato utilizando un plasma de oxígeno (100 W, 400 mtorr de O₂) durante 1 min.

- **Deposición:** Se deposita una capa de resina SU8-2150 centrifugando la muestra a 1500 rpm durante 30 s (Fig. 2.2b).
- Se calienta la muestra a 65° C durante 7 min y, a continuación, a 95° C durante 70 min.
- **Exposición:** Se alinea la máscara de litografía utilizando una alineadora automática para que los anclajes fabricados con resina lleguen hasta el principio de la trinchera en cada lado. Después, se expone la muestra a luz ultravioleta aplicando una dosis de 450 mJ/cm² (Fig. 2.2c). Para la exposición se cubre la muestra con una máscara, consistente en un vidrio cromado que permite el paso de luz UV a través de dos rectángulos de 1 mm x 2 cm separados entre ellos 500 μm, 200 μm o 100 μm. La distancia entre estos rectángulos deberá ser igual a la anchura de la trinchera.
- Tras la exposición, se calienta la muestra a 65° C durante 5 min y, seguidamente a 95° C durante 20 min
- **Revelado:** Se introduce la muestra en el revelador, (1-Metoxi 2-propilo) acetato y se mantiene en un baño con ultrasonidos (Fig. 2.2d). Pasados 20 minutos, la muestra se saca del revelador, se aclara utilizando alcohol isopropílico y se seca con nitrógeno. Como esta resina es negativa, al final de este paso, la resina que no ha sido expuesta se habrá disuelto, de esta manera, el capilar queda suspendido sobre la trinchera (Fig. 2.2.e).

Una vez acabado el proceso de fabricación se obtiene un capilar de 65 μm de diámetro (externo), con una longitud suspendida de 500 μm y anclado mediante bloques poliméricos en un sustrato reflectante (Fig. 2.3a).

Los dispositivos obtenidos mediante este proceso de fabricación presentan algunas limitaciones. En primer lugar, la relación entre el diámetro interno y el externo (λ), parámetro que determina las sensibilidades en masa y densidad (véase capítulo 4), es baja (~ 0.3). Por otra parte, aunque la resina utilizada (SU8-2150) produce unos anclajes de gran espesor (~ 200 μm), estos no producen una sujeción óptima de los resonadores ya que aparecen huecos entre el sustrato, el capilar y en anclaje (Fig. 2.3a). Esta oquedad no deseada en el anclaje se produce debido a la gran viscosidad de la resina utilizada con la que no se consigue cubrir por completo el capilar durante el proceso de centrifugado. Otra limitación de este proceso de fabricación se debe a que el ataque del silicio con KOH produce rugosidades en el silicio atacado (Fig. 2.3.). La aparición de estas rugosidades se debe a que uno de los productos de la

reacción del KOH con el silicio es hidrógeno en estado gaseoso, lo que produce la aparición de burbujas en la superficie atacada. A pesar de que la disolución se mantiene con una agitación constante, estas burbujas pueden permanecer adheridas a la superficie del silicio entre varios segundos y varios minutos, causando que la superficie que cubren no sea atacada durante ese tiempo, originando la aparición de rugosidades (Fig. 2.3b). Dado que el ataque es anisótropo estas rugosidades estarán formadas por estructuras piramidales (Fig 2.3c). Este es un efecto indeseado ya que producirá reflexiones difusas al medir estas muestras en el sistema interferométrico, lo que aumentará el nivel de ruido en las medidas.

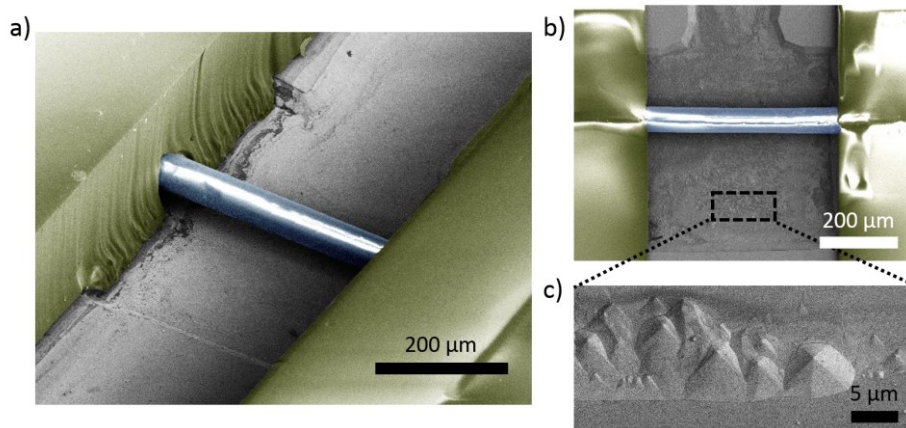


Figura 2.3.: Dispositivo a partir de un sustrato con trinchera finalizado. Imágenes tomadas mediante microscopía electrónica de barrido. Estas imágenes han sido coloreadas para una mejor comprensión. Se representan los anclajes poliméricos en amarillo, el capilar de vidrio en azul y el sustrato de silicio en gris. **a)** Imagen de un dispositivo tomada con una inclinación de 50°. **b)** Imagen de un dispositivo tomada con una inclinación de 0°. **c)** Detalle de la imagen en b) que muestra la estructura piramidal de las rugosidades.

Por otra parte, el diámetro de los capilares (90 μm) empleados en este proceso no es adecuado para su conexión directamente con los tubos y conectores de dimensiones tipo usados habitualmente en microfluídica. Por esta razón, para poder controlar la entrada de líquidos en el dispositivo es necesario conectar los extremos del dispositivo fabricado a un capilar de 250 μm de diámetro interno y 350 μm de diámetro externo (TSP250350, Polymicro Technologies, EE.UU.), que sí es compatible con los accesorios tipo usados en microfluídica. No obstante, esta solución solo es válida si el dispositivo se utiliza para medir propiedades de líquidos: cuando se utiliza para analizar partículas estas precipitan sobre la pared del capilar de mayor diámetro antes de llegar a la unión con el capilar de menor diámetro y no son transportadas hasta la zona sensible del dispositivo.

2.2. Fabricación de dispositivos RMT a partir de capilares elongados

Con el fin de superar las limitaciones que presentan los dispositivos basados en capilares integrados en sustratos con trinchera se ha desarrollado en esta tesis otro método de fabricación alternativo basado en la reducción local del diámetro de los capilares de sílice fundida mediante la deformación plástica de estos. Una vez se ha reducido localmente el diámetro de los capilares, estos son colocados sobre un sustrato de silicio y se fabrican los anclajes poliméricos mediante fotolitografía. Esta técnica es más simple y rápida que la anterior, ya que no requiere de la preparación de un sustrato con trinchera y el proceso de fotolitografía de los anclajes es más rápido.

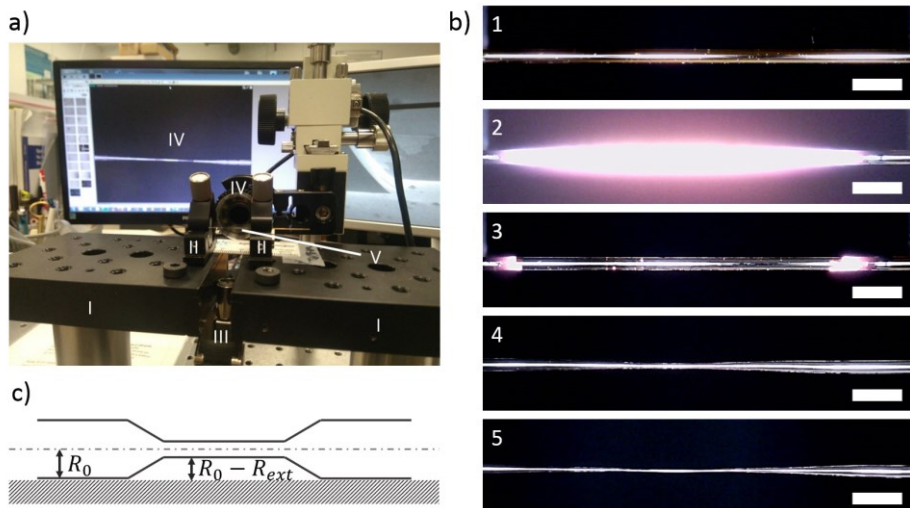


Figura 2.4.: Elongación de capilares. **a)** Estación de estirado de fibras utilizada. I. Posicionadores II. Sujeción para fibras. III. Soplete. IV. Cámara con objetivo integrado 10X. **b)** Sucesión de imágenes tomadas durante la elongación de un capilar, barra de escala: 1 mm. 1. Capilar inicial. 2. Pirolisis de la poliimida. 3. Poliimida retirada localmente. 4. Aplicación de fuerza en la dirección axial. 5. Capilar al final del proceso. **c)** Representación esquemática de la relación entre el radio externo inicial de capilar (R_0), el radio externo final del capilar (R_{ext}) y la distancia al sustrato en la zona suspendida.

En el primer paso de este proceso se busca reducir el diámetro (tanto interno como externo) de capilares de sílice comerciales, que inicialmente presentan diámetros de cientos de micrómetros, hasta diámetros de decenas de micrómetros. Esta reducción en el tamaño se consigue aplicando una tensión a los capilares en su dirección axial mientras se calientan para obtener una deformación plástica. Con el fin de controlar dicha deformación, se ha diseñado y fabricado una estación de estirado de fibras (Fig. 2.4a). Esta estación consiste en dos posicionadores micrométricos dotados de unas sujetiones originalmente diseñadas para fibras ópticas (HFF001, Thorlabs Inc., EE.UU.),

sobre las que se colocan los capilares. Estas sujeciones están alineadas y separadas entre sí una distancia conocida (inicialmente 1 cm). Entre estas sujeciones se coloca un capilar y se le aplica calor con una llama de isobutano mientras se accionan de manera controlada los posicionadores micrométricos de tal forma que se aumenta la separación entre ambos. De este modo, los posicionadores ejercen una fuerza de tracción sobre el capilar, con lo que se consigue elongar el mismo y reducir su diámetro en la zona deformable (caliente). Para un mayor control del diámetro, esta estación está equipada con una cámara con objetivo de aumento integrado 10X (DinoLite Edge AM4517MZTL, AnMo Electronics Corp., Taiwán).

Para la fabricación de los dispositivos empleados en esta tesis se reduce el tamaño de un capilar comercial de sílice (TSP250350, Polymicro Technologies, EE.UU.) que inicialmente tiene un diámetro externo de 325 μm , un diámetro interno de 250 μm , una longitud de 6.5 cm y un recubrimiento de poliimida de 18 μm de grosor. Al aplicar calor con la llama de isobutano sobre el capilar se retira localmente el recubrimiento de poliimida revelando el capilar de vidrio (Fig. 2.4b1 y 2.4b2). Nótese que solo se ha retirado el recubrimiento de poliimida en el centro del capilar mientras que los extremos lo conservan, lo que hará más fácil su manipulación. Una vez retirada la poliimida, se aplica calor durante 15 s para que la sílice alcance una temperatura suficientemente alta para la elongación. Seguidamente, se continúa aplicando calor con la llama mientras se actúan manualmente los posicionadores durante un intervalo de 1 min hasta que la separación entre estos se ha incrementado ~ 1 cm. Este proceso de elongación asistida térmicamente hace que en la zona central del capilar el diámetro se reduzca de manera continua, dándole así la forma de un hiperboloide (Fig. 2.4b5) en la que se mantiene siempre constante la relación entre los radios interno y externo ($\lambda = R_{in}/R_{ext}$). Esta estación de estirado de fibras permite conseguir capilares con un diámetro externo, en su punto de menor grosor, entre 55 μm y 5 μm controlando la longitud de elongación.

Una vez se ha realizado el proceso de elongación térmica del capilar, este se coloca sobre un sustrato de silicio pulido y se fabrican los anclajes poliméricos mediante una fotolitografía con resina SU-8 de tal manera que quede liberada la zona del capilar donde el diámetro se minimiza. A diferencia del epígrafe anterior, en este caso se utiliza la resina SU-8-2010¹³ (Kayaku Advanced Materials Inc., EE.UU.), una variedad de la familia de resinas SU-8 que presenta una menor viscosidad, permitiendo cubrir todo el capilar y reduciendo el tiempo del proceso de litografía. Para esta litografía se toma un sustrato de silicio de 2 cm x 2 cm al que se adhieren los extremos del capilar mediante cinta adhesiva Kapton. En este caso, al colocar el capilar sobre una superficie plana

la parte en la que se ha reducido el diámetro quedará suspendida (Fig. 2.4c), sin necesidad de litografiar y atacar previamente un sustrato como en el caso anterior. La litografía de los anclajes sigue unos pasos similares al epígrafe anterior, cambiando los parámetros de los distintos pasos al emplear otra variedad de la resina SU-8, como se muestra a continuación.

- **Limpieza:** Se limpia el capilar junto con el sustrato utilizando un plasma de oxígeno (100 W, 400 mtorr de O₂) durante 1 min.
- **Deposición:** Se deposita una capa de resina SU8-2010 centrifugando la muestra a 1000 rpm durante 30 s (Fig. 2.3b).
- Se calienta la muestra a 95° C durante 4 min.
- **Exposición:** Se expone la muestra a luz ultravioleta aplicando una dosis de 1200 mJ/cm² (Fig. 2.3c) colocando entre la lámpara y la muestra un filtro que absorbe las longitudes de onda inferiores a 355 nm (PL-360LP, Omega Optical Inc., EE.UU.). Para la exposición se cubre la muestra con una máscara, consistente en un vidrio cromado que permite pasar a la luz a través de dos rectángulos de 1 mm x 2 cm separados entre ellos 500 μm, 200 μm o 100 μm. La distancia entre estos rectángulos es la que determina finalmente la longitud de la región suspendida del dispositivo.
- Se calienta la muestra a 95° C durante 5 min.
- **Revelado:** Se introduce la muestra en el revelador, (1-Metoxi 2-propilo) acetato, durante 10 min (Fig. 2.3d). Al final de este paso, la resina que no ha sido expuesta se habrá disuelto mientras que la parte expuesta permanecerá en la muestra (Fig. 2.3e). De esta manera, quedará definida la parte en la que el capilar queda suspendido pudiendo oscilar (Fig. 2.5a).
- Se calienta la muestra a 300° C durante 10 min. Con este paso se consigue que desaparezcan las grietas que aparecen en la resina durante los pasos anteriores aumentando su rigidez, lo que mejora el anclaje del capilar.

Al final de este proceso se obtiene un capilar de sílice suspendido una longitud de 500 μm, anclado por ambos extremos sobre un sustrato de silicio pulido (Fig. 2.5a y Fig. 2.5b). A lo largo de la zona suspendida (500 μm), el diámetro varía ±1.5 μm entre los anclajes, debido a la forma de hiperboloide que confiere al capilar el proceso de elongación térmica. A pesar de esta forma, en todos los

capítulos el dispositivo se ha aproximado a un cilindro en su zona suspendida para el estudio de sus propiedades mecánicas e hidrodinámicas, ya que la variación relativa del diámetro es muy pequeña ($\sim 2\%$); aunque no ocurrirá lo mismo con sus propiedades ópticas (véase capítulo 3 para una discusión más detallada de este aspecto).

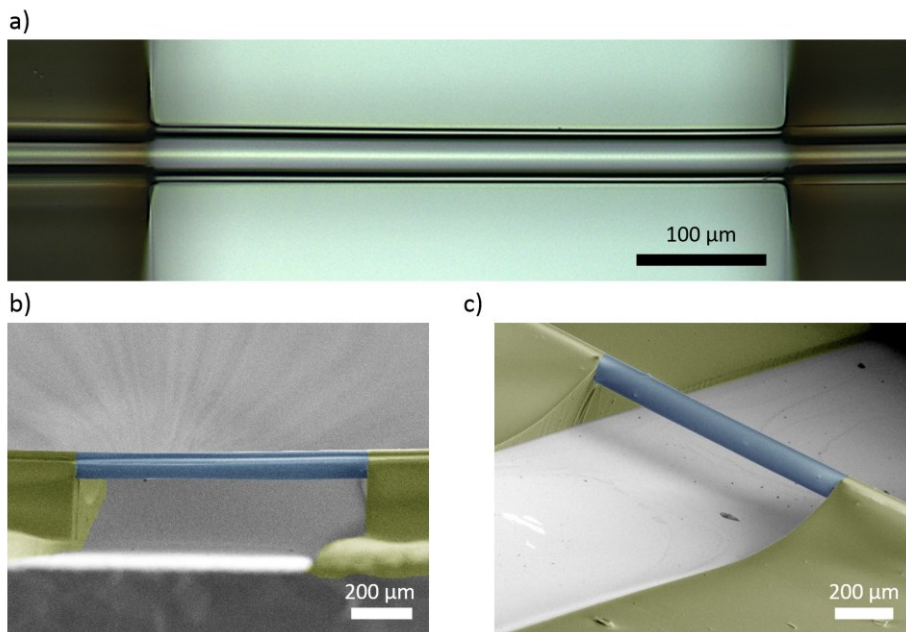


Figura 2.5.: Dispositivos fabricados a base de capilares elongados. a) Imagen de microscopía óptica de un dispositivo. **b)** Imágenes tomadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Imagen de un dispositivo tomada con una inclinación de 90° . **c)** Imagen de un dispositivo tomada con una inclinación de 35° . Las imágenes SEM han sido coloreadas para una mejor comprensión. Se representan los anclajes poliméricos en amarillo, el capilar de vidrio en azul y el sustrato de silicio en gris.

Nótese que, de acuerdo con las especificaciones del fabricante¹³ y los parámetros empleados en la litografía, la resina debería tener un espesor uniforme de $20\ \mu\text{m}$. Este espesor se obtiene en las zonas del sustrato de silicio alejadas del capilar, sin embargo, cerca del capilar, el espesor de la resina varía de manera continua hasta cubrir el capilar en su zona más alta, alcanzando un espesor de $\sim 200\ \mu\text{m}$ (Fig. 2.5c). Este espesor no uniforme tiene su origen en el proceso de recubrimiento inicial con la resina mediante centrifugado, al inicio del proceso de litografía, cuando la resina tiende a cubrir el capilar para minimizar su tensión superficial, a pesar del efecto de la fuerza centrífuga. Este fenómeno supone una ventaja ya que permite fabricar un anclaje de gran espesor ($\sim 200\ \mu\text{m}$) utilizando una resina con una viscosidad mucho menor que

las indicadas habitualmente para estos espesores, lo que reduce el tiempo de fabricación y evita la aparición de grietas cerca del capilar (Fig 2.5).

Dadas las ventajas que presentan estos dispositivos frente a los fabricados en el anterior epígrafe, todos los resultados experimentales que se muestran en esta tesis se han obtenido utilizando este tipo de dispositivos.

2.3. Fabricación de resistores microfluídicos

El control del flujo dentro de los dispositivos fabricados es un aspecto de gran importancia: las fuerzas hidrodinámicas dependen directamente del caudal establecido, por lo que el movimiento de los fluidos y de las partículas que estos puedan contener estará determinado por el circuito microfluídico implementado. Esto hace que se tenga que escoger un sistema de bombeo que se adapte lo mejor posible a los fenómenos que se quieran estudiar. A continuación, se muestran y discuten distintas configuraciones para este tipo de circuitos. Asimismo, se verá que, como los dispositivos empleados en esta tesis son resonadores mecánicos (además de dispositivos microfluídicos) se deben tener aún más aspectos en cuenta al elegir la configuración del circuito microfluídico que en el caso de los dispositivos microfluídicos convencionales.

Sistemas de bombeo

Para poder controlar el paso de fluidos se conecta al menos un extremo de los dispositivos resonantes fabricados a un sistema de bombeo hidráulico mediante tubos de PEEK y utilizando un conector de vidrio comercial (Inner-Lok GC Universal Union, Polymicro Technologies, EE.UU.). En esta tesis se han probado dos bombas distintas: una bomba de jeringas (neMESYS 290 N, Cetoni GmbH, Alemania) y otra de presión de gas (MFCS-EZ-07000001, Fluigent S.A, Francia).

La bomba de jeringas funciona haciendo avanzar a una velocidad controlada el émbolo de una jeringa, lo que permite establecer un caudal controlado dentro del dispositivo (Fig. 2.6a). El modelo de bomba empleado, junto con una jeringa de 5 mL, permite aplicar un caudal en un rango entre 0.1 nL/s y 500 μ L/s. A pesar de que este tipo de bombas permiten un control muy preciso y en un rango muy amplio del caudal, presentan dos inconvenientes de cara a su utilización con los dispositivos RMT fabricados. Por una parte, no permiten conocer la presión que se aplica al canal, lo que como se verá más adelante (capítulo 4), influye en la medida de los modos mecánicos del capilar. Por otra parte, al estar formada por distintas partes móviles, este tipo de bomba

transmite vibraciones a través del fluido y los tubos, lo que finalmente introduce un ruido adicional en la medida de la frecuencia de resonancia.

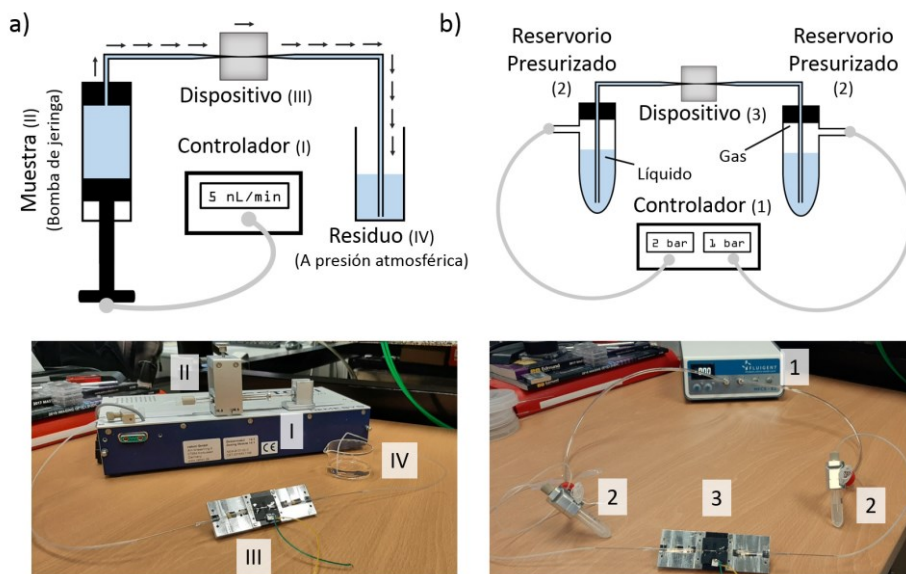


Figura 2.6.: Sistemas hidráulicos. a) Representación esquemática del sistema con una bomba de jeringas (arriba) y fotografía del mismo (abajo). **b)** Representación esquemática del sistema con bomba de presión de gas (arriba) y fotografía del mismo (abajo).

Por otra parte, la bomba de presión de gas consta de dos reservorios que contienen tanto el líquido a mover como un gas (habitualmente nitrógeno) a una presión controlada (Fig. 2.6b). El equipo empleado permite aplicar en cada reservorio una presión variable entre 0 mbar y 7000 mbar con una estabilidad de ± 1 mbar y permitiendo controlar variaciones de 5 mbar. La presión del gas se transmite al líquido y este se moverá siempre que haya una diferencia de presión entre los reservorios, avanzando desde el reservorio con mayor presión al de menor presión, Fig. 2.6b. Este tipo de sistema neumático presenta como ventaja frente al sistema de émbolos mecánicos una mejor reproducibilidad, ya que el uso de un reservorio presurizado en cada extremo del dispositivo aísla al fluido de muchas vibraciones externas. Además, el uso de los dos reservorios también permite revertir la dirección del flujo con solo cambiar la diferencia de presión.

Por el contrario, este tipo de bomba presenta como limitación que el caudal dentro del circuito estará determinado directamente por la resistencia microfluídica del dispositivo (Ley de Poiseuille, Ec. 1.118). Dada la resistencia de los dispositivos fabricados ($\sim 0.3 \text{ mbar}\cdot\text{s}\cdot\text{nL}^{-1}$, para las dimensiones típicas empleadas), se puede obtener un caudal mínimo de $\sim 15 \text{ nL/s}$, lo que resulta demasiado alto para los experimentos con micropartículas y células. Además,

este caudal mínimo fluctuaría ± 3 nL/s, lo que introduce una gran dispersión en los resultados si se quieren medir parámetros como la velocidad de las partículas. Por esta razón, en algunos de los experimentos realizados en esta tesis se unirá la salida del dispositivo RMT a unos canales microfluídicos de fabricación propia (resistores microfluídicos) con el fin de conseguir un mayor control sobre el caudal.

Proceso de fabricación y caracterización de resistores microfluídicos

Cuando se realizan experimentos con partículas en los dispositivos fabricados (capítulos 5 a 7), la velocidad de estas al pasar por la región suspendida del dispositivo determinará la calidad de las medidas mecánicas y ópticas. Además, la medida de la velocidad de las partículas supone una fuente de información adicional sobre las propiedades de las partículas (capítulo 6), por lo que es necesario tener un control preciso sobre este parámetro. La velocidad de las partículas es directamente proporcional al caudal en el dispositivo, por lo que este parámetro se podrá controlar a través de la diferencia de presión fijada entre los reservorios del sistema de bombeo de gas. Sin embargo, dadas las dimensiones de los dispositivos fabricados, para obtener una medida óptima de las partículas, la velocidad de estas debe ser menor que 50 mm/s: lo que se conseguirá con caudales inferiores a 50 nL/s. Teniendo en cuenta las características del sistema de bombeo y los dispositivos empleados, el caudal solo se puede variar en intervalos de 15 nL/s, dejando un control muy poco preciso sobre la velocidad de las partículas.

Como el rango de presiones aplicables está limitado a las especificaciones de la bomba de gas (entre 0 mbar y 7 bar, en intervalos de 5 mbar), la única manera de conseguir aplicar caudales más pequeños consiste en aumentar la resistencia del circuito microfluídico. Para esto, se conecta en serie a la salida del dispositivo RMT un dispositivo con canales microfluídicos de fabricación propia (resistor microfluídico). El circuito microfluídico resultante estará compuesto por la secuencia reservorio/RMT/resistor/reservorio. La resistencia total de este circuito resultará de la suma de la resistencia del dispositivo RMT y la del resistor, ya que se puede despreciar la contribución a la resistencia de los tubos de PEEK utilizados para conectar los distintos componentes del circuito debido a su mayor diámetro (~ 0.5 mm). El único objetivo del resistor microfluídico es aumentar la resistencia total del circuito, por lo que se pueden escoger sus dimensiones para trabajar en el rango de presiones deseado.

El proceso de fabricación de los resistores consta de los siguientes pasos: fabricación de un molde mediante fotolitografía, fabricación de una réplica en polidimetilsiloxano (PDMS) y sellado del PDMS en un sustrato de sílice.

Para la fabricación del molde se hará una litografía con resina SU8-2010¹³ en un sustrato de silicio siguiendo los siguientes pasos.

- **Deposición:** Se deposita una capa de resina SU8-2010 centrifugando la muestra a 1000 rpm durante 30 s (Fig. 2.2b).
- Se calienta la muestra a 95° C durante 4 min.
- **Deposición:** Se deposita otra capa más de resina SU8-2010 centrifugando la muestra a 1000 rpm durante 30 s (Fig. 2.2b).
- Se calienta la muestra a 95° C durante 4 min.
- **Exposición:** Se expone la muestra a luz ultravioleta aplicando una dosis de 800 W/cm² empleando un filtro que absorbe las longitudes de onda inferiores a 355 nm (Fig. 2.2c). La máscara utilizada en este caso dejará pasar la luz en las zonas que definirán la forma de los canales.
- Se calienta la muestra a 95° C durante 5 min.
- **Revelado:** Se introduce la muestra en el revelador, (1-Metoxi 2-propilo) acetato, durante 10 min (Fig. 2.2d).
- Se calienta la muestra a 150° C durante 10 min.

Una vez se tiene el molde en SU-8 sobre silicio (Fig. 2.7a), se prepara el polidimetilsiloxano (Sylgard 184, DowChemical Company, EE.UU.)¹⁴, mezclando 10 partes en masa de elastómero con 1 parte de agente curante. Esta mezcla

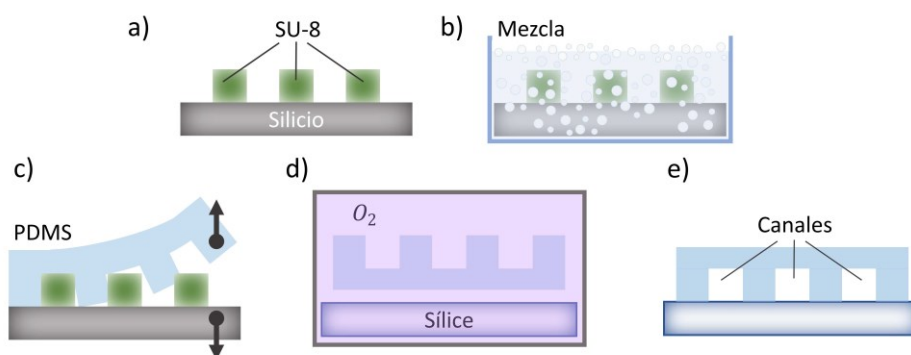


Figura 2.7: Proceso de fabricación de los resistores microfluídicos. Representación esquemática. **a)** Molde fabricado en SU-8 sobre Silicio. **b)** Introducción del molde en la mezcla. **c)** Separación del molde una vez curado el PDMS. **d)** Tratamiento del PDMS y el sustrato de sílice con plasma de oxígeno. **e)** Resistor terminado.

se remueve para conseguir una concentración homogénea de ambos

componentes y se vierte sobre el molde fotolitografiado (Fig. 2.7b). Se introduce el molde con la muestra en un desecador durante 20 min para eliminar las burbujas de aire que hay en la mezcla (Fig. 2.7b). Acto seguido se cura a 80° C durante 2 horas.

Al final de este paso la mezcla se ha solidificado, obteniendo así el PDMS. Seguidamente, se separa mecánicamente el PDMS del molde fotolitografiado, Fig. 2.7c. El PDMS tendrá la forma complementaria del molde: los salientes en el molde, serán oquedades en el PDMS y viceversa. Una vez separado del molde, se corta el PDMS sobrante y se realizan los agujeros de entrada y salida de este dispositivo. Cabe destacar, que el molde fabricado en SU-8 sobre silicio se puede reutilizar un número indefinido de veces para crear más piezas en PDMS idénticas. Finalmente, para sellar el dispositivo de PDMS en un sustrato de sílice, se limpiarán ambos con acetona, alcohol isopropílico y agua desionizada y se les realizará un ataque con plasma de oxígeno (100 W, 400 mtorr de O₂) durante 45 s, Fig. 2.7d. Tras este paso, ambas piezas se ponen en contacto y se calientan a 100° C durante 30 min. El PDMS y la sílice del sustrato presentan de manera natural grupos hidroxilo (OH) enlazados a sus respectivas superficies y durante este proceso el oxígeno ionizado del plasma reacciona con los átomos de hidrógeno de este grupo funcional produciendo vapor de agua mientras se mantienen los átomos de oxígeno enlazados las superficies del PDMS y la sílice. Seguidamente, al poner ambas superficies en contacto, los átomos de oxígeno de una superficie forman un enlace covalente con los átomos de oxígeno de la otra superficie¹⁵, lo que permite que ambas superficies queden adheridas consiguiendo unos canales sellados herméticamente, Fig. 2.7e.

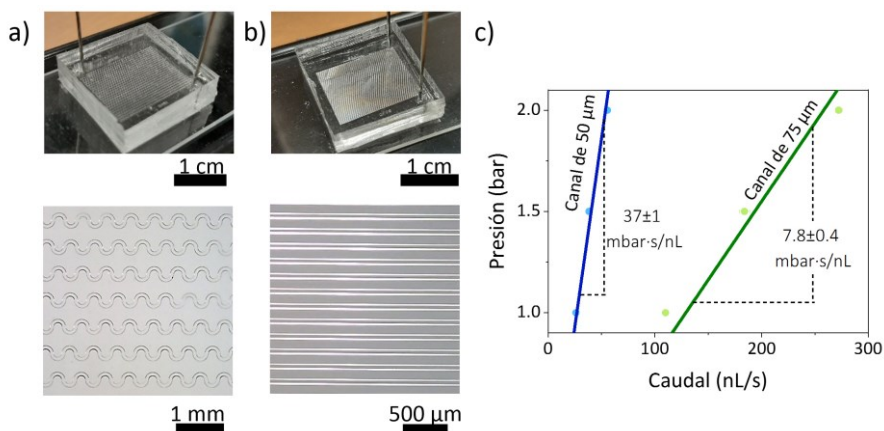


Figura 2.8.: Resistores microfluídicos fabricados. a) arriba. Fotografía del resistor de 75 μm de anchura. **abajo.** Imagen de microscopía óptica del mismo resistor. **b) arriba.** Fotografía del resistor de 50 μm de anchura. **abajo.** Imagen de microscopía óptica del mismo resistor. **c)** Caracterización de la resistencia total del circuito una vez conectado un resistor. Se representa

la diferencia de presión aplicada entre los extremos de las resistencias fabricadas en función del caudal.

Se han fabricado dos tipos distintos de resistores: uno formado por un canal en forma de serpentín doble de 75 μm de ancho y una longitud de 72 cm (Fig. 2.8a) y otro formado por un canal en forma de serpentín de 50 μm de ancho y una longitud de 129 cm (Fig. 2.8b), en ambos casos la profundidad del canal es de 50 μm . Dadas estas geometrías, estos resistores permitirán variar el caudal en intervalos de 0.6 nL/s y 0.1 nL/s, respectivamente.

Una vez fabricados los resistores microfluídicos, se caracteriza su resistencia. Para ello, se conecta uno de sus extremos a la bomba de presión de gas mientras el otro extremo se conecta a un reservorio abierto y graduado que permite medir el volumen acumulado con una precisión de $\pm 5 \mu\text{L}$. De esta manera, cuando se aplica una cierta presión se puede obtener el caudal midiendo la variación del volumen de agua en el reservorio en función del tiempo, lo que permitirá medir la resistencia como la pendiente de la presión en función del caudal. Tras realizar esta calibración se obtiene que el resistor de 75 μm de anchura presenta una resistencia de $7.8 \pm 0.4 \text{ mbar}\cdot\text{s}\cdot\text{nL}^{-1}$ mientras que el resistor de 50 μm de ancho tiene una resistencia de $37 \pm 1 \text{ mbar}\cdot\text{s}\cdot\text{nL}^{-1}$ (Fig. 2.8c). Este mismo método se ha empleado también para medir la resistencia de los dispositivos RMT fabricados, obteniendo que la resistencia de estos es del orden de $\sim 0.1 \text{ mbar}\cdot\text{s}\cdot\text{nL}^{-1}$. Como la resistencia de los resistores es entre 1 y 2 órdenes de magnitud mayor que la de los dispositivos RMT se podrá considerar que la resistencia de todo el circuito es igual a la del resistor utilizado.

2.4. Conclusiones

En este capítulo se han propuesto y discutido dos métodos para la fabricación de un resonador mecánico con un microcanal integrado transparente basado en capilares comerciales de sílice: uno basado en la utilización de sustratos de silicio con trinchera y otro basado en la utilización de capilares elongados térmicamente. Ambos procesos resultan más simples y baratos que los procesos de fabricación convencionales utilizados habitualmente para la fabricación de resonadores con microcanales integrados. Se ha demostrado que, entre los dos procedimientos de fabricación propuestos, el método de fabricación de dispositivos utilizando la elongación de capilares asistida

térmicamente resulta más ventajoso por ser un proceso de fabricación más simple y rápido.

Por otra parte, este método de fabricación no requiere procesos y consiste simplemente en dos pasos: la elongación térmica de los capilares y la fabricación de los anclajes poliméricos (mediante fotolitografía estándar). Para la reducción del tamaño de los capilares se ha empleado una estación de estirado de fibras de fabricación propia con medios sencillos y ampliamente accesibles mientras que para la fabricación de los anclajes se han empleado técnicas de fotolitografía estándar (una técnica ampliamente extendida). Del mismo modo, los materiales empleados en la fabricación también resultan bastante asequibles siendo estos un capilar de vidrio comercial, una resina de fotolitografía y un sustrato de silicio. Gracias a la combinación de técnicas de microfabricación sencillas y materiales asequibles, el proceso de fabricación propuesto en esta tesis podría suponer la expansión de técnicas de análisis basadas en resonadores mecánicos con microcanales integrados.

El sistema experimental aquí presentado también consta de un sistema de bombeo hidráulico. Se han estudiado distintas opciones para este propósito, mostrando que el uso de una bomba de presión de gas es la más adecuada para los dispositivos fabricados ya que la ausencia de partes móviles y el hecho de mantener los dos extremos del circuito a una presión controlada minimizan el nivel de ruido (en comparación con una bomba de jeringas). Con el fin de tener un mayor control sobre el caudal con este tipo de bombas se ha propuesto la fabricación y uso de microcanales de PDMS (resistores microfluídicos) conectados en serie con el dispositivo RMT. Estos dispositivos aumentan la resistencia del circuito microfluídico, lo que permite obtener un caudal más pequeño aplicando la misma diferencia de presión. Estos resistores microfluídicos fabricados son dispositivos completamente ajenos a los dispositivos RMT y se pueden conectar o desconectar del sistema microfluídico según sea necesario.

Bibliografía

- 1 Burg, T. P. & Manalis, S. R. Suspended microchannel resonators for biomolecular detection. **83**, 2698-2700, doi:10.1063/1.1611625 (2003).
- 2 Pastina, A. D., Maillard, D. & Villanueva, L. G. Fabrication of suspended microchannel resonators with integrated piezoelectric transduction. *Microelectron. Eng.* **192**, 83-87, doi:10.1016/j.mee.2018.02.011 (2018).

- 3 Chaudhari, S. *et al.* Electrophoresis assisted time-of-flow mass spectrometry using hollow nanomechanical resonators. *Scientific reports* **7**, 3535-3541, doi:10.1038/s41598-017-03846-y (2017).
- 4 Khan, M. F., Knowles, B., Dennison, C. R., Ghoraishi, M. S. & Thundat, T. Pressure modulated changes in resonance frequency of microchannel string resonators. **105**, 013507, doi:10.1063/1.4889744 (2014).
- 5 De Pastina, A. & Villanueva, L. G. Suspended micro/nano channel resonators: a review. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **30**, 043001, doi:10.1088/1361-6439/ab6df1 (2020).
- 6 Malvar, O. *et al.* Highly sensitive measurement of liquid density in air using suspended microcapillary resonators. *Sensors (Basel)* **15**, 7650-7657, doi:10.3390/s150407650 (2015).
- 7 Lee, D. *et al.* Pulled microcapillary tube resonators with electrical readout for mass sensing applications. *Scientific Reports* **6**, 33799-33807, doi:10.1038/srep33799
<https://www.nature.com/articles/srep33799#supplementary-information> (2016).
- 8 Ko, J., Lee, D., Lee, B. J., Kauh, S. K. & Lee, J. Micropipette Resonator Enabling Targeted Aspiration and Mass Measurement of Single Particles and Cells. *ACS Sensors* **4**, 3275-3282, doi:10.1021/acssensors.9b01843 (2019).
- 9 Calmo, R. *et al.* Monolithic glass suspended microchannel resonators for enhanced mass sensing of liquids. *Sensors and Actuators B: Chemical* **283**, 298-303, doi:<https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.12.019> (2019).
- 10 ProTEK® PSB Photosensitive Alkaline-Protective Material, <https://www.brewerscience.com/wp-content/uploads/2016/06/ProTEK_PSB_ds.pdf> (2020).
- 11 Seidel, H., Csepregi, L., Heuberger, A. & Baumgärtel, H. Anisotropic Etching of Crystalline Silicon in Alkaline Solutions: I. Orientation Dependence and Behavior of Passivation Layers. *Journal of The Electrochemical Society* **137**, 3612-3626, doi:10.1149/1.2086277 (1990).
- 12 SU-8 2000 Permanent Epoxy Negative Photoresist PROCESSING GUIDELINES FOR: SU-8 2100 and SU-8 2150, <<https://kayakuam.com/wp-content/uploads/2019/09/SU-82000DataSheet2100and2150Ver5.pdf>> (2019).

13 SU-8 2000 Permanent Epoxy Negative Photoresist. PROCESSING GUIDELINES FOR:SU-8 2000.5, SU-8 2002, SU-8 2005, SU-8 2007, SU-8 2010 and SU-8 2015, <https://kayakuam.com/wp-content/uploads/2019/09/SU-82000DataSheet2000_5thru2015Ver4-2.pdf> (2015).

14 *Technical Data Sheet: SYLGARD™184 Silicone Elastomer*, <<https://www.dow.com/content/dam/dcc/documents/en-us/productdatasheet/11/11-31/11-3184-sylgard-184-elastomer.pdf>> (2017).

15 Ye, X., Cai, D., Ruan, X. & Cai, A. Research on the selective adhesion characteristics of polydimethylsiloxane layer. *AIP Advances* **8**, 095004, doi:10.1063/1.5041867 (2018).

Capítulo 3:

Sistema Transducción Óptica y Caracterización de Dispositivos

Una vez fabricados los resonadores será necesario medir su frecuencia de resonancia en función del tiempo para su uso como sensores nanomecánicos. Para este propósito existen diferentes técnicas: piezoeléctricas¹, piezoresistivas², capacitivas³ y ópticas⁴⁻⁶. Cada uno de estos métodos tiene una serie de características que los hacen más o menos idóneos según la aplicación en la que se vayan a utilizar. Dentro de los métodos de transducción eléctricos se encuentran:

- Sistemas de lectura piezoeléctrica, basados en la lectura de un voltaje generado por un material piezoeléctrico que ha sido depositado previamente sobre el resonador. De esta manera, cuando el resonador se deforme debido al movimiento natural de oscilación, se formará un momento dipolar eléctrico neto a consecuencia de la tensión, lo que se podrá medir como una diferencia de voltaje en los extremos del resonador¹. Esta diferencia de voltaje es proporcional a la deformación del resonador, por tanto, si éste se encuentra oscilando se medirá un voltaje alterno de frecuencia igual a la del resonador.
- Sistemas de transducción piezoresistivos, basados, igual que en el caso anterior, en la deposición un material (en este caso es un material piezoresistivo) sobre el resonador. A diferencia del caso anterior, la tensión mecánica cambia la resistividad eléctrica de esta capa de material, por lo que si se aplica una diferencia de voltaje entre los extremos del resonador se registrará una intensidad de corriente proporcional a la deformación del resonador. Si el resonador oscila, se medirá una corriente alterna de frecuencia igual a la de oscilación².

- Sistemas de detección capacitiva, donde se aplica una diferencia de potencial entre el resonador y un sustrato cercano, como ambos están separados por un medio dieléctrico (vacío o aire) forman un condensador, cuya capacidad puede ser fácilmente medida. La capacidad de este condensador está determinada por las propiedades y el grosor de la capa de dieléctrico, es decir: la separación entre resonador y sustrato. De esta forma, cuando el resonador se deforme, este grosor cambiará, lo que se podrá medir como un cambio en la capacidad de este condensador.

Estos métodos de transducción eléctricos (piezoeléctricos, piezoresistivos y capacitivos) ofrecen la posibilidad de miniaturizar todo el sistema experimental integrándolo en un chip. Sin embargo, es necesario introducir pasos adicionales en la fabricación, lo que complica, ralentiza y encarece aún más el dispositivo. El aumento de la complejidad en el chip es poco deseable para algunas aplicaciones en biología y en biomedicina, para las cuales es conveniente que los dispositivos sensores puedan ser desechables. Además, este tipo de métodos de transducción limita la elección de los materiales que se pueden utilizar para fabricar el resonador a aquellos con unas propiedades específicas (conductores eléctricos o materiales adecuados para la deposición de un material piezoeléctrico o piezoresistivo). Por el contrario, los sistemas de medida ópticos (no integrados o en «espacio libre») no requieren la inclusión de pasos adicionales en la fabricación del dispositivo, ni tampoco limita los materiales a utilizar en la fabricación.

En los sistemas ópticos no integrados la transducción se realiza enfocando un haz láser sobre el resonador y se recoge la luz reflejada o transmitida por éste en un fotodetector. Entre los métodos ópticos destacan principalmente dos opciones: el método de deflexión del haz y los métodos interferométricos. El método de deflexión de haz fue utilizado por primera vez para medir la deflexión de micropalancas en el microscopio de fuerzas atómicas y consiste en enfocar un haz láser con un cierto ángulo sobre el resonador^{4,7}. Este haz láser es reflejado por el resonador y se recoge finalmente en un fotodetector sensible a la posición (PSD, por sus siglas en inglés «position sensitive detector») o un fotodetector segmentado, de esta manera, cuando la palanca sufra una deflexión, el ángulo con el que refleja el haz cambiará y, consiguientemente cambiará su posición en el fotodetector. De esta manera, cuando el resonador se encuentre oscilando, la señal eléctrica producida en el fotodetector será alterna con frecuencia igual a la del resonador.

Por otra parte, los métodos interferométricos funcionan haciendo incidir un haz láser sobre un resonador que se encuentra sobre un sustrato reflectante de tal manera que se puede formar una cavidad óptica entre el resonador y el sustrato^{8,9}. La luz reflejada por la cavidad se dirige, alineada con un haz de referencia, a un fotodetector. El haz reflejado y el haz de referencia interfieren, de tal manera que la intensidad medida en la superficie del fotodetector dependerá de la diferencia de fase entre ambos haces. Así, si el resonador se encuentra oscilando el camino óptico y, por tanto, la fase variarán de manera periódica, generando una variación de intensidad en la superficie del fotodetector que se traduce en una señal eléctrica alterna de igual frecuencia a la del resonador.

3.1. Sistema de lectura interferométrica

Para la medida de los dispositivos fabricados en esta tesis se ha optado por la utilización de un sistema interferométrico. Esta elección responde a dos razones: en primer lugar, este tipo de transducción no requiere la inclusión de pasos adicionales en el proceso de fabricación mostrado en el capítulo 2 y, en segundo lugar, dada la transparencia del resonador, este método permitirá obtener información sobre propiedades ópticas de los analitos utilizando el mismo haz láser que sirve para la transducción mecánica. De manera adicional, hemos encontrado que el uso del método interferométrico con los dispositivos fabricados inducen la aparición de fenómenos optomecánicos¹⁰⁻¹², que permiten una reducción drástica del ruido en frecuencia.

Se ha construido un interferómetro siguiendo el diseño de la Fig. 3.1. En primer lugar, se hace incidir un láser de helio-neón (5 mW, 632.8 nm, Research Electro-Optics Inc., EE.UU.) sobre un divisor de haz no polarizado 50:50. El haz que se divide en la dirección perpendicular se dirige hacia un fotodetector (PDA 10A-EC, Thorlabs Inc., EE.UU.) tras reflejarse en un espejo plano, mientras que la parte del haz que no se ha desviado se hace pasar por un objetivo 20x con una apertura numérica de 0.42 y una distancia de trabajo de 20 mm (M Plan Apo 20x, Mitutoyo, Japón). Finalmente, se hace incidir el haz enfocado sobre el dispositivo, donde se refleja y vuelve por el mismo camino hasta que llega de nuevo al divisor de haz y es dirigido hacia el fotodetector (Fig. 3.1.). Entre el divisor de haz y el fotodetector se coloca un objetivo 10x con una apertura numérica de 0.28 (M Plan Apo 10x, Mitutoyo, Japón) para enfocar el haz por completo dentro de la zona sensible del fotodetector. Todos los componentes del interferómetro se encuentran montados sobre posicionadores micrométricos que permiten un alineamiento preciso, mientras que el

dispositivo RMT se encuentra montado sobre posicionadores nanométricos (ECS-3030, Attocube GmbH, Alemania) que permiten el control de la posición relativa entre el dispositivo y el haz con una precisión de 50 nm.

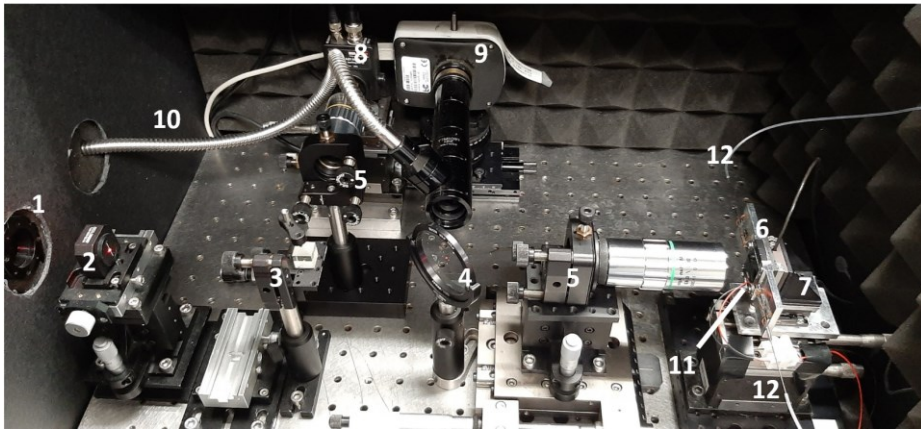
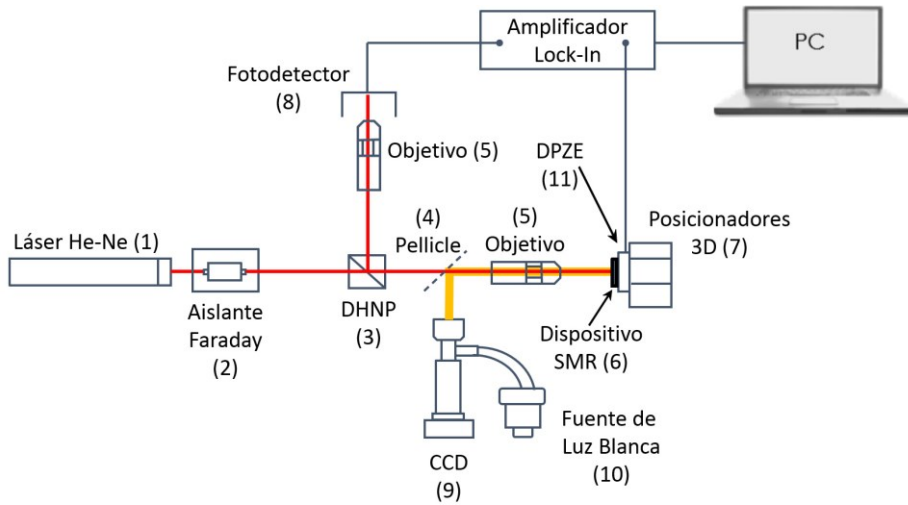


Figura 3.1.: Sistema de lectura interferométrica construido. Representación esquemática (arriba). Fotografía del sistema (abajo). 1. Láser de Helio-Neón. 2. Aislante Faraday. 3. Divisor del haz no polarizado. 4. Divisor del haz tipo Pellicle. 5. Objetivo. 6. Dispositivo. 7. Posicionadores 3D. 8. Fotodetector. 9. Cámara CCD. 10. Fuente de luz blanca. 11. Dispositivo Piezoeléctrico. 12. Tubos de PEEK que conectan al sistema de bombeo.

Además, para un mejor control del posicionamiento del dispositivo, el interferómetro también cuenta con una cámara CCD (Infinity 1-5C, Lumenera Corporation, Canadá) acoplada a una fuente de luz blanca. La luz blanca se introduce en el objetivo utilizando un divisor de haz tipo pellicle 92:8 que se encuentra entre el objetivo y el divisor de haz no polarizado (Fig. 3.1.). El interferómetro al completo se encuentra dentro de una caja aislante. La

utilización de esta caja hace al sistema de medida más estable tanto mecánica como ópticamente: por una parte, evita muchas perturbaciones externas como sonidos o corrientes de aire mientras que, por otra parte, evita que la luz ambiental llegue al fotodetector.

Cuando el haz láser llega al fotodetector se genera en éste un voltaje que es directamente proporcional a la potencia del haz en la superficie del fotodetector, la cual está determinada por la diferencia de camino óptico. Seguidamente, esta señal eléctrica es introducida en un amplificador Lock-In (HF2LI-PLL, Zürich Instruments, Suiza) en que se separan y analizan sus componentes modulada (AC) y no modulada (DC) en función del tiempo. Estas dos componentes de la señal contienen información de distinto tipo sobre el dispositivo. Por una parte, el voltaje de la componente no modulada (DC) es directamente proporcional al valor medio de la potencia reflejada por el dispositivo. Por otra parte, cuando el resonador está oscilando, el voltaje medido en la componente modulada (AC) tiene una frecuencia igual a la frecuencia de oscilación del dispositivo. A lo largo de esta tesis se llamará «señal mecánica» a la componente modulada y «señal óptica» a la componente no modulada de la señal obtenida en el fotodetector.

Excitación mecánica del dispositivo

Con el fin de poder medir los cambios en la frecuencia de resonancia de los dispositivos fabricados con una elevada relación señal/ruido, es necesario excitar los modos de vibración mecánica del resonador. Para este propósito existen diversos métodos: excitación térmomecánica¹³, fototérmica¹⁴ o piezoeléctrica¹⁵. El método más simple es el de la excitación termomecánica, ya que solo requiere mantener el resonador a una temperatura no nula, sin embargo, dadas las dimensiones de los resonadores aquí utilizados, la amplitud de oscilación termomecánica a la temperatura del laboratorio (295 K) no es lo suficientemente grande como para poder detectarla, dado el nivel de ruido del sistema interferométrico empleado. Por otra parte, el método de excitación fototérmica consiste en hacer incidir un haz láser con una intensidad modulada sobre el resonador, produciendo así una modulación de la absorción óptica y, consecuentemente, una modulación local de la temperatura en el resonador. Esta modulación de la temperatura en el resonador produce a su vez la modulación de la tensión en el resonador, lo que, finalmente, produce la oscilación del mismo. Sin embargo, para optimizar este método es necesario que el resonador esté formado por dos materiales distintos (efecto bimetálico), por lo que este método no resulta adecuado para los dispositivos fabricados ya que sería necesario depositar una capa de metal sobre el resonador, acabando así con su transparencia.

Por todo lo anterior, la excitación mecánica de los dispositivos se realiza mediante el uso de un dispositivo piezoeléctrico (DPZE) comercial (PQYY+0166, Physik Instrumente GmbH, Alemania). Los extremos de este dispositivo piezoeléctrico se conectan a la salida del amplificador lock-in, lo que permite controlar su vibración aplicando una señal eléctrica. Para asegurar una buena transmisión de la vibración del dispositivo piezoeléctrico al resonador, este se adhiere al sustrato de silicio usando un adhesivo comercial a base de cianocrilatos. El tipo de adhesivo empleado resulta óptimo para la transmisión de las vibraciones de la cerámica piezoeléctrica al sustrato de silicio debido a su gran rigidez (en comparación con otro tipo de adhesivos).

Para poder excitar el resonador se envía una señal eléctrica sinusoidal con una amplitud y frecuencia conocidas desde la salida del amplificador lock-in al DPZE. De esta manera, se consigue que el DPZE oscile a una frecuencia conocida y esta vibración se transmite al resonador, que modulará la potencia reflejada del láser en el interferómetro obteniendo finalmente una señal eléctrica en el fotodetector (Fig. 3.2a). La componente AC de la señal eléctrica obtenida en el fotodetector tendrá la misma frecuencia que la señal enviada al DPZE, pero una amplitud y una fase distintas. Esta amplitud y desfase (con respecto a la señal de salida) obtenidos en el fotodetector se pueden medir con el amplificador lock-in con un nivel de ruido muy bajo.

En el amplificador lock-in se mide la señal de entrada para la misma frecuencia que la señal de salida (señal de excitación) con un ancho de banda muy estrecho, lo que permite medir la amplitud y fase de la señal de entrada con un nivel de ruido muy bajo, pero no permite medir la frecuencia de resonancia del dispositivo de manera directa. La forma más sencilla de obtener el espectro de resonancia es ver la respuesta en frecuencia haciendo un barrido de la misma. Este barrido en frecuencia consiste en enviar distintas señales de salida con igual amplitud y variando secuencialmente la frecuencia de éstas mientras se registra la amplitud y fase de la señal de entrada. Tras la realización de este barrido, se pueden representar amplitud y fase en función de la frecuencia de excitación (espectro mecánico), lo que permite encontrar el valor de la frecuencia para el cual la amplitud y la pendiente de la fase se maximizan (frecuencia de resonancia).

El tiempo de adquisición de un espectro mecánico con gran resolución puede ser de varios minutos, lo que no permite seguir en tiempo real los cambios en la frecuencia de resonancia. No obstante, el amplificador lock-in sí permite medir el desfase entre las señales de entrada y salida muy rápidamente (microsegundos). Para ello existen dos métodos: configuración de lazo cerrado

y configuración de lazo abierto, que permiten seguir los cambios en la frecuencia de resonancia a través de los cambios en este parámetro.

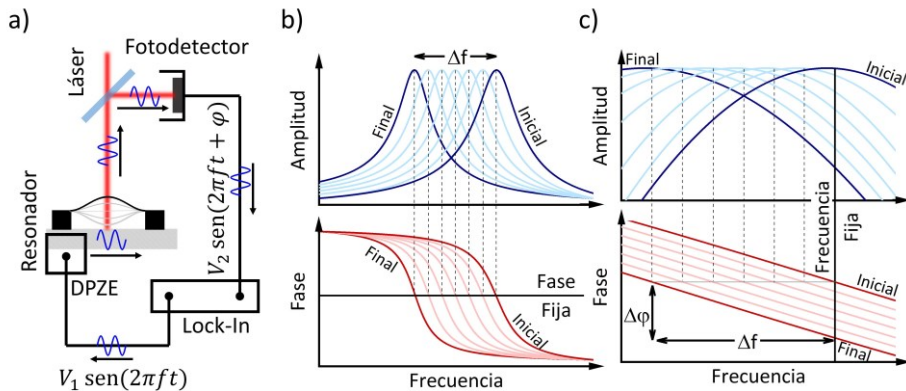


Figura 3.2.: Sistema de excitación y lectura de los dispositivos. a) Representación esquemática de la configuración de excitación y lectura. El amplificador lock-in envía una señal sinusoidal de una cierta frecuencia (f) y amplitud (V_1) y lee una señal de entrada de igual frecuencia, con un desfase (φ) y una amplitud distinta (V_2). **b)** Espectros mecánicos de un resonador cuyo cambio en frecuencia es seguido en configuración de lazo cerrado en fase (PLL). La fase en la resonancia es conocida (Fase fija), si la frecuencia de resonancia cambia (Δf) la frecuencia de excitación (líneas discontinuas) se variará para mantener la fase fijada. **c)** Espectros mecánicos de un resonador cuyo cambio en frecuencia es seguido en configuración de lazo abierto. La frecuencia de excitación se mantiene fija para el valor de la frecuencia de resonancia inicial, si la frecuencia de resonancia cambia, se medirá un desfase ($\Delta \varphi$) que es directamente proporcional al cambio en frecuencia. Nótese que en este caso amplitud y fase se muestran en una escala ampliada respecto a la figura b ya que, este método solo es válido para medir cambios pequeños en la frecuencia de resonancia (menores que la anchura del pico).

La configuración de lazo cerrado en fase (PLL, por sus siglas en inglés «phase locked loop») consiste en mantener el desfase entre las señales de entrada y salida constante variando para ello la frecuencia de la señal de salida. Este principio de medida se basa en que, cuando el resonador se encuentra en resonancia, la fuerza de excitación (señal de salida) y la oscilación del resonador (señal de entrada) presentan un desfase de $\frac{\pi}{2}$ (Ec. 1.66). De esta manera, el amplificador lock-in varía de manera continua la frecuencia de la señal de excitación a fin de mantener constante este desfase (Fig. 3.2b), por lo que la frecuencia de la señal de excitación se corresponderá con la del resonador. Como consecuencia de este principio de medida se obtendrá un nivel de ruido que no depende del resonador ni el sistema de medida óptico, sino de los parámetros introducidos en el amplificador para el seguimiento de la frecuencia (tiempo de adquisición, ancho de banda, etc.). La elección de estos parámetros puede llevar en ciertas ocasiones a la sobreestimación o subestimación del nivel de ruido del sistema. Además, dependiendo de las condiciones experimentales, la elección de estos parámetros puede causar un

retardo entre la frecuencia medida y la frecuencia de resonancia del resonador cuando esta cambie.

Por otra parte, la configuración de lazo abierto consiste en mantener la frecuencia de excitación fija en un valor igual al de la frecuencia de resonancia inicial (f_0) y medir el desfase entre las señales de entrada y salida ($\Delta\varphi$). Este principio de medida se basa en que la función que relaciona fase y frecuencia de excitación (Ec. 1.66) se puede aproximar a una recta para valores de la frecuencia próximos a la frecuencia de resonancia (Fig. 3.2c). De esta manera, si la frecuencia de resonancia cambia, se medirá un desfase ($\Delta\varphi$) directamente proporcional al cambio en la frecuencia (Δf , Ec. 3.1.).

$$\Delta f = \frac{f_0}{2Q_f} \Delta\varphi \quad (3.1)$$

Siendo Q_f el factor de calidad (véase epígrafe 1.4).

Esta configuración será válida siempre que los cambios en la frecuencia sean pequeños y el factor de calidad se mantenga constante. Al mantener fija la frecuencia de excitación, esta configuración presenta dos ventajas: no puede haber un retardo entre el cambio de la frecuencia del resonador y la frecuencia medida mientras que el nivel de ruido medido se corresponderá con el del resonador y el sistema de medida. Estas características hacen a la configuración de lazo abierto ideal para el estudio del cambio en frecuencia en la mayoría de los experimentos realizados en esta tesis doctoral. Por el contrario, la configuración de lazo cerrado no permite el seguimiento de la frecuencia de resonancia en el caso de la medida de distintos líquidos ya que el factor de calidad cambia y los cambios en la frecuencia de resonancia son grandes.

3.2. Caracterización óptica de los dispositivos

Como ya se ha indicado, utilizar resonadores transparentes y un sistema interferométrico para medir la oscilación del resonador abre la puerta tanto a complementar las medidas mecánicas de los analitos con medidas ópticas como a la optimización de la medida mecánica haciendo uso de la interferencia. De esta manera, se puede obtener información de las propiedades ópticas del dispositivo a través de la componente no modulada de la señal generada en el fotodetector, que es directamente proporcional a la potencia de luz reflejada. Por lo tanto, los cambios en esta señal se pueden interpretar como cambios en la reflectividad del dispositivo (ΔR), los cuales pueden producirse bien por un cambio en la posición relativa entre el spot del láser y el dispositivo o bien por el cambio de las propiedades ópticas dentro del microcanal. De esta manera, si

se realizan barridos en la posición relativa del spot registrando el valor de esta señal óptica se podrán conocer las propiedades ópticas de los dispositivos y comprobar si éstos pueden actuar como cavidades ópticas. Cabe esperar que, en la zona suspendida, el capilar pueda funcionar como dos tipos de cavidades ópticas diferentes: como una cavidad tipo Fabry-Perot o como una cavidad multicapa aire/sílice/líquido/sílice/aire/silicio formada por el capilar suspendido sobre un sustrato reflectante. El hecho de que el dispositivo se comporte como un tipo de cavidad u otra dependerá de la posición relativa entre el spot del láser y el capilar.

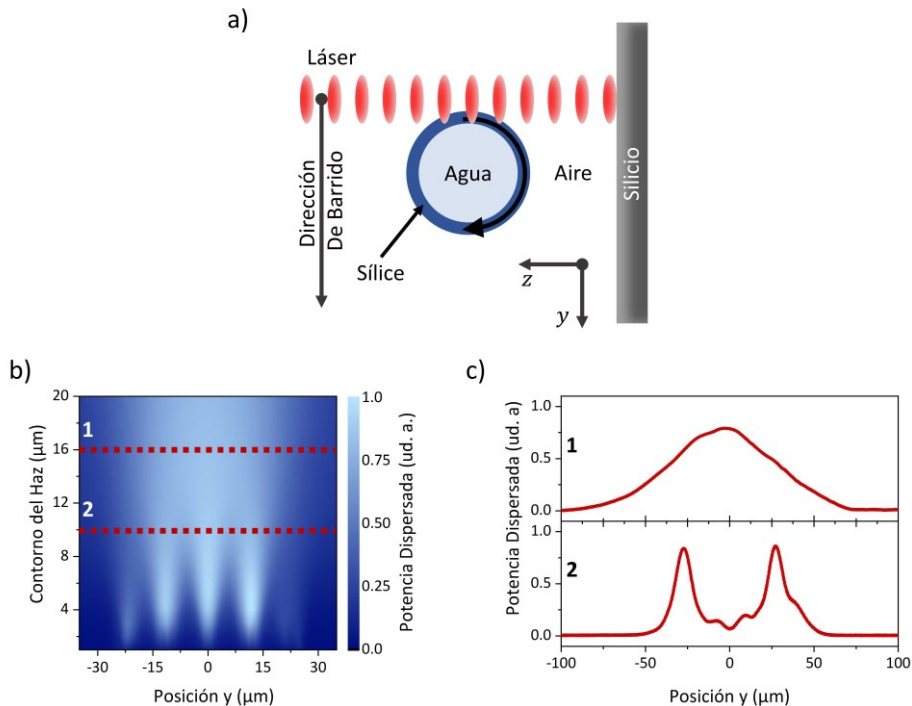


Figura 3.3.: Caracterización óptica de los dispositivos en la dirección ortogonal al eje del capilar (dirección y). **a)** Representación esquemática de los barridos en la posición. **b)** Resultado de las simulaciones por elementos finitos. Potencia dispersada en función del tamaño del haz (contorno del haz) y la posición de este. Las rectas 1 y 2 se corresponden con los tamaños de spot empleados en las medidas experimentales en la figura c. **c)** Medida experimental de la potencia de luz dispersada por el capilar al hacer barridos en posición con un tamaño de spot grande (1, 16 μm) y con un tamaño de spot pequeño (2, 9 μm).

En la dirección perpendicular al eje del capilar, se produce un acoplamiento evanescente de la luz cuando el spot del láser se enfoca cerca de las paredes (Fig. 3.3a). Este confinamiento es posible gracias a que la gran distancia de trabajo del objetivo empleado (20 mm) permiten el confinamiento del campo electromagnético en volúmenes inferiores al grosor del capilar. Para entender mejor este fenómeno, se simula mediante el método de elementos finitos

(Comsol Multiphysics, módulo RF) el campo electromagnético en una sección transversal del dispositivo, reproduciendo las dimensiones del experimento*, y modelizando la luz del láser como un haz gaussiano. Con el fin de reproducir la colección de luz reflejada por el objetivo que se usa en los experimentos, se calcula la integral del cuadrado de la norma del campo eléctrico sobre un ángulo sólido de 30° en campo lejano. El resultado mostrado es la diferencia entre la intensidad de luz inicial y esta integral (magnitud directamente proporcional a la intensidad de la luz dispersada). Esta simulación se repite variando secuencialmente tanto la posición del centro del haz como el tamaño del spot (Fig. 3.3a), lo que equivale experimentalmente a barrer en la dirección del foco del objetivo (dirección y) midiendo la potencia de luz dispersada.

Los resultados de la simulación muestran que, para tamaños de spot próximos o inferiores al grosor del capilar ($\sim 7 \mu\text{m}$) la potencia dispersada se maximiza en los laterales del capilar y se minimiza en el centro. Por el contrario, para el caso en el que el tamaño del spot es mayor que el grosor de las paredes del capilar, este perfil cambia obteniendo un único máximo en el centro del capilar (Fig. 3.3b). Este comportamiento se obtiene también cuando se barre la posición del spot en la dirección y mientras se mide la potencia dispersada (obtenida como la diferencia entre la potencia reflejada por el sustrato y la potencia reflejada en cada punto). En estos experimentos, al usar un tamaño de spot pequeño (menor que el grosor de las paredes del capilar) se maximiza la potencia dispersada en los extremos del capilar y se minimiza en el centro, mientras que, usando tamaños de spot grandes, la potencia dispersada se maximiza en el centro del capilar y decae de manera continua hasta hacerse nula pasados los extremos del capilar (Fig. 3.3c). Este comportamiento de la luz dispersada tanto en función de la posición y como en función del tamaño del spot demuestran el acoplamiento evanescente de la luz en las paredes del capilar.

Sería esperable que al realizar barridos en la dirección axial del capilar (Fig. 3.4a) la potencia reflejada (o dispersada) por el dispositivo se mantuviera constante. No obstante, como se indicó en el epígrafe 2.2., debido al proceso de reducción del diámetro del capilar, el dispositivo tiene un perfil hiperbólico, por lo que el diámetro puede variar $\pm 1.5 \mu\text{m}$ a lo largo de la región suspendida, por lo que el grosor de las distintas capas varía a lo largo de la dirección axial.

* En este capítulo se ha empleado un dispositivo lleno con agua ultra-pura y con un diámetro externo de $52 \mu\text{m}$ y una longitud suspendida de $500 \mu\text{m}$.

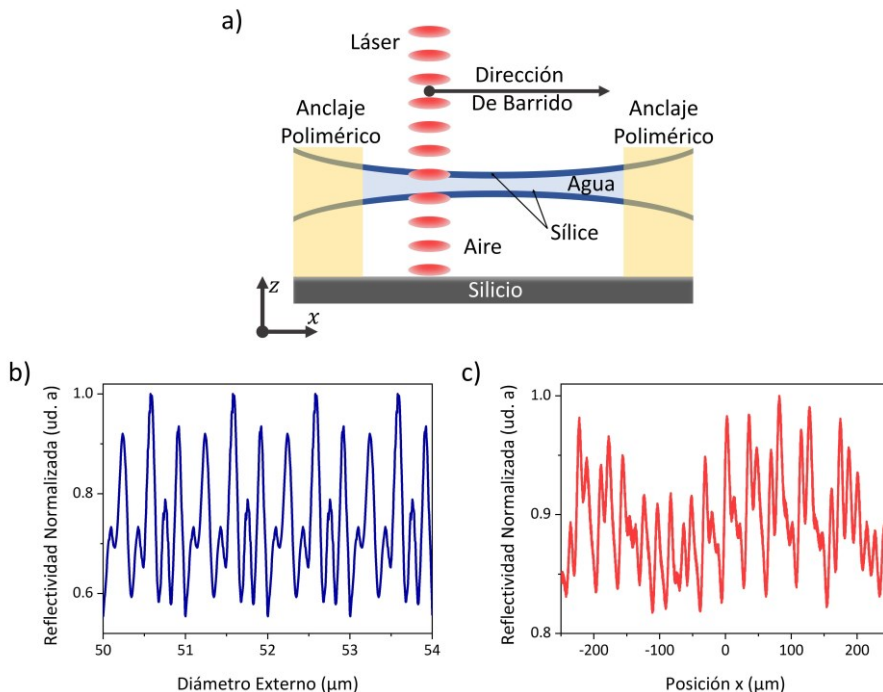


Figura 3.4.: Caracterización óptica de los dispositivos en la dirección axial capilar (dirección x). a) Representación esquemática de los barridos en la posición. b) Resultado de las simulaciones por elementos finitos. Intensidad reflejada en función del diámetro externo del capilar. c) Medida experimental de la potencia reflejada por el capilar al barrer la posición del spot en la dirección axial.

Cabe esperar que esta dependencia del grosor con la posición provoque finalmente que la potencia reflejada por el dispositivo varíe a lo largo del eje x . Para corroborar esta hipótesis se realiza una simulación por elementos finitos igual a la anterior, pero en este caso se mantiene el centro del spot alineado con el centro del capilar y manteniendo su tamaño fijo. En esta ocasión, se varía el diámetro externo del capilar entre $50 \mu\text{m}$ y $54 \mu\text{m}$ mientras se mantienen fijas la posición del eje del capilar y la relación entre diámetro interno y externo (λ) en 0.75. Dado el perfil de los capilares, este barrido en el diámetro externo es equivalente a un experimento en el que se barre la posición del spot a lo largo del eje del capilar (Fig. 3.4a). En esta simulación, en lugar del obtener el valor de la potencia dispersada se calcula el valor de la intensidad reflejada. Los resultados de esta simulación muestran que la intensidad reflejada por el capilar varía de forma periódica en función del diámetro externo, Fig. 3.4b, como consecuencia de la variación del grosor de las distintas capas. Al igual que en el caso anterior, los resultados experimentales reproducen el resultado obtenido en las simulaciones: al barrer la posición del spot en la dirección axial, se observa cómo la potencia reflejada varía de manera periódica (Fig. 3.4c).

Esta modulación de la potencia reflejada a lo largo del eje del capilar será relevante en diversos experimentos, mecánicos y ópticos, como se demostrará a continuación.

3.3. Caracterización mecánica de los dispositivos

Al haber usado un material polimérico para los anclajes del resonador, los dispositivos fabricados tendrán algunas particularidades con respecto a los resonadores fabricados en silicio. En primer lugar, al ser de un material más blando (módulo de Young $\sim 4 \text{ GPa}^{16}$), la oscilación del capilar producirá una pequeña deformación, no despreciable, de los anclajes. Por otra parte, debido a su proceso de fabricación, estos anclajes presentan un espesor variable a lo largo de la dirección y . El bajo módulo de Young del material de los anclajes, junto con su espesor variable define dos direcciones en las que oscilará el capilar (Fig. 3.5a): una paralela al plano del sustrato de silicio (en plano, de menor rigidez en el anclaje) y otra perpendicular a dicho plano (fuera de plano, de mayor rigidez). Estas dos direcciones de oscilación con distinta rigidez efectiva producirán la ruptura de la degeneración en el modo fundamental de resonancia del capilar.

Para comprobar y comprender mejor esta ruptura de la degeneración de los modos mecánicos se calcula mediante simulaciones con el método de elementos finitos (Comsol Multiphysics, módulo de mecánica estructural) la frecuencia de resonancia y la forma del modo de los resonadores empleados. Para esta simulación se introduce una geometría que reproduce las dimensiones del dispositivo incluyendo el capilar y el anclaje con un espesor variable (Fig. 3.5b). En esta simulación se aplica como condición de contorno que la deformación de la resina se mantiene fija en la frontera con el sustrato de silicio: lo que permitirá que la resina cerca del capilar se pueda deformar si éste oscila. Esta simulación da como resultado dos primeros modos no degenerados, siendo el de mayor frecuencia (772.44 kHz) aquel que vibra en la dirección perpendicular al plano del sustrato, mientras que el de menor frecuencia (765.25 kHz) se corresponde con el que vibra en la dirección paralela a este plano. Este resultado confirma que en la dirección perpendicular al plano la rigidez efectiva de los anclajes es mayor. Por otra parte, la amplitud de oscilación simulada muestra que la resina se deforma cerca de la región suspendida, Fig. 3.5b y Fig. 3.5c, esta amplitud de oscilación decae más rápidamente en el modo fuera del plano, lo que sugiere de nuevo una mayor rigidez efectiva en la dirección perpendicular al plano.

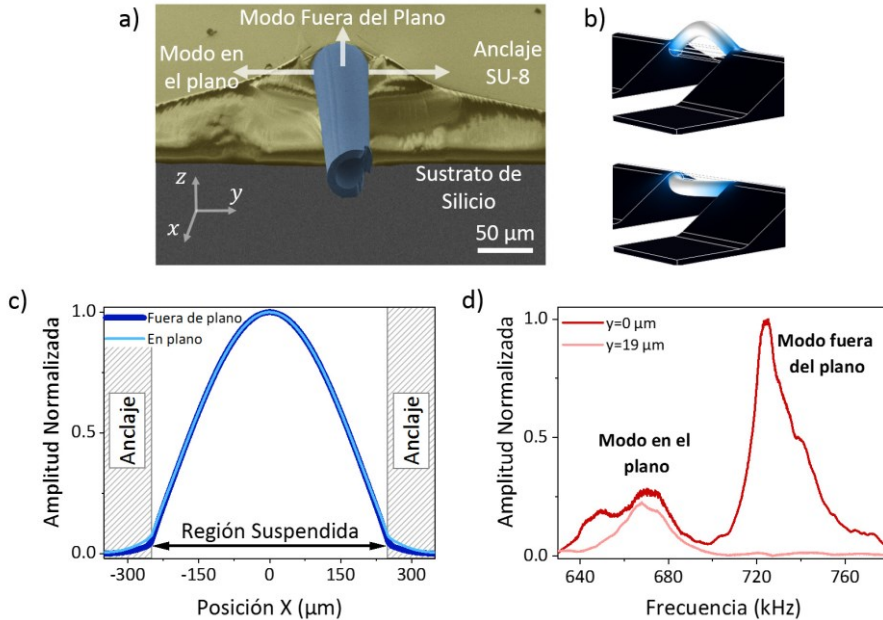


Figura 3.5.: Modos de oscilación de los dispositivos. a) Imagen de microscopía electrónica de barrido de un corte transversal del dispositivo indicando las direcciones de oscilación. Imagen en falso color: la zona mostrada en amarillo representa el anclaje polimérico, la zona en azul indica el capilar y la zona sin colorear muestra el sustrato de silicio. **b)** Resultado de las simulaciones por elementos finitos. Forma del primer modo fuera del plano (arriba) y en el plano (abajo). **c)** Amplitud de oscilación en función de la posición para el primer modo obtenido mediante el método de elementos finitos. **d)** Espectros mecánicos obtenidos experimentalmente haciendo un barrido en frecuencia en distintas posiciones en la dirección y .

Estos dos primeros modos no degenerados también se encuentran experimentalmente cuando se realiza un barrido en frecuencia con el amplificador lock-in, manteniendo el spot del láser enfocado en el eje del capilar (Fig. 3.5d). Sin embargo, si se realiza el mismo barrido en frecuencia enfocando el spot en el extremo del capilar (desplazándolo 19 μm del centro en la dirección y), sólo se detecta la oscilación en-plano. Nótese que el sistema de medida solo es sensible a los cambios de longitud en el camino óptico (oscilaciones fuera del plano). En el extremo del capilar, se pierde la interferencia debido a la gran dispersión causada por la pared del capilar y el modo fuera del plano no se detecta, sin embargo, se sigue detectando el modo paralelo al plano (Fig. 3.5d). Esta diferencia se debe a que el principio de detección del modo paralelo al plano es distinto; como el haz incide sobre una superficie cilíndrica que se desplaza en la dirección paralela al plano del sustrato, la dirección normal a esta superficie cambiará periódicamente. Este cambio en la dirección normal produce a su vez un cambio en la dirección en la que se refleja el haz y, finalmente, una modulación en la intensidad del haz en la superficie del fotodetector.

Los espectros mecánicos permiten caracterizar la frecuencia de resonancia y el factor de calidad, pero no permiten conocer cuál es el modo de vibración, por ello es necesario medir la amplitud de oscilación en función de la posición en el eje del resonador (forma del modo). Para realizar estas medidas, se excita el capilar a una frecuencia igual a la de resonancia mientras se barre la posición del spot en la dirección axial y se mide la amplitud de oscilación (voltaje AC). *A priori*, cabría esperar que esta forma del modo medida coincidiese con su forma teórica, obtenida al resolver la Ecuación de Euler-Bernoulli, o mediante simulaciones por elementos finitos, Fig. 3.5c. Sin embargo, como la reflectividad del dispositivo varía a lo largo de su dirección axial (Fig. 3.4), la amplitud de oscilación medida en función de la posición (forma experimental del modo) estará modulada por la sensibilidad en reflectividad (Ec. 3.2).

$$\Psi_{exp,n}(x) = \left| \frac{\partial R(x)}{\partial x} \right| \times \psi_n(x) \quad (3.2)$$

Siendo $\Psi_{exp,n}(x)$ la forma experimental del modo, $R(x)$ la reflectividad del capilar y $\psi_n(x)$ la forma teórica del modo (Ec. 1.54).

Esta modulación aparece cuando se combinan los resultados de las anteriores simulaciones de la potencia de luz reflejada en la dirección axial (Fig. 3.4b) con la forma teórica del modo (Ec. 1.54.), obteniendo una «forma experimental» del modo que variará su amplitud de manera periódica alcanzando su valor máximo cerca de la mitad de la región suspendida, aunque este máximo no tiene que coincidir exactamente con la mitad debido a las modulaciones de la reflectividad, Fig. 3.6a. Este resultado simulado se reproduce al medir la forma experimental del modo con el spot enfocado en el eje del capilar, Fig. 3.6b, sin embargo, si se repite esta medida desplazando el spot 19 μm del centro del capilar, este comportamiento se pierde, Fig. 3.6c, obteniendo una forma experimental del modo que se asemeja más a la teórica. Esto se debe a que, esta posición es en la que se dispersa una mayor potencia de luz, por lo que se pierde la interferencia y el haz sólo se encuentra modulado por las oscilaciones en el plano.

El modo fuera del plano se mide con una amplitud 4 veces mayor que el modo paralelo al plano y presenta una relación señal-ruido de 10^{-7} (un orden de magnitud menor que la medida del modo paralelo al plano). Por esta razón, salvo que se indique lo contrario, en el resto de los experimentos mostrados en esta tesis, se medirá este modo de vibración en la posición más cercana al centro que maximice esta señal.

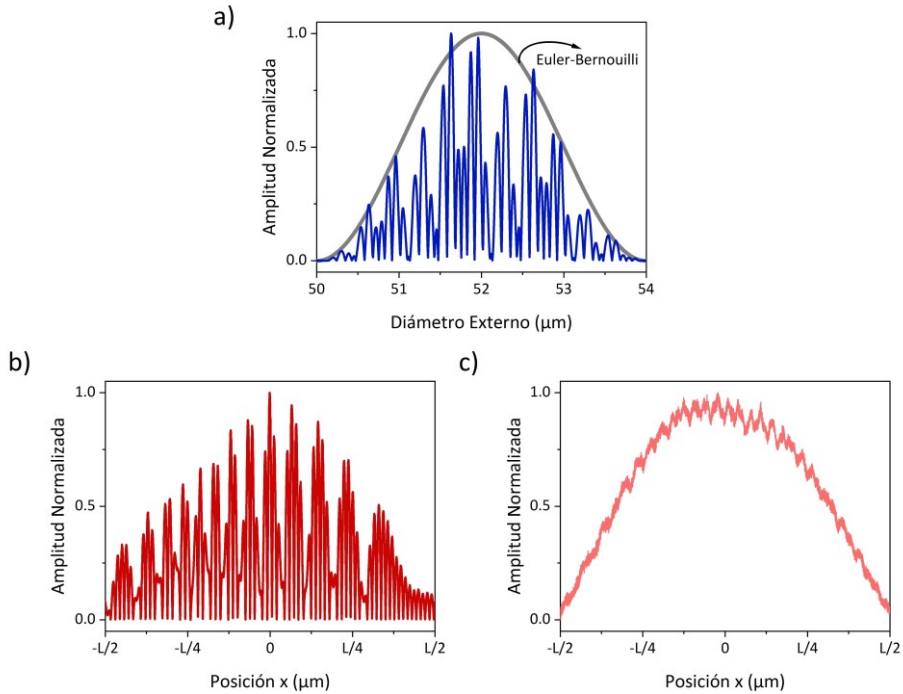


Figura 3.6.: Forma experimental del modo. a) Forma del modo esperada teniendo en cuenta el modelo de Euler-Bernoulli (línea gris) y la función de la reflectividad frente a la posición obtenida con las simulaciones por elementos finitos (línea azul). **b)** Forma experimental del modo fuera de plano medida haciendo un barrido en la posición x con el spot alineado con el eje del capilar. **c)** Forma del modo medida experimentalmente haciendo un barrido en la posición x con el spot desplazado $19\ \mu\text{m}$ respecto del eje.

Estabilidad en frecuencia

Una de las principales fuentes de información que se va a utilizar para la medida de distintas propiedades físicas de los analitos (ya sea de fluidos o de partículas) es la frecuencia de resonancia. El límite de detección de estas propiedades físicas (masa y densidad) estará determinado por el ruido en la señal de frecuencia medida. Para cuantificar este ruido en frecuencia se calcula la varianza de Allan¹⁷ (σ_{Allan}) a partir de la señal de frecuencia en función del tiempo para distintos tiempos de adquisición, Fig. 3.7a. La varianza de Allan promedia el cuadrado de la diferencia de frecuencia entre dos medidas consecutivas (Ec. 3.3, Fig 3.7a), lo que permite determinar cuánto fluctúa la frecuencia.

$$\sigma_{Allan}(\tau)^2 = \frac{1}{2} \langle [f(t_i) - f(t_{i-1})]^2 \rangle \quad (3.3)$$

Siendo σ_{Allan} la varianza de Allan, τ el tiempo de adquisición, f la señal de frecuencia y t_i el tiempo correspondiente a un cierto punto de la señal de frecuencia.

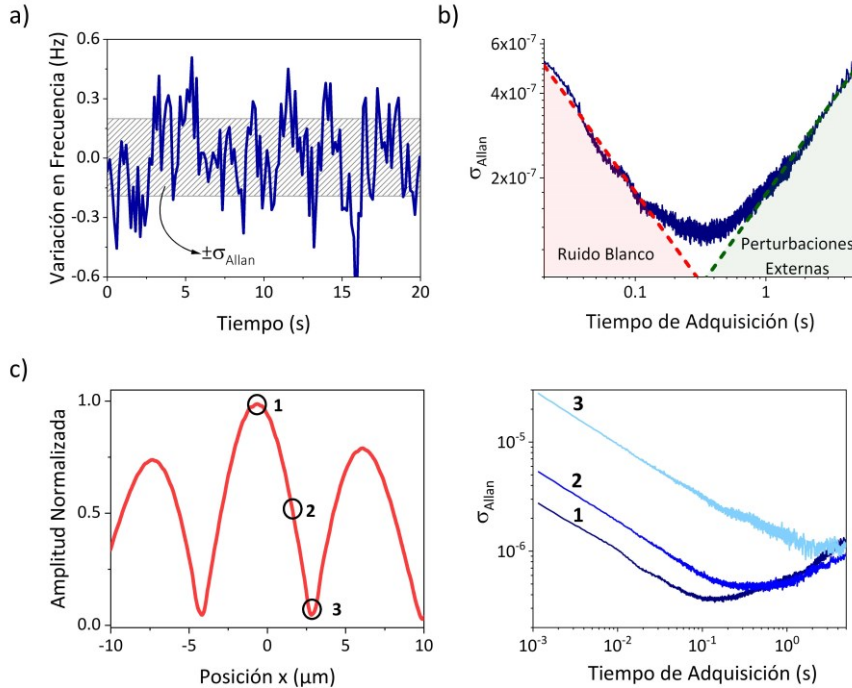


Figura 3.7.: Estabilidad en frecuencia. **a)** Fluctuaciones en la frecuencia de resonancia en un intervalo de tiempo medidas con uno de los dispositivos fabricados. **b)** Varianza de Allan en función del tiempo de adquisición para un resonador mecánico (línea azul continua) y su descomposición en los dos fenómenos que contribuyen a su forma: ruido blanco (línea discontinua roja) y perturbaciones externas (línea discontinua verde). **c)** Varianza de Allan para los dispositivos empleados medida variando la posición del spot en el eje del capilar (derecha) y la amplitud de oscilación para dichos puntos (izquierda).

En los resonadores mecánicos la varianza de Allan, en función del tiempo de adquisición, presenta un valor mínimo para un cierto tiempo de adquisición (Fig. 3.7b), lo que permite optimizar la medida. La presencia de este punto mínimo se debe a la superposición de dos fenómenos. Por una parte, a tiempos de adquisición cortos, las fluctuaciones en frecuencia están dominadas por ruido blanco, de tal manera que estas fluctuaciones se reducirán cuanto mayor sea el tiempo de adquisición (Fig. 3.7b). Por otra parte, a tiempos largos, las fluctuaciones en frecuencia están dominadas por perturbaciones externas (derivas térmicas o mecánicas en el sistema, variaciones en la temperatura del laboratorio, etc.), que se maximizan para tiempos largos (Fig. 3.7b).

Con el fin de caracterizar el ruido del sistema, se mide la varianza de Allan en los dispositivos fabricados llenos de agua ultra-pura en el sistema de lectura interferométrico. En esta caracterización se obtiene el mínimo valor de la varianza de Allan para un tiempo de adquisición de 150 ms con un valor de $\sigma_{Allan} = 3 \times 10^{-7}$. Este valor de la estabilidad se obtiene en el punto de máxima

amplitud de la forma experimental del modo. En la varianza de Allan el efecto del ruido blanco está directamente relacionado con la amplitud de la señal, por lo que, dada la forma del modo experimental de estos resonadores, la varianza de Allan dependerá fuertemente de la posición del spot en la dirección axial, Fig. 3.7c.

3.4. Conclusiones

En el presente capítulo se ha mostrado el sistema de lectura interferométrica que se utilizará en el resto de capítulos para la caracterización mecánica y óptica de los dispositivos y se han discutido las ventajas que presenta este sistema de transducción y lectura óptica en comparación con otros. La luz colectada en el fotodetector del interferómetro se mide en tiempo real y se separa en sus componentes modulada (AC, señal mecánica) y no modulada (DC, señal óptica), las cuales contienen información sobre la oscilación y la reflectividad del dispositivo, respectivamente. Esta doble medida simultánea mecano-óptica abre la puerta a un análisis más exhaustivo de los fluidos (y las partículas que éstos puedan contener) que fluyen por dentro del canal, con la ventaja de no requerir ninguna modificación adicional en el sistema experimental. Además, como se mostrará en los siguientes capítulos, esta medida mecano-óptica permitirá distinguir entre analitos que presenten masa o densidades muy parecidas.

Asimismo, este sistema interferométrico se ha utilizado para caracterizar óptica y mecánicamente los dispositivos fabricados. En el caso de la caracterización óptica, se ha demostrado experimentalmente y a través de simulaciones, que los resonadores microcapilares transparentes se comportan como una cavidad óptica en sus dos direcciones (axial y perpendicular), resultando el caso axial especialmente interesante debido al perfil hiperbólico de los capilares obtenido durante el proceso de elongación térmica.

En el caso de la caracterización mecánica, se ha demostrado experimentalmente y mediante simulaciones que los anclajes poliméricos propician la ruptura de la degeneración de los modos flexurales del dispositivo, dando lugar a un modo rígido (perpendicular al plano del sustrato) y otro blando (paralelo al plano del sustrato). Además, se ha estudiado cómo las propiedades ópticas de los dispositivos influyen en las medidas mecánicas, demostrando que se puede maximizar o minimizar la medida de uno de los modos degenerados desplazando la posición del spot en la dirección perpendicular al eje. Asimismo, se ha demostrado que la modulación de la reflectividad del dispositivo también repercute en la medida de la forma del

modo, obteniendo una medida experimental con la forma del producto de la modulación de la reflectividad y la forma teórica del modo obtenida del modelo de Euler-Bernoulli.

Cabe destacar que a pesar de que la variación del grosor podría parecer una limitación del proceso de fabricación, hace que los dispositivos fabricados sean muy versátiles ya que esta modulación de la reflectividad permite optimizar la medida de las señales óptica y mecánica con solo desplazar la posición del spot. De esta manera, cualquier tamaño de dispositivo podrá trabajar a su máxima sensibilidad para cualquier longitud de onda e índice de refracción del fluido. Por el contrario, si el espesor de la zona suspendida fuese homogéneo sería necesario un control muy preciso de las dimensiones del dispositivo durante la fabricación para maximizar la sensibilidad de la medida. No obstante, esta sensibilidad máxima solo sería válida para un valor de longitud de onda e índice de refracción específicos.

Bibliografía

- 1 Saadon, S. & Sidek, O. A review of vibration-based MEMS piezoelectric energy harvesters. *Energy Conversion and Management* **52**, 500-504, doi:<https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.07.024> (2011).
- 2 Bargatin, I., Myers, E. B., Arlett, J., Gudlewski, B. & Roukes, M. L. Sensitive detection of nanomechanical motion using piezoresistive signal downmixing. *Applied Physics Letters* **86**, 133109, doi:10.1063/1.1896103 (2005).
- 3 Yang, Y. T., Callegari, C., Feng, X. L., Ekinci, K. L. & Roukes, M. L. Zeptogram-Scale Nanomechanical Mass Sensing. *Nano Letters* **6**, 583-586, doi:10.1021/nl052134m (2006).
- 4 Meyer, G. & Amer, N. M. Novel optical approach to atomic force microscopy. *Applied Physics Letters* **53**, 1045-1047, doi:10.1063/1.100061 (1988).
- 5 de Lépinay, L. M. *et al.* A universal and ultrasensitive vectorial nanomechanical sensor for imaging 2D force fields. *Nature Nanotechnology* **12**, 156-162, doi:10.1038/nnano.2016.193 (2017).
- 6 Molina, J. *et al.* Optical Transduction for Vertical Nanowire Resonators. *Nano Letters* **20**, 2359-2369, doi:10.1021/acs.nanolett.9b04909 (2020).

- 7 Malvar, O. *et al.* Mass and stiffness spectrometry of nanoparticles and whole intact bacteria by multimode nanomechanical resonators. *Nature Communications* **7**, 13452, doi:10.1038/ncomms13452 (2016).
- 8 Gil-Santos, E. *et al.* Nanomechanical mass sensing and stiffness spectrometry based on two-dimensional vibrations of resonant nanowires. *Nature Nanotechnology* **5**, 641-645, doi:10.1038/nnano.2010.151 (2010).
- 9 Martín-Pérez, A., Ramos, D., Tamayo, J. & Calleja, M. Coherent Optical Transduction of Suspended Microcapillary Resonators for Multi-Parameter Sensing Applications. *Sensors* **19**, 5069-5078 (2019).
- 10 Ramos, D. *et al.* Silicon nanowires: where mechanics and optics meet at the nanoscale. *Scientific Reports* **3**, 3445, doi:10.1038/srep03445 (2013).
- 11 Chan, J. *et al.* Laser cooling of a nanomechanical oscillator into its quantum ground state. *Nature* **478**, 89-92, doi:10.1038/nature10461 (2011).
- 12 Metzger, C. H. & Karrai, K. Cavity cooling of a microlever. *Nature* **432**, 1002-1005, doi:10.1038/nature03118 (2004).
- 13 Ramos, D. *et al.* Detection of bacteria based on the thermomechanical noise of a nanomechanical resonator: origin of the response and detection limits. *Nanotechnology* **19**, 035503, doi:10.1088/0957-4484/19/03/035503 (2007).
- 14 Ramos, D., Tamayo, J., Mertens, J. & Calleja, M. Photothermal excitation of microcantilevers in liquids. **99**, 124904, doi:10.1063/1.2205409 (2006).
- 15 Lee, D. *et al.* Pulled microcapillary tube resonators with electrical readout for mass sensing applications. *Scientific Reports* **6**, 33799-33807, doi:10.1038/srep33799
<https://www.nature.com/articles/srep33799#supplementary-information>
(2016).
- 16 Xu, T. *et al.* Characterization of the mechanical behavior of SU-8 at microscale by viscoelastic analysis. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **26**, 105001 (2016).
- 17 Allan, D. W. Statistics of atomic frequency standards. *Proceedings of the IEEE* **54**, 221-230, doi:10.1109/PROC.1966.4634 (1966).

Capítulo 4:

Medida de Propiedades Físicas de Fluidos

Detectar la presencia de analitos, bien sea en líquidos o gases, supone una aplicación de gran interés en una amplia variedad de ámbitos que abarcan desde la detección precoz de enfermedades o el control medioambiental, hasta la prevención de riesgos laborales. Para este propósito es necesario el uso de sensores químicos. Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés) este tipo de sensores se componen de dos partes: un receptor y un transductor¹. En la parte receptora del sensor el analito interacciona con esta, permitiendo obtener algún tipo de forma de energía que pueda ser medida con el transductor. Por su parte, el transductor permite convertir la energía generada por el receptor en una señal que se pueda analizar (p. ej. una señal eléctrica). Los sensores químicos se pueden dividir en dos grupos dependiendo del principio de funcionamiento utilizado en su parte receptora: aquellos basados en fenómenos físicos y aquellos basados en fenómenos químicos. Los sensores de gases y de contaminantes en medios acuosos más extendidos comercialmente utilizan receptores basados en reacciones químicas específicas entre los contaminantes y la parte receptora, lo que permite una detección altamente sensible. Como contrapartida, estos sensores están limitados a la detección de un cierto tipo de sustancia para la cual están diseñados (selectividad). Asimismo, este proceso de reconocimiento selectivo satura la superficie del sensor con el paso del tiempo, lo que limita su vida útil.

Aunque los receptores basados en reacciones químicas suelen ofrecer una gran sensibilidad, su selectividad puede resultar un inconveniente en algunas aplicaciones en las que no se busca un tipo de sustancia específica sino variaciones en la composición de una sustancia (p. ej. detección de contaminantes en agua para el consumo humano). Por esta razón, los sensores con receptores basados en fenómenos físicos han ido cobrando interés en los

últimos años. Parámetros como densidad^{2,3}, viscosidad⁴, compresibilidad⁵ o índice de refracción⁶ pueden utilizarse para distinguir entre distintos tipos de fluidos. En el caso de disoluciones binarias, la medida de las propiedades físicas de los fluidos pueden llegar incluso a permitir estimar la composición química de las mismas^{6,7}. Destaca entre todos la densidad, que es ampliamente utilizada en diversas aplicaciones como la determinación de la calidad de aguas^{2,8}, la pureza en combustibles⁹ o para la medida de la calidad de aceites vegetales de uso alimentario¹⁰. Asimismo, en el ámbito del diagnóstico clínico es habitual el análisis de fluidos corporales para la detección y seguimiento de distintas enfermedades, por lo que la medida de sus propiedades físicas supone un primer indicador rápido de la aparición de ciertos desórdenes. Por ejemplo, la densidad y el índice de refracción en la orina dependen directamente de la tonicidad de la misma¹¹, mientras que la densidad del plasma sanguíneo depende de la concentración de proteínas en este¹². Por esta razón, la medida de estos parámetros físicos puede utilizarse como un primer indicador de la aparición de distintas enfermedades.

En este sentido, los microcanales suspendidos resonantes (SMR) han demostrado ser una técnica capaz de realizar medidas de densidad de fluidos con una gran sensibilidad, utilizando para ello la densimetría basada en tubos resonantes^{2,13}, también empleada en los densímetros comerciales. Los densímetros comerciales más avanzados consisten en un tubo de vidrio en forma de «U» de dimensiones macroscópicas, cuyos extremos están anclados formando un oscilador tipo palanca que resuena en el rango de frecuencias audibles. Este tubo se llena con un fluido de tal manera que la frecuencia de resonancia cambiará en función de la densidad del mismo¹⁴. Siguiendo este mismo principio de funcionamiento, en el rango de los micrómetros, los SMR consiguen una sensibilidad en densidad similar a los densímetros comerciales más avanzados ($\sim 1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ¹⁵) con la ventaja adicional de utilizar una muestra de un volumen del orden de picolitros^{4,16}, frente al volumen de mililitros que requieren los aparatos comerciales. Además, los SMR también han sido propuestos en distintos trabajos para la medida de parámetros adicionales a la densidad como la viscosidad⁴ o la presión del fluido¹⁷, lo que permitiría un análisis más completo y fiable de los fluidos.

En este capítulo se propone y demuestra la utilidad de los resonadores fabricados, no solo como densímetros, sino también para la medida del índice de refracción (refractómetro) del fluido. La medida de ambos parámetros se ha utilizado en esta tesis para estimar la concentración de disoluciones binarias de alcoholes. Asimismo, en este capítulo se estudian los efectos de la presión

hidrostática sobre la frecuencia de resonancia, lo que permitirá medir propiedades como la compresibilidad de líquidos o la masa molecular en gases.

4.1. Medida de la densidad

Los resonadores fabricados constan de una pared de sílice (masa fija) y un canal interno que se puede llenar con distintos fluidos (masa variable). De esta manera, al remplazar un fluido interno por otro de distinta densidad, la masa total del resonador cambiará, produciendo un cambio en su frecuencia de resonancia. La relación entre la densidad del fluido y la frecuencia de resonancia puede obtenerse aplicando las condiciones de un cilindro a la solución de la ecuación de Euler-Bernouilli para un resonador tipo puente (Ec. 1.55). Como el resonador está compuesto por dos medios de distinta densidad deberá sustituirse el término ρA por su valor ponderado al área que cubre cada medio. De esta manera, la frecuencia de oscilación de la zona suspendida tiene la siguiente forma (Ec. 4.1).

$$f_n = \frac{R_{ext}\alpha_n^2}{4\pi L^2} \sqrt{\frac{E(1-\lambda^4)}{\rho_c[1-\lambda^2] + \rho_f \varepsilon^2}} \quad (4.1)$$

Siendo R_{ext} el radio externo del capilar, α_n el autovalor del modo de vibración (Ec. 1.53), E el módulo de Young de las paredes del capilar, λ la relación entre el radio interno y externo, ρ_c la densidad en la pared del capilar y ρ_f la densidad del fluido.

De esta manera, si el dispositivo se encuentra inicialmente lleno con un cierto fluido de referencia (habitualmente agua ultra-pura), de densidad ρ_0 , y con una frecuencia de resonancia f_0 , cuando se cambie el fluido interno la frecuencia de resonancia cambiará (Δf) como consecuencia de la diferencia de densidad entre ambos fluidos ($\Delta\rho$, Ec 4.2).

$$\frac{\Delta f}{f_0} = - \frac{\lambda^2}{2(\rho_c[1-\lambda^2] + \rho_0\lambda^2 - \lambda^2\Delta\rho)} \Delta\rho \quad (4.2)$$

Para variaciones de densidad pequeñas, la anterior expresión (Ec. 4.2) se puede aproximar a una recta, permitiendo definir la responsividad en densidad (\mathcal{R}_ρ) como la pendiente de dicha recta (Ec. 4.3).

$$\mathcal{R}_\rho = \left| \frac{\partial(\Delta f/f_0)}{\partial\rho} \right| = \frac{\lambda^2}{2(\rho_c[1-\lambda^2] + \rho_0\lambda^2)} \Delta\rho \quad (4.3)$$

Para esta respuesta en densidad se mide la frecuencia de resonancia de un dispositivo* lleno con distintas disoluciones acuosas de etanol (EtOH) y glicerol (Glyc) de diversas concentraciones volumétricas (Fig. 4.1a). La densidad de estas disoluciones es bien conocida^{6,7}, por lo que se puede medir la responsividad en densidad de los dispositivos fabricados ajustando los datos de cambio en frecuencia frente al cambio en densidad, obteniendo un valor de 0.176 mL/g (Fig 4.1b). Combinando este valor de la responsividad con el mínimo cambio en frecuencia detectable (1.3×10^{-7} para este dispositivo, véase epígrafe 3.3. para la definición de mínimo cambio en frecuencia detectable) se obtiene una resolución de 0.7 $\mu\text{g/mL}$, lo que demuestra la utilidad de estos dispositivos como sensores de densidad. Los dispositivos aquí empleados presentan un límite en detección de densidad en el mismo orden de magnitud que los densímetros comerciales más avanzados¹⁵ con la ventaja adicional de que el volumen de muestra necesario es 6 órdenes de magnitud inferior.

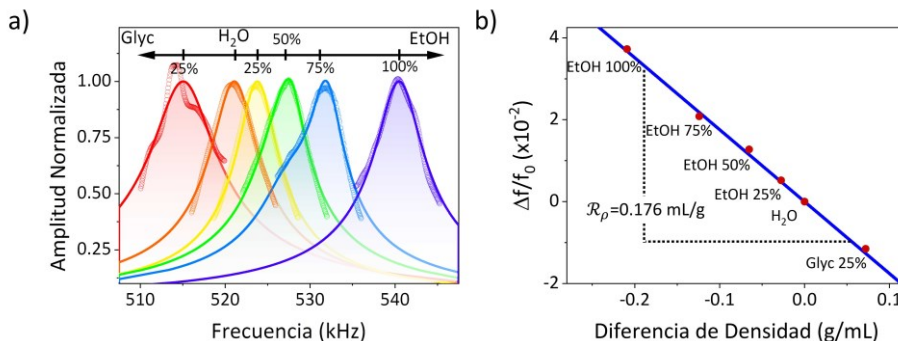


Figura 4.1.: Medida de la densidad de disoluciones. a) Espectros mecánicos medidos para un mismo dispositivo lleno con distintas disoluciones acuosas (los círculos huecos representan los puntos experimentales) y sus ajustes a una función lorentziana (líneas sólidas). b) Cambio en frecuencia medido experimentalmente frente a cambio en densidad para las distintas disoluciones medidas y su ajuste a una recta.

Estos dispositivos también pueden emplearse para medir densidad de gases. Sin embargo, como la responsividad depende tanto de las dimensiones del dispositivo como de la densidad del fluido (Ec. 4.3), en gases la responsividad tendrá un valor de 0.280 mL/g. Este valor se ha obtenido a través de la expresión analítica (Ec. 4.3) para un valor de $\rho_0 \cdot 10^{-3} \text{ g/mL}$ (valor de la densidad del aire en condiciones normales de presión y temperatura).

Calibración en masa

La medida experimental de la responsividad en densidad también permite medir la masa del resonador (m_0): un dato que, como se verá más adelante, es

* Las medidas mostradas en este capítulo fueron tomadas usando un dispositivo de con un diámetro externo de 30 μm y una longitud suspendida de 500 μm

necesario para poder medir la masa de partículas y células que fluyen dentro del canal (capítulos 5, 6 y 7). Para poder relacionar la masa del resonador con la responsividad en densidad, es necesario redefinir este parámetro considerando el cambio en densidad como un cambio en masa. De esta manera, a partir de la aproximación del oscilador armónico, podemos definir el cambio relativo en frecuencia del resonador como menos un medio del cambio relativo en masa ($\Delta\rho V_{in}/m_0$, siendo V_{in} el volumen del microcanal suspendido)¹⁸. Esta aproximación describe una respuesta lineal de la frecuencia de resonancia con la densidad, lo que permite obtener un valor de la responsividad que depende de la masa del resonador (Ec. 4.4). Nótese que esta expresión de la responsividad es completamente equivalente a la propuesta en la Ec. 4.3.

$$\mathcal{R}_\rho = -\frac{1}{2} \frac{V_{in}}{m_0} \quad (4.4)$$

Utilizando el valor del volumen del microcanal obtenido mediante la medida de las dimensiones de la zona suspendida a través de microscopía óptica (208 pL) y el valor de la responsividad en densidad medido experimentalmente, se obtiene que el resonador (lleno de agua ultra-pura) tiene una masa de 590 ng. Este valor es un 12% mayor que el valor que se obtiene calculando la masa del resonador utilizando los valores nominales del agua y la sílice. Esta diferencia puede deberse a que el proceso de elongación térmica de los capilares puede causar pequeños cambios en la densidad de la sílice con respecto a su valor nominal. Además, los anclajes poliméricos empleados pueden provocar que el resonador presente una longitud efectiva mayor que la longitud suspendida (definida por la litografía óptica). Por estas razones, resulta más acertado obtener la masa del resonador mediante la medida de la responsividad (masa efectiva) que calcularla mediante las dimensiones medidas y los valores nominales de las densidades. Al aplicar este tipo de calibración se obtiene que los resonadores empleados en esta tesis presentan masas efectivas entre los 3 μg y los 500 ng, dependiendo de sus dimensiones.

4.2. Medida de la concentración en tiempo real

Como se ha comentado anteriormente, la densidad es un indicador indirecto de la composición química en disoluciones. En el caso de las disoluciones acuosas binarias de alcoholes, la dependencia entre densidad y concentración ha sido ampliamente estudiada y se han desarrollado múltiples modelos en trabajos anteriores para describir este fenómeno^{6,7}. Por lo tanto, los cambios en densidad, medidos en tiempo real con los dispositivos desarrollados a través

de los cambios en la frecuencia de resonancia, podrán relacionarse con cambios en la concentración de las disoluciones aplicando estos modelos.

Para medir cambios continuos en la concentración se sigue el cambio en la frecuencia de resonancia en tiempo real mientras se cambia la disolución de la zona suspendida[†]. Para ello, inicialmente se llena el dispositivo con agua ultra-pura y se cambia el reservorio con agua del sistema de bombeo por uno que contiene una disolución (glicerol 50%) que se bombea, con un flujo constante de $\sim 5 \mu\text{L/s}$. Al medir en estas condiciones se obtiene que la frecuencia y, por tanto, la densidad, se mantienen inicialmente constantes durante un tiempo hasta que empiezan a variar. Finalmente, la densidad alcanza un valor constante que se corresponde con el valor de la densidad de la disolución (Fig. 4.2a).

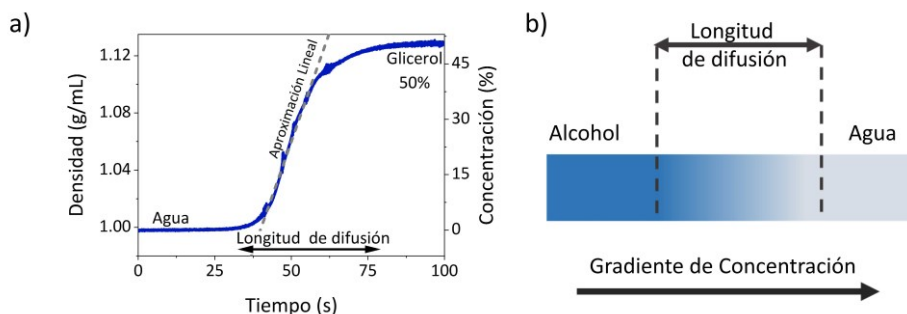


Figura 4.2.: Medida de la Concentración en tiempo real. **a)** Medida en tiempo real de la densidad (eje izquierdo) en función del tiempo durante el cambio entre agua ultra-pura y una disolución acuosa de glicerol al 50%. La densidad se puede relacionar con la concentración de glicerol (eje derecho). **b)** Modelo unidimensional de difusión entre dos reservorios (infinitos) de distintos fluidos. La barra de color representa el valor de la concentración siendo el gris 0% (agua ultra-pura) y azul el valor máximo.

Se observa que la variación entre estos dos valores de la frecuencia de resonancia, correspondientes a cada una de las disoluciones, se produce de manera continua, transcurriendo un tiempo de ~ 30 s. Sin embargo, dado el caudal empleado, se esperaría que el cambio entre los dos líquidos se produjera de manera mucho más rápida ($\sim 50 \mu\text{s}$). Esta diferencia se debe a que estos líquidos son miscibles por lo que, tan pronto como se pongan en contacto se producirá la difusión de un líquido en el otro, creando una zona en la que la concentración de la disolución cambia de manera lineal entre 0% y el valor inicial de la disolución (longitud de difusión, Fig. 4.2b). Dadas las condiciones de flujo laminar, esta longitud de difusión no se verá afectada por el flujo, lo que permitirá conseguir un cambio continuo en la concentración en

[†] En este caso la frecuencia se sigue utilizando una configuración de lazo cerrado dado que el cambio en frecuencia es grande ($\sim 1\text{-}20$ kHz) y, además, el factor de calidad cambia de manera significativa.

la zona suspendida. Aplicando los modelos de densidad y concentración recogidos en la literatura⁶, se relaciona cada valor de la densidad medido con un valor en concentración, con lo que se obtiene que la concentración cambia linealmente entre los valores inicial y final (Fig. 4.2a). De esta manera se aprecia que el gradiente de concentración a lo largo de la longitud de difusión es constante, lo que está de acuerdo con el caso estacionario de difusión en un sistema unidimensional entre dos reservorios infinitos.

4.3. Medida del índice de refracción

Como se mostró previamente (capítulo 3), ópticamente los dispositivos fabricados se comportan como una cavidad multicapa formada por sílice/líquido/sílice/aire/silicio. La reflectividad de esta cavidad varía en función del índice de refracción del líquido, lo que abre la puerta a utilizar estos dispositivos para medir también cambios en el índice de refracción a través de los cambios de la potencia óptica reflejada por el dispositivo.

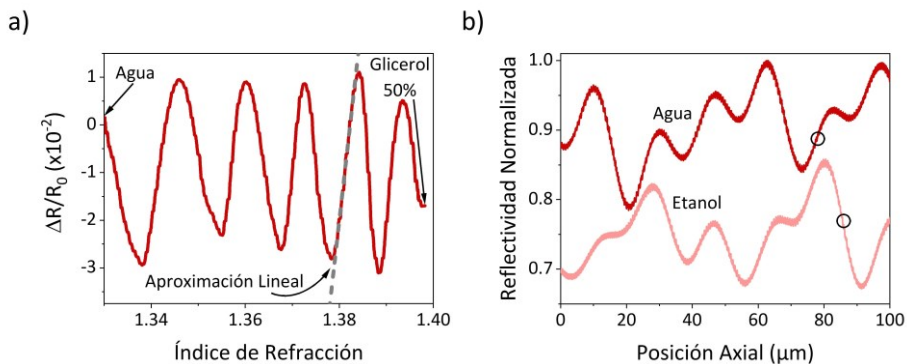


Figura 4.3.: Medida de la reflectividad del dispositivo en función del índice de refracción. a) Medida del cambio en reflectividad normalizado en función del índice de refracción en la región de difusión (línea continua roja) durante el cambio entre agua ultra-pura y una disolución acuosa de glicerol 50%, y su ajuste lineal en un tramo (línea gris discontinua). **b)** Reflectividad del dispositivo en función de la posición axial del spot en la dirección axial para el mismo dispositivo lleno con agua ultra-pura, línea continua oscura ($n=1.3315$), y lleno de etanol 100%, línea continua clara ($n=1.3605$). Los círculos indican posiciones que maximizan la sensibilidad en índice de refracción para cada líquido.

Para comprobar y calibrar esta respuesta al cambio de índice de refracción se miden simultáneamente la potencia reflejada por el resonador (señal óptica) y la frecuencia de resonancia (señal mecánica) en un punto fijo mientras se varía de manera continua el índice de refracción del líquido contenido en el microcanal. Para conseguir este cambio continuo y controlado en el índice de refracción se aprovecha el fenómeno de la difusión que aparece al cambiar el líquido del microcanal, descrito anteriormente (epígrafe 4.2). De nuevo, el

cambio del índice de refracción en disoluciones acuosas binarias de alcoholes en función de la concentración ha sido ampliamente caracterizado en diversos trabajos, demostrando que varía de forma continua entre el índice de refracción del agua y el del alcohol puro⁶. De esta manera, la medida de la señal mecánica permite conocer en tiempo real la concentración de la disolución (epígrafe 4.2) y utilizar este valor de concentración para relacionar los cambios en la señal óptica con cambios en índice de refracción.

La reflectividad normalizada ($\Delta R/R_0$, siendo R_0 la reflectividad del dispositivo lleno con agua ultra-pura) cambia con el índice de refracción siguiendo una función sinusoidal, como cabría esperar en una cavidad multicapa (Fig. 4.3a). Esta técnica permite una sensibilidad al cambio en índice de refracción $\left| \frac{\Delta R}{R_0 \Delta n} \right| = 8.7$ en las zonas de máxima pendiente, lo que, combinado con el mínimo cambio detectable en reflectividad (5×10^{-4}) se traduce en un mínimo cambio detectable en índice de refracción de 6×10^{-5} . Si todas las capas de la cavidad tuvieran un espesor constante los dispositivos serían insensibles a cambios en ciertos intervalos del índice de refracción. Sin embargo, dado que el espesor de las capas varía a lo largo de la dirección axial (epígrafe 3.2), se puede encontrar la configuración que maximiza la sensibilidad desplazando la posición del spot del láser en la dirección axial (Fig. 4.3b).

4.4. Efectos de la presión en la frecuencia de resonancia

Hasta el momento se ha considerado que un cierto fluido presenta una densidad constante (solo determinada por su composición química), sin embargo, esta premisa solo es válida en condiciones de presión y temperatura constantes. El sistema de bombeo utilizado en esta tesis, permite aplicar compresiones hidrostáticas en el rango ~ 1 bar, lo que es suficiente para producir cambios de densidad del orden de ~ 10 $\mu\text{g/mL}$ en líquidos y de ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ en gases. Dada la resolución de los sensores desarrollados (epígrafe 4.1.), estos cambios en la densidad estarían dentro del rango de densidades medibles. Sin embargo, en trabajos previos¹⁹ se ha demostrado que al comprimir hidrostáticamente el fluido que se encuentra en el interior de un SMR, su frecuencia de resonancia también puede variar debido a distintos efectos mecánicos como consecuencia de la presión aplicada. A continuación, se estudian diferentes efectos que provocan un cambio en la frecuencia de resonancia cuando la presión hidrostática en el canal interno varía.

Efecto de la compresión hidrostática en la frecuencia de resonancia: modelo teórico

Cuando el dispositivo está lleno con un fluido y se le aplica una compresión hidrostática, la frecuencia de resonancia responde siguiendo de manera inmediata los cambios de presión (Fig. 4.4a). Por lo tanto, se puede definir una responsividad en presión hidrostática ($\mathcal{R}_{ph} = \partial(f/f_0)/\partial p_h$). Al medir esta responsividad para el dispositivo lleno de nitrógeno se obtiene un valor de -2.7 GPa^{-1} (Fig. 4.4a). El signo negativo está de acuerdo con los cambios en densidad inducidos por la compresibilidad de los fluidos, sin embargo, la magnitud de esta responsividad es mayor de lo que cabría esperar (-2 GPa^{-1}). La diferencia se debe a que los cambios en la frecuencia de resonancia causados por la aplicación de una presión hidrostática son el resultado de la superposición de dos tipos de efectos: rigidez (determinados por las características del dispositivo) y de masa (que dependerán de las propiedades de cada fluido).

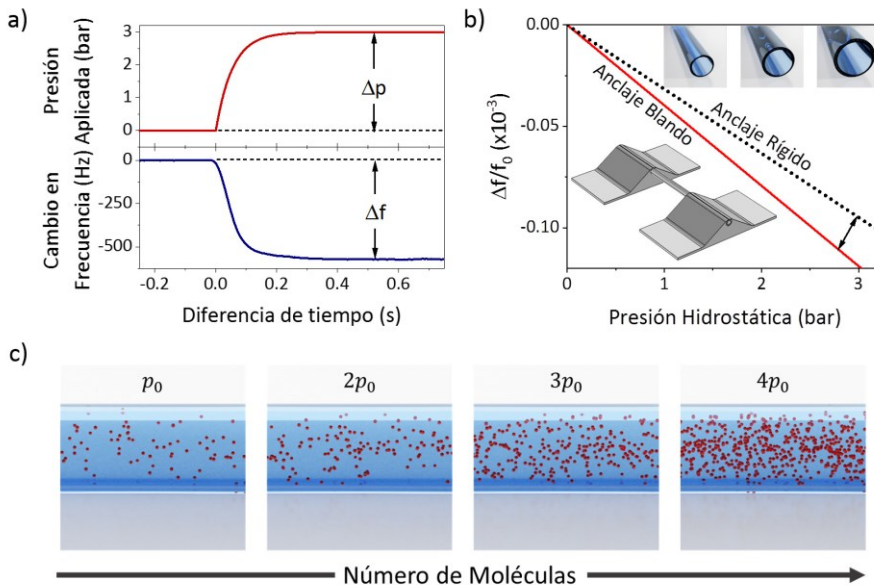


Figura 4.4. Efecto de la presión hidrostática sobre la frecuencia de resonancia. **a)** Presión aplicada (arriba) y frecuencia de resonancia (abajo) en función del tiempo, medidas experimentalmente con un dispositivo lleno de nitrógeno. **b)** Simulación de elementos finitos. Cambio relativo en frecuencia en función de la presión calculado para las condiciones de anclaje rígido (línea discontinua negra) y anclaje blando (línea continua roja). **Detalle superior.** Variación del radio en función de la presión hidrostática (no a escala). **Detalle inferior.** Geometría empleada en las simulaciones de elementos finitos. **c)** Representación esquemática del número de moléculas de fluido presentes en un cierto volumen del resonador en función de la presión (no a escala).

Por su parte, los efectos de rigidez, se dividen en tres contribuciones: término de momento de inercia, término de carga hidrostática y término de anclaje. El efecto del cambio de momento de inercia tiene su origen en que la compresión

hidrostática produce la variación del radio interno del microcanal (Fig. 4.4b, detalle superior) a razón de $\Delta R_{in} = \frac{R_{in}}{K} \Delta p_h$, siendo K el módulo de compresión hidrostática (Ec. 1.28 y 1.29). La expresión de la frecuencia de resonancia en función de este término se puede obtener sustituyendo este nuevo valor del radio en la ecuación 4.1. Sin embargo, como estas variaciones en el radio son muy pequeñas ($\sim 1 \text{ \AA}$) se puede hacer una aproximación lineal del cambio en frecuencia (Ec. 4.5.). Dadas las características del resonador empleado en este capítulo ($K=37 \text{ GPa}$), este término, producirá una contribución a la responsividad en presión hidrodinámica de 0.03 GPa^{-1} .

$$\left(\frac{\Delta f}{f_0}\right)_{momento} = \frac{\Delta p_h}{K} \quad (4.5)$$

Asimismo, la presión hidrostática ejercerá una fuerza igual en todos los puntos del canal (efecto de carga hidrostática), en trabajos anteriores se ha demostrado que este efecto es directamente proporcional al área del microcanal y a la presión aplicada (Ec. 4.6)¹⁹. Dadas las dimensiones del resonador utilizado en este capítulo, la contribución a la responsividad causada por el término de carga será de -0.28 GPa^{-1} .

$$\left(\frac{\Delta f}{f_0}\right)_{carga} = -\frac{S_i}{2P_E} \Delta p_h \quad (4.6)$$

Siendo S_i el área de la sección transversal del canal y P_E la carga crítica de pandeo de Euler.

Los dos términos anteriores han sido estudiados en trabajos previos en la literatura con resonadores basados en nitruro de silicio¹⁹, sin embargo, la deformación de los anclajes poliméricos de los dispositivos aquí mostrados también pueden contribuir a la responsividad en presión como consecuencia de la pequeña deformación que sufren durante la oscilación del capilar. Para comprobar esto, se realizan simulaciones por el método de elementos finitos (FEM, Comsol Multiphysics, módulo de mecánica estructural). Se ha simulado un tubo de vidrio suspendido y rodeado en sus extremos por unas paredes de SU-8 imitando las condiciones experimentales (Fig. 4.4b, detalle inferior). Sobre las paredes internas del tubo se aplica una presión, imitando el efecto de la presión hidrostática, obteniendo el valor de la frecuencia de resonancia. En primer lugar, se realiza esta simulación constriñendo el movimiento en las paredes poliméricas (anclaje rígido), con lo que se obtiene una respuesta lineal a la presión con una responsividad de -0.317 GPa^{-1} (Fig. 4.4b, línea negra punteada). Este valor se encuentra en perfecto acuerdo con los términos de carga hidrodinámica y momento de inercia recogidos en el modelo analítico

anterior, lo que corrobora la validez del mismo. Sin embargo, cuando en la simulación se dejan libres los anclajes poliméricos (anclaje blando) se obtiene también una respuesta lineal, pero con una pendiente de -0.396 GPa^{-1} (Fig. 4.4b, línea roja). Esta diferencia en la pendiente entre las simulaciones del anclaje rígido y el anclaje blando se puede atribuir a que la presión produce una pequeña deformación en el anclaje polimérico. De esta manera se puede definir la contribución a la responsividad de la no-idealidad del anclaje como la diferencia entre la pendiente obtenida para el anclaje blando y la obtenida para el anclaje rígido ($\mathcal{R}_{anclaje} = -0.079 \text{ GPa}^{-1}$).

En cuanto a los efectos de masa, se pueden separar en dos contribuciones: expansión y compresibilidad. Como ya se ha visto por el término de momento de inercia, la compresión hidrostática produce la expansión radial del tubo, lo que causará que el volumen de este aumente. Esta diferencia de volumen se llenará con más fluido, aumentando la masa de la región suspendida y produciendo consecuentemente un cambio en frecuencia (Ec. 4.7.). Dadas las características del dispositivo, este término debería producir una responsividad de -0.005 GPa^{-1} para líquidos y de $-1 \times 10^{-5} \text{ GPa}^{-1}$ en gases.

$$\left(\frac{\Delta f}{f_0}\right)_{\text{expansion}} = -\frac{\mathcal{R}_\rho \rho_0}{K} \Delta p_h \quad (4.7)$$

Por último, la compresión hidrostática producirá que en un cierto volumen quepan más moléculas (Fig. 4.4c), produciendo un aumento de la densidad y, por tanto, una disminución de la frecuencia de resonancia. Los cambios en densidad en un fluido se relacionan con la presión a través del factor de compresibilidad (β)⁵ como $\Delta \rho = \rho_0 \beta \Delta p_h$. Dadas las características del resonador empleado, la responsividad debida a este efecto será $\sim -0.3 \text{ GPa}^{-1}$ en líquidos y $\sim -1 \text{ GPa}^{-1}$ para gases.

$$\left(\frac{\Delta f}{f_0}\right)_{\text{compresibilidad}} = -\mathcal{R}_\rho \rho_0 \beta \Delta p_h \quad (4.8)$$

La responsividad en presión esperada resultará de la superposición de los cinco términos anteriormente mencionados (Ec. 4.9.).

$$\mathcal{R}_{ph} = \frac{1}{K} - \frac{A_i}{2P_E} + \mathcal{R}_{anclaje} - \frac{\mathcal{R}_\rho \rho_0}{K} - \mathcal{R}_\rho \rho_0 \beta \quad (4.9)$$

Con esta expresión analítica se obtiene que el resonador empleado debe presentar una responsividad en presión de -2.6 GPa^{-1} para el dispositivo lleno de nitrógeno, lo que concuerda con los datos obtenidos experimentalmente, -2.7 GPa^{-1} (Fig. 4.4a). Téngase en cuenta que, mientras que los términos de

rigidez solo dependen del diseño del dispositivo, los términos de masa dependen de las propiedades de los fluidos como la densidad y la compresibilidad, lo que abre la puerta a una nueva fuente de información de los mismos.

Compresión hidrostática de gases: medida de la masa molecular

Para comprobar la validez del modelo propuesto se miden los cambios en frecuencia al aplicar compresiones hidrostáticas en el dispositivo lleno de distintos gases manteniendo constante la temperatura del laboratorio 295±1 K. Para todos los gases se observa que el cambio en la frecuencia de resonancia medido presenta una tendencia lineal descendente (Fig. 4.5a), como se esperaba por el modelo teórico desarrollado en el apartado anterior.

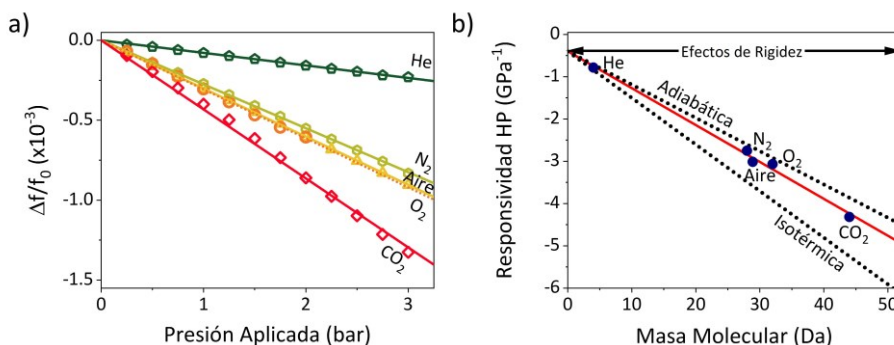


Figura 4.5.: Medida de la compresibilidad en gases. a) Cambio relativo en frecuencia en función de la presión hidrostática medido para helio (pentágonos), nitrógeno (hexágonos), aire (triángulos), oxígeno (círculos) y dióxido de carbono (diamantes) y el ajuste de estos datos a una recta (líneas sólidas y línea punteada para el oxígeno). **b)** Responsividad en presión medida para los distintos gases en función de la masa molecular (puntos) y su ajuste a una recta.

La responsividad en presión hidrostática para los distintos gases se obtiene como la pendiente al ajustar a una recta los datos de cambio en frecuencia en función de la presión hidrostática. Los valores obtenidos muestran una dependencia lineal con la masa molecular de los gases empleados (Fig. 4.5b), lo que se encuentra en buen acuerdo con un modelo de gas ideal, en el que el parámetro $\rho_0\beta_T$ es directamente proporcional a la masa molecular (Ec. 4.10).

$$\rho_0\beta_T = \frac{m_m}{k_B T} \quad (4.10)$$

Siendo β_T el factor de compresibilidad isotérmico, ρ_0 la densidad del gas (antes de ser comprimido), m_m la masa molecular del gas, k_B la constante de Boltzmann (1.38×10^{-23} J/K) y T la temperatura. El factor de compresibilidad será distinto si el gas se comprime adiabáticamente (β_S), en cuyo caso se puede obtener como $\beta_S = \beta_T/\gamma$. Siendo γ el coeficiente de dilatación adiabática, que se puede tomar como 1.4 para los gases empleados en este trabajo.

Al ajustar a una recta los datos de responsividad en presión en función de la masa molecular[‡], se obtiene una pendiente de $-0.087 \pm 0.004 \text{ GPa}^{-1} \cdot \text{Da}^{-1}$ y una ordenada de origen de $-0.4 \pm 0.1 \text{ GPa}^{-1}$ (Fig. 4.5b, línea roja). El valor de la ordenada de origen se puede entender como el valor al cual tiende la responsividad cuando los efectos de masa se anulan, por lo que este valor será una medida de los efectos de rigidez del dispositivo. Teniendo esto en cuenta, el valor de los términos de rigidez medido experimentalmente está en perfecto acuerdo con los valores calculados a través del modelo teórico. Asimismo, el valor de la pendiente en esta representación se puede atribuir en exclusiva al efecto de la compresibilidad. La pendiente medida experimentalmente se encuentra en un valor intermedio entre el que cabría esperar para una compresión isotérmica, $-0.110 \text{ GPa}^{-1} \cdot \text{Da}^{-1}$, y una compresión adiabática, $-0.079 \text{ GPa}^{-1} \cdot \text{Da}^{-1}$ (Fig. 4.5b, líneas negras punteadas). Idealmente, la compresión del gas debería ser adiabática, este caso intermedio entre la compresión adiabática y la isoterma se puede atribuir a que el microcanal no se encuentra perfectamente aislado.

Teniendo en un cuenta el límite de detección en la señal mecánica (1.3×10^{-7}) se espera que el límite de detección en responsividad en presión hidrostática tenga un valor de $1.3 \cdot 10^{-3} \text{ GPa}^{-1}$, lo que se corresponde con una resolución esperada en la medida de la masa molecular de 0.01 Da. No obstante, para poder aprovechar esta resolución será necesario conseguir un control muy preciso de la temperatura del sistema. Las fluctuaciones en la temperatura del laboratorio ($\pm 1 \text{ K}$) hacen que la compresibilidad de los gases ($\rho_0 \beta_T$) cambie lo que finalmente resulta en variaciones del orden de $\pm 0.01 \text{ GPa}^{-1}$ en la media de la responsividad: un orden de magnitud mayor que este límite de detección. Además, el haz láser puede calentar localmente el dispositivo, lo que puede potenciar estas fluctuaciones en la compresibilidad.

Compresión hidrostática de líquidos

Los experimentos de compresiones hidrostática se repiten con disoluciones acuosas de etanol de distintas concentraciones. De esta manera, se consiguen distintas compresibilidades. Al aplicar las compresiones hidrostáticas se obtiene de nuevo que la frecuencia de resonancia disminuye siguiendo una tendencia lineal con el valor de la presión. Como es sabido por los experimentos de la compresión hidrostática de gases, estas compresiones resultan de un caso

[‡] Para los casos de mezclas de gases, como el aire, el valor de la masa molecular se obtiene como el valor medio de la masa molecular de los distintos gases ponderado a la concentración de cada gas.

intermedio entre la compresión isotérmica y la adiabática, por lo que el valor de la compresibilidad elegido para representar se tomará como el valor medio de la compresibilidad isotérmica y adiabática tabulado de cada disolución^{5,20}. Al igual que en el caso de los gases, el cambio en frecuencia de resonancia decrece de manera lineal con la presión hidrostática, siendo la pendiente distinta para cada disolución (Fig. 4.6a).

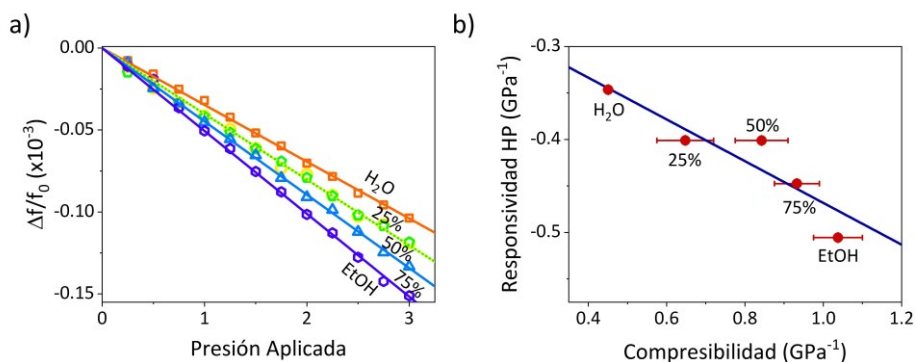


Figura 4.6.: Medida de la compresibilidad en líquidos. a) Cambio relativo en frecuencia en función de la presión hidrostática medido para las disoluciones acuosas de etanol de distintas concentraciones 0% (agua, cuadrados), 25% (círculos), 50% (pentágonos), 75% (triángulos) y 100% (EtOH, hexágonos) y el ajuste de estos datos a una recta (líneas sólidas y línea punteada para EtOH 25%). **b)** Responsividad en presión medida para las distintas disoluciones en función de la compresibilidad (círculos) y su ajuste a una recta.

Cuando se calcula la responsividad en presión y se representa en función de la compresibilidad se obtiene nuevamente una tendencia lineal con la compresibilidad del fluido. Al ajustar estos datos a una recta se obtiene una pendiente de -0.22 ± 0.04 . Este valor de la pendiente se corresponde con el modelo teórico (-0.17), sin embargo, los datos presentan una gran dispersión. Tal dispersión podría atribuirse a que cada disolución tiene una conductividad térmica diferente, lo que puede resultar en que el proceso de compresión sea más próximo al caso adiabático o al isoterma dependiendo de la disolución.

4.5. Conclusiones

En este capítulo se ha propuesto y demostrado experimentalmente el uso de los dispositivos fabricados como sensores de distintas propiedades físicas en fluidos. Estos dispositivos permiten medir de manera simultánea la densidad y el índice de refracción del fluido. Como sensores de densidad, estos dispositivos presentan una resolución en densidad de $0.7 \mu\text{g/mL}$, un valor comparable al de los densímetros comerciales más avanzados¹⁵, presentando la ventaja añadida de que el volumen de la muestra requerida es de $\sim 100 \text{ pL}$

(frente a 1 mL en sus homólogos comerciales). Además, se ha demostrado que la responsividad en densidad de estos dispositivos depende únicamente de la relación entre los diámetros interno y externo del capilar (λ), maximizándose cuando este valor tiende a 1. En los dispositivos fabricados se tiene $\lambda=0.75$, aunque para el proceso de fabricación descrito este factor está determinado desde el inicio de la fabricación, siendo igual tanto en la zona elongada como en la zona sin estirar. Una forma de poder aumentar este factor podría ser mediante el ataque químico del capilar de vidrio estirado con una disolución acuosa de ácido fluorhídrico. Tanto el sustrato de silicio como los anclajes de resina SU-8 son compatibles con un ataque con ácido fluorhídrico, por lo que este paso se podría implementar de manera sencilla y directa al final de todo el proceso de fabricación descrito en el capítulo 2.

Utilizados como sensores ópticos, los dispositivos fabricados exhiben una resolución en índice de refracción del orden de $\sim 10^{-5}$, también comparable al estado actual de la técnica. Cabe destacar que, aunque el diámetro no constante del capilar podría parecer un efecto indeseable debido a las limitaciones del proceso de fabricación, este grosor variable de las multicapas hace a esta técnica muy versátil. El perfil ligeramente hiperbólico de los dispositivos permite maximizar la sensibilidad para cualquier índice de refracción y cualquier longitud de onda simplemente desplazando la posición del spot. Por otra parte, la medida simultánea de densidad e índice de refracción abre la puerta a un análisis más rápido y preciso entre distintos líquidos. La densidad por sí sola no permite la distinción unívoca entre distintos líquidos. Por ejemplo, metanol y etanol presentan densidades muy similares (0.792 g/mL y 0.789 g/mL, respectivamente), por lo que, las disoluciones acuosas de ambos alcoholes van a encontrarse en el mismo rango de densidades: haciendo prácticamente imposible la distinción entre un tipo de disolución u otra. Sin embargo, presentan índices de refracción muy distintos: mientras que el índice de refracción en el metanol es inferior al del agua (1.326), el del etanol es mayor que el del agua (1.360), por lo que se podrá distinguir entre la disolución de un tipo de alcohol u otro con la información del índice de refracción. Para otras sustancias se puede producir el efecto contrario: que se pueda distinguir entre disoluciones de distintos solutos en densidad, pero no en índice de refracción. En definitiva, esta detección mecano-óptica simultánea permitirá distinguir entre distintos tipos de disoluciones y estimar su concentración al combinar los datos de densidad con los de índice de refracción.

Por otra parte, también se ha mostrado que la frecuencia de resonancia de los dispositivos desarrollados en esta tesis es sensible a cambios en la presión

hidrostática del fluido, lo que se ha demostrado tanto con el desarrollo de un modelo analítico como a través de medidas experimentales. Se ha demostrado que esta respuesta en frecuencia tiene su origen tanto en efectos de rigidez del resonador, que habían sido estudiados previamente en la literatura, como en la compresibilidad del fluido, que han sido estudiados por primera vez en esta tesis. Esta responsividad en presión permite utilizar los dispositivos no solo como sensores de presión sino también como sensores de compresibilidad de fluidos. Además, como en los gases la compresibilidad es directamente proporcional a la masa molecular, estos dispositivos también pueden utilizarse para distinguir entre mezclas de gases idealmente con una resolución en masa molecular de 0.01 unidades de masa atómica.

Bibliografía

- 1 Hulanicki, A., Geab, S. & Ingman, F. CHEMICAL SENSORS DEFINITIONS AND CLASSIFICATION. *Pure & Applied Chemistry* **63**, 1247-1250, doi:<http://dx.doi.org/10.1351/pac199163091247> (1991).
- 2 Bhakta, H. C., Choday, V. K. & Grover, W. H. Musical Instruments As Sensors. *ACS Omega* **3**, 11026-11032, doi:10.1021/acsomega.8b01673 (2018).
- 3 Malvar, O. *et al.* Highly sensitive measurement of liquid density in air using suspended microcapillary resonators. *Sensors (Basel)* **15**, 7650-7657, doi:10.3390/s150407650 (2015).
- 4 Khan, M. F. *et al.* Online measurement of mass density and viscosity of pL fluid samples with suspended microchannel resonator. *Sensors and Actuators B: Chemical* **185**, 456-461, doi:<https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.04.095> (2013).
- 5 Onori, G. Adiabatic compressibility and structure of aqueous solutions of ethyl alcohol. *The Journal of Chemical Physics* **89**, 4325-4332, doi:10.1063/1.454816 (1988).
- 6 Herráez, J. V. & Belda, R. Refractive Indices, Densities and Excess Molar Volumes of Monoalcohols + Water. *Journal of Solution Chemistry* **35**, 1315-1328, doi:10.1007/s10953-006-9059-4 (2006).
- 7 Volk, A. & Kähler, C. J. Density model for aqueous glycerol solutions. *Experiments in Fluids* **59**, 75, doi:10.1007/s00348-018-2527-y (2018).
- 8 Boyd, C. E. *Water Quality: An Introduction*. (Springer International Publishing, 2019).

- 9 Moser, B. R. Efficacy of specific gravity as a tool for prediction of biodiesel–petroleum diesel blend ratio. *Fuel* **99**, 254-261, doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2012.04.050> (2012).
- 10 Kalogianni, E. P., Karapantsios, T. D. & Miller, R. Effect of repeated frying on the viscosity, density and dynamic interfacial tension of palm and olive oil. *Journal of Food Engineering* **105**, 169-179, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.02.021> (2011).
- 11 Pradella, M., Dorizzi, R. M., Rigolin, F. & Statland, B. E. Relative Density of Urine: Methods and Clinical Significance. *CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **26**, 195-242, doi:10.3109/10408368809105890 (1988).
- 12 Kenner, T. The measurement of blood density and its meaning. *Basic Research in Cardiology* **84**, 111-124, doi:10.1007/BF01907921 (1989).
- 13 Kratky, O., Leopold, H. & Stabinger, H. Device for density determination. USA patent (1970).
- 14 Langdon, R. M. Resonator sensors-a review. *Journal of Physics E: Scientific Instruments* **18**, 103-115, doi:10.1088/0022-3735/18/2/002 (1985).
- 15 *Density meter: DMA 5000 M*, <<https://www.anton-paar.com/corp-en/products/details/density-meter-dmatm-5000-m/>> (2020).
- 16 Pastina, A. D., Maillard, D. & Villanueva, L. G. Fabrication of suspended microchannel resonators with integrated piezoelectric transduction. *Microelectron. Eng.* **192**, 83-87, doi:10.1016/j.mee.2018.02.011 (2018).
- 17 Khan, M. F., Knowles, B., Dennison, C. R., Ghoraishi, M. S. & Thundat, T. Pressure modulated changes in resonance frequency of microchannel string resonators. **105**, 013507, doi:10.1063/1.4889744 (2014).
- 18 Tamayo, J., Kosaka, P. M., Ruz, J. J., San Paulo, Á. & Calleja, M. Biosensors based on nanomechanical systems. *Chemical Society Reviews* **42**, 1287-1311, doi:10.1039/C2CS35293A (2013).
- 19 Khan, M. F., Knowles, B., Dennison, C. R., Ghoraishi, M. S. & Thundat, T. Pressure modulated changes in resonance frequency of microchannel string resonators. *Applied Physics Letters* **105**, 013507, doi:10.1063/1.4889744 (2014).
- 20 Kumar, S., Sarkar, S. & Bagchi, B. Microscopic origin of breakdown of Stokes–Einstein relation in binary mixtures: Inherent structure analysis. *The Journal of Chemical Physics* **152**, 164507, doi:10.1063/5.0004725 (2020).

Capítulo 5:

DetECCIÓN MECANO-ÓPTICA DE PARTICULAS

La detección, análisis y caracterización de partículas de dimensiones micro y nanoscópicas suspendidas en medios líquidos (coloides) es un tema que atrae el interés de campos muy diversos (micro y nanofabricación, control medioambiental, industria farmacéutica, medicina, etc.). En el ámbito de la micro y nanofabricación, existen varias técnicas en las cuales las micro/nanoestructuras se sintetizan dentro de medios líquidos como es el caso del método hidrotermal¹ o las emulsiones², por lo que resulta muy conveniente disponer de métodos que permitan la caracterización de las partículas fabricadas sin retirar el medio líquido que las contiene. Asimismo, la caracterización de micro y nanoestructuras en suspensión resulta de gran interés para el control medioambiental. La contaminación por microplásticos, procedentes de la degradación de envases de plástico^{3,4}, supone una grave amenaza para los ecosistemas acuáticos^{5,6} con el riesgo añadido de la introducción de estas sustancias en la alimentación humana^{7,8}. En este caso, los métodos más habituales para la caracterización de este tipo de partículas pasan por una caracterización morfológica mediante técnicas de microscopía electrónica u óptica y una caracterización química mediante técnicas espectroscópicas: espectroscopia infrarroja de transformada Fourier (FTIR, por su acrónimo en inglés «Fourier transform infrared») o espectroscopia Raman⁹. La caracterización de partículas mediante imágenes de microscopía tiene una baja eficiencia y requiere extraer las partículas del medio líquido en el que se encuentran. Además, las técnicas de caracterización química anteriormente citadas no permiten caracterizar partículas individuales, sino que proporcionan datos promediados en poblaciones de partículas.

Para abordar estos problemas, de manera análoga a lo mostrado en el caso de la detección y caracterización de fluidos (capítulo 4), se han propuesto diversas técnicas para la caracterización de partículas individuales en medio acuoso a

través de sus propiedades físicas. Algunas de estas técnicas son el contador Coulter¹⁰ o la dispersión dinámica de la luz¹¹. Ambas técnicas permiten la caracterización de micro y nanopartículas suspendidas en un medio líquido a partir de su tamaño con una gran eficiencia. Sin embargo, a pesar de esta alta eficiencia, es necesario complementarlas con otras técnicas si se quiere diferenciar entre distintos materiales. En este aspecto, los microcanales suspendidos resonantes (SMR) también se han propuesto para la caracterización de este tipo de partículas permitiendo una caracterización de la masa boyante de partículas suspendidas en un medio acuoso con una eficiencia de hasta 6800 partículas por minuto usando un único resonador¹². Además, también se ha demostrado la utilidad de estos sensores mecánicos para la medida de otras propiedades de las partículas como densidad, volumen o rigidez¹³⁻¹⁸. Asimismo, también se han desarrollado resonadores basados en microcapilares de sílice con los que se han conseguido medir distribuciones en masa de partículas con masas boyantes de 10 ng^{19,20}.

En este capítulo se propone el uso de los resonadores microcapilares transparentes (RMT) y el sistema experimental desarrollados en esta tesis para medir de manera simultánea propiedades ópticas y mecánicas de micropartículas, lo que permitirá distinguir entre distintas poblaciones de partículas incluso en casos en los que su distribución en masa boyante sea muy similar.

5.1. Principio de detección mecano-óptica de partículas

En los experimentos realizados en este capítulo se introducen muestras de micropartículas en suspensión acuosa en un dispositivo resonador microcapilar transparente (RMT) fabricado* mientras se miden de manera simultánea la frecuencia de resonancia del primer modo flexural (señal mecánica) y la potencia reflejada (señal óptica) en función del tiempo. Mientras se realiza esta medida mecano-óptica se aplica una diferencia de presión entre los dos reservorios del sistema de bombeo, consiguiendo así un flujo constante de partículas que atraviesan la región suspendida del dispositivo.

Cuando una partícula entra en la zona suspendida del dispositivo produce un cambio en la masa del resonador, lo que, a su vez, producirá un cambio en la

* En su zona suspendida, el dispositivo empleado en este capítulo tiene un diámetro externo de 47 μm , un diámetro interno de 38 μm y una longitud de 500 μm . Al hacer la calibración con disoluciones de densidad conocida se obtiene una masa efectiva (lleno de agua) de 2.4 μg .

frecuencia de resonancia. Debido a que el resonador se encuentra lleno con un fluido incompresible (agua), la partícula desaloja un volumen de líquido igual al volumen de la partícula introducida. De esta manera, el cambio de masa del resonador no será igual al de la partícula, sino a la diferencia entre la masa de esta y la masa del volumen de líquido evacuado (masa boyante, m_b , Ec. 5.1).

$$m_b = \Delta\rho V_{part} = m_{part} \left(1 - \frac{\rho_f}{\rho_{part}} \right) \quad (5.1)$$

Siendo $\Delta\rho$ la diferencia entre la densidad del fluido y la de la partícula (contraste de densidad), V_{part} el volumen de la partícula, m_{part} la masa (inercial) de la partícula, ρ_f la densidad del fluido y ρ_{part} la densidad de la partícula.

Esta masa boyante producirá un cambio en la frecuencia de resonancia ($\Delta f_n/f_{0,n}$), que se puede obtener a partir del modelo del oscilador armónico ($f = 2\pi\sqrt{k/m}$) calculando la masa efectiva (Ec. 1.69). Al considerar la partícula puntual y en una cierta posición (x_0), el cambio de frecuencia toma la forma mostrada en la ecuación 5.2. Como la masa boyante de las partículas es mucho menor que la masa del resonador, se puede hacer una aproximación lineal, obteniendo que el cambio de frecuencia causado por la partícula es directamente proporcional a la masa boyante y al cuadrado de la forma del modo en la posición de la partícula²¹.

$$\frac{\Delta f_n}{f_{0,n}} = \sqrt{\frac{1}{1 + \frac{m_b}{m_0} \psi_n^2(x_0)}} - 1 \approx -\frac{1}{2} \frac{m_b}{m_0} \psi_n^2(x_0) \quad (5.2)$$

Siendo m_0 la masa efectiva del resonador (lleno de agua) obtenida mediante la calibración descrita en el epígrafe 4.1 y ψ_n la forma del modo (Ec. 1.54). Nótese que, aunque en este capítulo solo se mide el modo fundamental de oscilación, este principio de detección es igualmente válido para cualquier otro modo mecánico.

De esta manera, el máximo cambio en la señal mecánica medido será directamente proporcional a la masa boyante de la partícula (curva azul en Fig. 5.1a). Dado que la partícula se mueve con una velocidad constante[†], este valor máximo de cambio en frecuencia causado por el paso de una partícula (y, por tanto, la masa boyante) se obtiene ajustando la señal mecánica (Ec. 5.2)

[†] Véase capítulo 6 para una justificación detallada de por qué las partículas presentan una velocidad constante al atravesar la zona suspendida.

mediante el método de mínimos cuadrados al cuadrado de la forma del modo (Ec. 1.54).

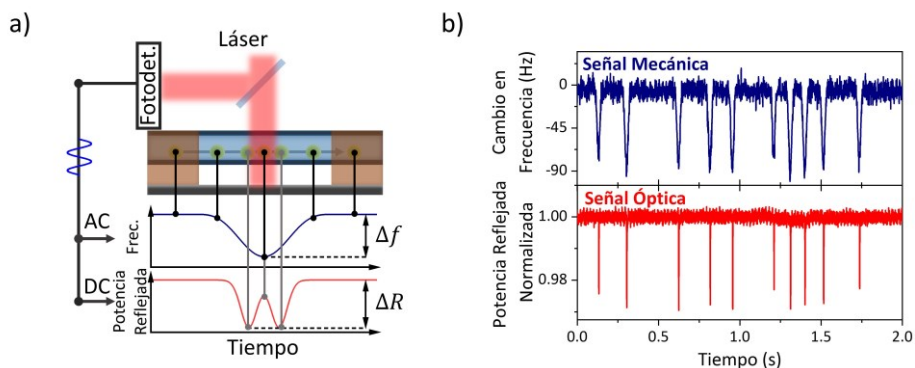


Figura 5.1. Detección de partículas en los dispositivos fabricados. a) Representación esquemática del efecto del paso de una partícula sobre la señal mecánica y la señal óptica (este esquema no representa la proporción entre la longitud suspendida y el tamaño del spot). **b)** Medida en tiempo real de la señal mecánica y óptica mientras pasan micropartículas esféricas de sílice de $8.4 \mu\text{m}$ de diámetro.

El hecho de que las partículas hagan un barrido en la posición del resonador supone una ventaja de los microcanales suspendidos resonantes frente a los resonadores mecánicos no huecos o convencionales (p. ej. puentes o palancas sin un microcanal integrado), donde las partículas quedan adheridas en una posición fija sobre su superficie. De esta manera, mientras que en los resonadores mecánicos convencionales es necesario medir simultáneamente dos modos flexurales para poder separar la contribución de la masa y la posición al cambio en frecuencia^{22,23} (véase epígrafe nanomecánica en introducción), en los SMR solo es necesario medir un único modo flexural para determinar la masa.

Por otra parte, cuando la partícula pasa por la zona iluminada por el haz producirá un cambio en la señal óptica debido a la potencia de luz dispersada (curva roja en la figura 5.1a). Este cambio se puede ajustar, obteniendo el valor de máxima variación en reflectividad, cuya magnitud estará relacionada con el tamaño e índice de refracción de la partícula. Como la zona iluminada se encuentra dentro de la región suspendida y su tamaño es un orden de magnitud menor, la anchura de los eventos medidos en función del tiempo en la señal óptica serán un orden de magnitud menor que la anchura de los eventos en la señal mecánica, tal y como vemos experimentalmente (Fig. 5.1b).

Condiciones de medida óptimas

A priori, para optimizar la medida de la señal mecánica se debería medir esta señal empleando un tiempo de adquisición igual a aquel que minimiza el valor de la varianza de Allan ($\tau \sim 150$ ms, $\sigma_{allan} \sim 10^{-7}$). Sin embargo, como los cambios en frecuencia medidos en este sistema son transitorios (Fig. 5.1b) el anterior criterio no será siempre válido, ya que si las partículas atraviesan la zona suspendida en un tiempo menor al de adquisición resultarán indetectables. Por esta razón es necesario encontrar una relación de compromiso entre un determinado tiempo de adquisición y la velocidad a la que pasan las partículas por la zona suspendida. De esta manera, dado el tamaño de la zona suspendida (500 μm) para poder medir partículas utilizando el tiempo de adquisición que minimiza el valor de la varianza de Allan ($\tau \sim 150$ ms), será necesario que las partículas se muevan con velocidades mucho menores que 0.3 mm/s. Sin embargo, estas velocidades no resultan adecuadas dado que, además de ofrecer una eficiencia de medida muy baja, la premisa de que las partículas se mueven a una velocidad constante deja de ser válida (véase el apartado «Nuevos fenómenos hidrodinámicos» en el capítulo de Perspectivas Futuras) que imposibilitan la medida siguiendo el método anteriormente descrito.

Para conseguir una eficiencia de medida alta y evitar fenómenos hidrodinámicos indeseados se establece como criterio para las medidas realizadas en este capítulo y los siguientes (capítulos 6 y 7) medir la señal mecánica utilizando un tiempo de adquisición de 600 μs , lo que permite detectar partículas con velocidades de hasta 80 mm/s con una resolución en masa ~ 2 pg. Como la velocidad de las partículas depende tanto del caudal aplicado como del tamaño de esta (véase capítulo 6), en los experimentos mostrados en este capítulo se han variado las condiciones de diferencia de presión y resistencia microfluídica para conseguir que cada población de partículas presente una velocidad media en torno a 10 mm/s. Asimismo, como los eventos en la señal óptica ocurren en tiempos característicos más rápidos que en la señal mecánica será necesario adquirir esta señal usando tiempos de adquisición más rápidos. Para que la medida de ambas señales se realice en condiciones comparables, se establece como criterio que la relación entre los tiempos de adquisición de las señales mecánica y óptica sea igual a la relación entre el tamaño del spot (~ 10 μm) y la longitud suspendida, por lo que el tiempo de adquisición en la señal óptica será de 7 μs . Con esta configuración se ha conseguido medir simultáneamente las señales mecánica y óptica con una eficiencia de 300 partículas por minuto (Fig. 5.1b).

Caracterización morfológica de partículas

En el presente capítulo, así como en capítulos posteriores, se van a realizar diversas medidas utilizando poblaciones de micropartículas esféricas de distintos tamaños y materiales (sílice, poliestireno y polimetilmetacrilato). Para poder interpretar los resultados obtenidos es necesario conocer la morfología de las partículas empleadas, para lo cual se toman y analizan imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de las mismas.

Dado que se encuentran en suspensión acuosa, las partículas requieren una preparación previa antes de su inspección en el SEM. Esta preparación consiste en depositar una muestra de las partículas sobre un sustrato conductor (silicio dopado tipo p) y retirar el medio acuoso mediante evaporación. Durante el proceso de evaporación, las partículas precipitan en la superficie del sustrato, lo que permite su inspección en el microscopio.

En el SEM se toman imágenes de las distintas poblaciones de micropartículas (Fig. 5.2a) hasta conseguir una muestra representativa de cada población. Las imágenes de SEM se analizan obteniendo el diámetro de cada partícula encontrada, lo que permite representar las distribuciones de tamaños de cada partícula (Fig. 5.2b).

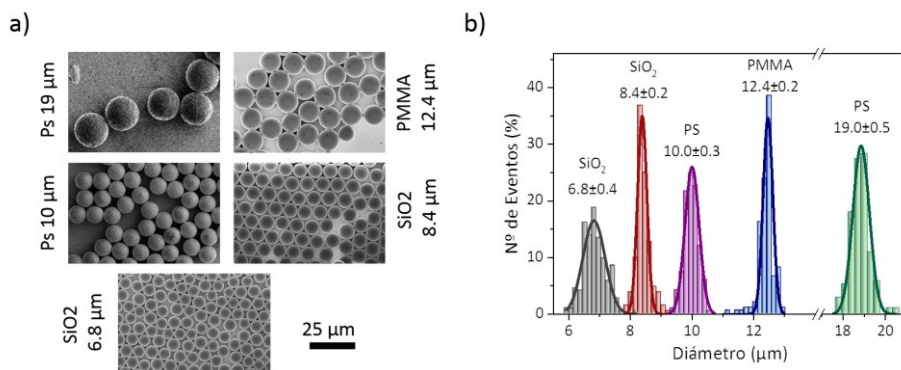


Figura 5.2.: Caracterización morfológica de las partículas. a) Imágenes SEM representativas de cada tipo de partícula. Todas las imágenes tienen la misma magnificación. b) Distribuciones de tamaños obtenidas mediante el análisis de las imágenes SEM para las partículas de sílice (SiO_2) de 6.8 μm (barras grises, $N=224$), sílice de 8.4 μm (barras rojas, $N=212$), poliestireno (PS) de 10 μm (barras moradas, $N=217$), polimetilmetacrilato (PMMA) de 12.4 μm (barras azules, $N=197$) y poliestireno de 19 μm (barras verdes, $N=212$). Las líneas continuas representan los respectivos ajustes a una distribución normal.

La caracterización morfológica de las partículas realizadas mediante SEM y los valores tabulados de los materiales de las partículas, permiten estimar los valores de la masa boyante de estas (Tabla 5.1.).

| Acrónimo | Material | ρ (g/mL) | D (μm) | m_b (pg) | n | $c_{\mu p}$ (mL^{-1}) | Modelo |
|---------------------|---------------------------|------------------|--------------------------|---------------|--------------|-------------------------------------|--|
| SiO ₂ -6 | Sílice | 1.8 | 6.8±0.4 | 132 ± 23 | 1.4570 24 | 10 ⁶ | SiO ₂ -R- 6.5 [‡] |
| SiO ₂ -8 | Sílice | 1.8 | 8.4±0.2 | 248 ± 18 | 1.4570 24 | 10 ⁶ | SiO ₂ -R- 8.5 [‡] |
| PS-10 | Poli- estireno | 1.05 | 10.0±0.3 | 26±2 | 1.5875 25 | 10 ⁵ | PS-700 [§] |
| PMMA | Polimetil- metacrilato | 1.18- 1.26 | 12.4±0.2 | 199 ± 9 | 1.4887 25 | 10 ⁵ | PMMA- R-12.4 [‡] |
| PS-20 | Poli- estireno | 1.05 | 19.0±0.5 | 180 ± 9 | 1.5875 25 | 10 ⁴ | PS-701 [§] |

Tabla 5.1.: Características de las distintas micropartículas empleadas en los experimentos: material, densidad (ρ), diámetro (D), masa boyante (m_b , esperada en agua ultra-pura [$\rho=0.998$ g/mL]), índice de refracción (n , para una longitud de onda de 632.8 nm), concentración de partículas utilizada habitualmente ($c_{\mu p}$) y modelo comercial.

Todas las poblaciones de partículas estudiadas siguen una distribución normal de tamaños. La función de densidad de probabilidad de la masa boyante ($f dp$, que es la distribución que se medirá en los experimentos) se calculará introduciendo dicha distribución de tamaños en la definición de masa boyante ($m_b = \pi \Delta \rho R_{part}^3$, Ec. 5.3).

$$f dp(m_b) = c B (m_b)^{-2/3} e^{-(B (\sqrt[3]{m_b} - \sqrt[3]{m_{b0}})/\sigma)^2} \quad (5.3)$$

Siendo c una constante de normalización, σ la desviación estándar en diámetro, $B = \sqrt[3]{6/(\pi \Delta \rho)}$ y m_{b0} la masa boyante para una partícula de diámetro medio.

5.2. El problema de la masa boyante

Como ya se ha comentado, debido a su principio de funcionamiento, los dispositivos fabricados son sensibles a la masa boyante (Ec. 5.1). La dependencia de la masa boyante con el volumen de la partícula y el contraste de densidad dificulta la distinción entre poblaciones de partículas ya que, partículas de tamaños y densidades muy distintos pueden presentar un mismo valor de masa boyante en un determinado fluido (lo que se conoce como «problema de la masa boyante»). Para ilustrar este problema, se han medido la distribución en masa de dos mezclas de suspensiones acuosas de partículas

[‡] Microparticles GmbH (Alemania)

[§] Microbeads AS (Noruega)

diferentes. En un caso, se mezclan partículas esféricas de sílice con dos diámetros distintos, 6.8 μm y 8.4 μm (tabla 5.1), de tal manera que la proporción entre el número de ambos tipos de partículas en la suspensión acuosa es de 1:1. Como tienen la misma densidad y distinto tamaño, se puede apreciar una doble distribución en su espectro en masa (Fig. 5.3a), encontrándose uno de los máximos para 140 pg (que se corresponde con las micropartículas de 6.8 μm , tabla 5.1.) y el otro para 225 pg (correspondiente a las micropartículas 8.4 μm , tabla 5.1.).

Por otra parte, se mide una mezcla de micropartículas esféricas de sílice (8.4 μm de diámetro) con micropartículas de PMMA (tabla 5.1.), también mezcladas de tal manera que la proporción entre el número de ambas partículas sea 1:1. En este caso, en el espectro en masa no se aprecian dos máximos locales bien resueltos, sino un único máximo para 200 pg (Fig. 5.3b) y un hombro. La forma de esta distribución indica que debe haber dos poblaciones de partículas, lo que se comprueba ajustando a una distribución doble, obteniendo que estas poblaciones tienen unas masas boyantes medias de 200 pg y 225 pg respectivamente; lo que se corresponde con los valores esperados para las partículas de sílice y PMMA (tabla 5.1.). Sin embargo, a pesar de que se puede identificar la presencia de dos poblaciones de partículas no es posible distinguir entre partículas a nivel individual dado a que las distribuciones de masa de ambos tipos de partículas solapan.

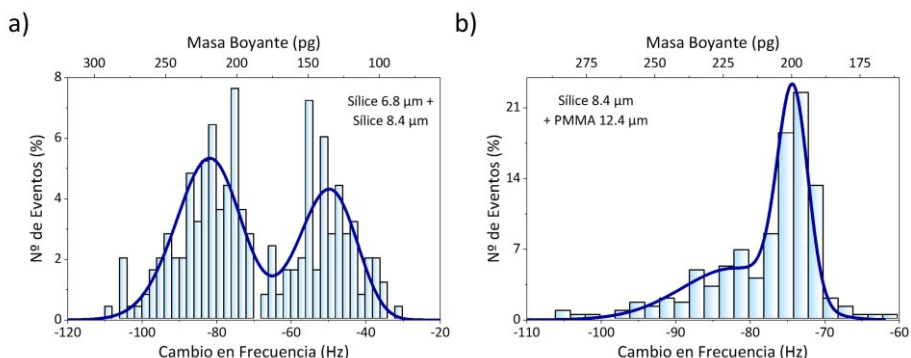


Figura 5.3.: Problema de la masa boyante. a) Distribución en masa boyante medida (barras) para una mezcla de partículas de sílice de distintos tamaños (6.8 μm y 8.4 μm) y su ajuste (línea continua) a la función de densidad de probabilidad de la masa boyante (Ec. 5.2). **b)** Distribución en masa boyante medida (barras) para una mezcla de partículas de sílice de 8.4 μm y PMMA 12.4 μm y su ajuste (línea continua) a función de densidad de probabilidad de la masa boyante (Ec. 5.3).

Este problema ha sido resuelto en trabajos anteriores mediante la medida de la masa boyante de cada partícula dos veces en dos fluidos de distintas densidades. De esta manera, se puede obtener la masa inercial total de la

partícula, su densidad y su volumen^{16,17}. No obstante, esta aproximación requiere la implementación de un sistema hidráulico más complejo y una mayor complicación en el proceso de fabricación de los dispositivos. Además, al tener que medir dos veces cada partícula, la eficiencia de la medida se reduce de manera drástica. Por otra parte, esta aproximación resulta poco versátil de cara a aplicaciones biológicas ya que los dos fluidos empleados deben tener unas propiedades adecuadas al tipo de entidad biológica que se quiera estudiar: si uno de los fluidos no tiene la tonicidad o el pH adecuados, pueden provocar cambios en propiedades como el volumen o la densidad de algunas entidades biológicas como células²⁶, pudiendo en algunos casos producir incluso la destrucción de los analitos biológicos.

Dado que el principio de medida propuesto en este capítulo permite complementar la medida de la masa boyante con la medida de la potencia reflejada por el dispositivo, a continuación, se propone y estudia la medida de esta señal óptica como una nueva fuente de información sobre las partículas. Se demuestra que la introducción de esta señal permite distinguir entre poblaciones de partículas aún en situaciones en las que las distribuciones de masa boyante solapan.

5.3. Análisis de la señal óptica

Durante las medidas realizadas, la potencia reflejada por el dispositivo se mantiene constante hasta que una partícula pasa por la zona iluminada, produciendo una caída en la señal óptica debido a la dispersión causada por la partícula, lo que se puede medir como un cambio en reflectividad (ΔR). Para poder analizar mejor estos cambios en reflectividad se normalizan al valor medido cuando no pasa ninguna partícula por la zona iluminada (R_0). Este cambio en reflectividad normalizado dependerá tanto del tamaño de la partícula como de su índice de refracción, por lo que este parámetro abre la puerta a distinguir entre partículas de distinto tipo en base a su morfología y propiedades ópticas.

Al medir el cambio en reflectividad producido por las partículas de sílice 8.4 μm y las de PMMA se aprecia que las partículas de PMMA producen un cambio en reflectividad 4 veces mayor en valor medio que el producido por las de sílice, lo que permite distinguir las sin problema (Fig. 5.4a). Nótese que, mezcladas, estas partículas no podían ser distinguidas a través de su masa boyante, demostrando la utilidad de la señal óptica a la hora de distinguir entre partículas con masas boyantes cercanas.

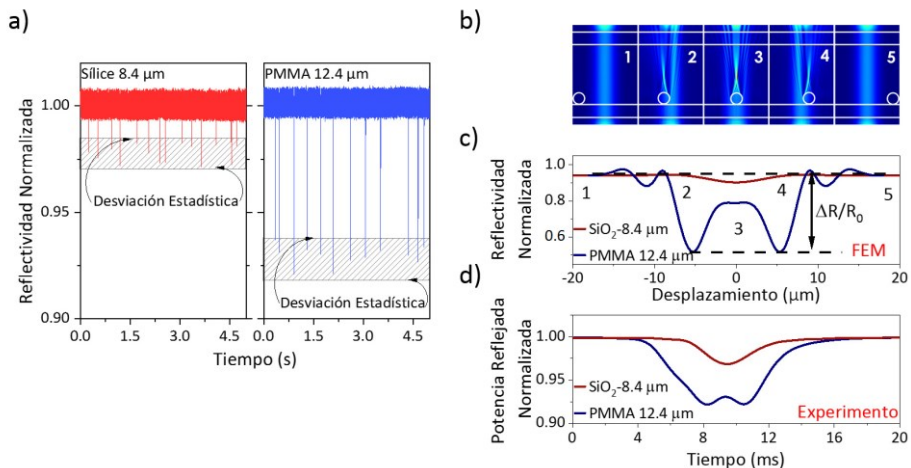


Figura 5.4.: Medida de la señal óptica durante el paso de micropartículas. a) Medidas experimentales para el cambio en reflectividad causado por las partículas SiO₂-8 (izquierda) y PMMA (derecha). b) Mapas de intensidad obtenidos en las simulaciones para distintas posiciones relativas entre el haz y la partícula (1-5). c) Reflectividad en función de la posición de la partícula obtenida mediante las simulaciones. d) Medida experimental del cambio en reflectividad producido por el paso de una partícula individual de sílice 8.4 μm y otra de PMMA 12.4 μm.

Para comprender mejor cómo influyen las propiedades de las partículas en el cambio en frecuencia, se realizan simulaciones por el método de elementos finitos (Comsol Multiphysics, módulo RF). Para estas simulaciones se define una geometría que reproduce las dimensiones de una sección longitudinal del capilar suspendido con una partícula esférica que se encuentra en contacto con una de las paredes del capilar para ajustarse a las condiciones experimentales (Fig. 5.4b, véase epígrafe 6.2. para una discusión detallada sobre la posición de las partículas en el capilar). El láser se modeliza como un haz gaussiano y se hace incidir en el centro del canal, obteniendo como resultado el cuadrado del módulo del campo eléctrico integrado en el borde superior, lo que da una magnitud que será directamente proporcional a la potencia reflejada y, por lo tanto, a la reflectividad normalizada. En esta simulación se varía secuencialmente la posición de la partícula en eje del canal. Los resultados de estas simulaciones permiten representar la reflectividad en función del desplazamiento de la partícula (Fig. 5.4c), lo que equivale a la medida experimental del cambio en reflectividad producido por el paso de la partícula que se mueve a velocidad constante. Estas simulaciones se realizan para una partícula de 8.4 μm de diámetro y un índice de refracción igual al de la sílice y otra partícula de 12.4 μm de diámetro y un índice de refracción igual al del PMMA.

En el caso de las partículas pequeñas (8.4 μm), las simulaciones (línea roja en Fig. 5.4c) muestran que el cambio en reflectividad causado por el paso de la

partícula sigue una forma gaussiana como consecuencia del perfil del haz. En el caso de las partículas más grandes ($12.4 \mu\text{m}$) este cambio en reflectividad (línea azul en Fig. 5.4c) presenta una forma con dos mínimos, que se corresponden con los extremos de la partícula alineados con el centro del haz (detalles 2 y 4 en Fig. 5.4b), y un máximo local, que se corresponde con el centro de la partícula alineado con el haz (detalle 3 en Fig. 5.4b). Las formas de gaussiana y doble gaussiana, predichas por las simulaciones para la partícula pequeña y grande respectivamente, se observan en las medidas experimentales (Fig. 5.4.d).

Esta diferencia entre la forma del cambio en reflectividad de las partículas pequeñas y grandes se debe a que el cambio en reflectividad está gobernado por dos procesos distintos, por un lado, la dispersión causada en la superficie de la partícula y, por otro lado, el cambio en índice de refracción causado en volumen de la partícula. En el caso de las partículas pequeñas, debido a su mayor relación superficie/volumen el efecto de la dispersión en la superficie será más significativo. Por el contrario, en las partículas más grandes, ambos fenómenos son apreciables: maximizándose el efecto de cambio en índice de refracción cuando el centro de la partícula se encuentra alineado con el haz mientras que el efecto de dispersión se maximiza cuando los extremos de la partícula se alinean con el centro del haz.

Teniendo en cuenta los dos mecanismos que rigen el cambio en reflectividad y los resultados de las simulaciones obtenidas por el paso de partículas, para el análisis de los resultados obtenidos experimentalmente, se ajustará cada evento en la señal óptica a una función que será la suma de dos gaussianas obteniendo como resultado del cambio en reflectividad ($\Delta R/R_0$) el promedio de los dos mínimos.

Distinción entre partículas individuales y agregados

En los resonadores con microcanales integrados puede ocurrir que una partícula (o más) entre en la zona suspendida antes de que la anterior partícula haya terminado de atravesar dicha zona, produciendo un evento en la señal mecánica que resulta de la superposición de los cambios de frecuencia producidos por cada partícula individual. Este fenómeno no supone un problema siempre y cuando las partículas estén lo suficientemente separadas entre sí como para que se observen dos mínimos locales en la señal mecánica (Fig. 5.5a-derecha), ya que se podrá determinar de manera inequívoca la masa de cada partícula. Sin, embargo, si dos partículas no están lo suficientemente separadas, la señal mecánica presentará un único máximo, malinterpretando la señal como una única partícula de masa boyante menor o igual que la suma

de la masa de ambas partículas (Fig. 5.5a-centro). En trabajos anteriores se ha propuesto resolver este problema mediante el seguimiento simultáneo de la frecuencia de $2N$ modos flexurales para poder separar la contribución de la masa y la posición de hasta un máximo N de partículas que se puedan encontrar simultáneamente dentro del resonador²⁷. Como alternativa, en otros trabajos se ha propuesto la introducción selectiva de partículas previamente analizadas mediante técnicas de microscopía^{20,28,29} con el fin de evitar este problema, aunque presenta como desventaja la reducción de la eficiencia de la medida de partículas.

Los dispositivos RMT desarrollados en esta tesis permiten resolver este problema de una manera más sencilla, versátil y sin reducir la eficiencia de la medida gracias a la adquisición simultánea de las señales mecánica y óptica. Debido a que los eventos en la señal óptica son un orden de magnitud más rápidos que los eventos en la señal mecánica, se podrá conocer cuántas partículas contribuyen a cada evento mecánico contando el número de eventos registrados en la señal óptica (Fig 5.5a). Además, como el spot del láser se encuentra enfocado en una posición fija y conocida del resonador (habitualmente en el centro de la zona suspendida), el análisis de los eventos en la señal óptica permite asignar una posición para una partícula en un determinado tiempo. En el caso de que haya varias partículas de manera simultánea en la región suspendida, esta posición en un tiempo determinado se utiliza como condición de contorno en el ajuste de la señal mecánica. La imposición de esta condición de contorno permite distinguir de manera inequívoca la masa de dos partículas incluso en los casos en los que no se pueden resolver dos picos (Fig. 5.5a-centro).

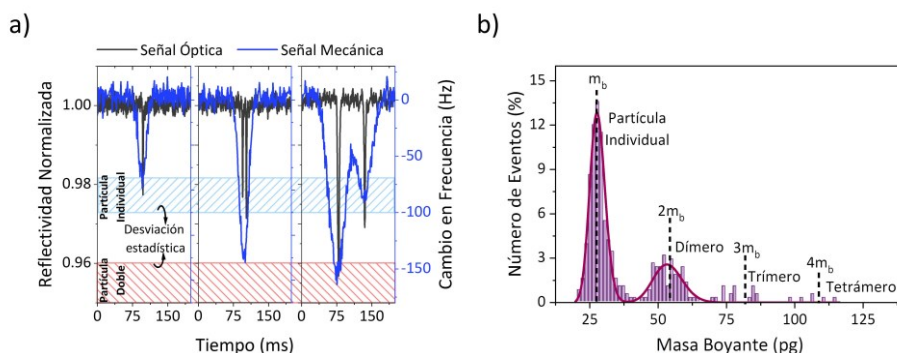


Figura 5.5.: Distinción entre varias partículas introducidas simultáneamente en el resonador. a) Señal óptica y mecánica para, una partícula individual (izquierda), dos partículas con una separación pequeña (centro) y un agregado de dos partículas (dímero) y una partícula con una separación grande (derecha). **b)** Espectro de masa medido (barras) para partículas de poliestireno de $10\mu\text{m}$ y su ajuste (línea continua) a una distribución doble de masa (Ec. 5.3).

A pesar de la solución propuesta para distinguir entre múltiples partículas, si dos (o más) partículas se encuentran unidas (o separadas una distancia menor que el tamaño del spot), también se observará un único evento en la señal óptica, interpretando este resultado como una única partícula de masa boyante igual a la suma de las partículas agregadas (Fig. 5.5a-derecha). A pesar de que las muestras de partículas son agitadas e introducidas durante 10 minutos en un baño ultrasónico antes de cada experimento, en las medidas realizadas es común la aparición de estos agregados. No obstante, dado que las partículas utilizadas son monodispersas se puede inferir el número de partículas de estos agregados ya que el valor de su masa boyante será igual a un múltiplo entero de la masa de las partículas individuales (Fig. 5.5b).

5.4. Espectrometría mecano-óptica de micropartículas

Anteriormente se ha demostrado que, por separado, la señal mecánica y la señal óptica pueden aportar información sobre las propiedades de las partículas y permitir la distinción entre algunas poblaciones. Para comprobar la eficacia de ambas medidas se introducirán cada uno de los 5 tipos de partículas disponibles (Tabla 5.1.) en el dispositivo de manera secuencial mientras se mide de manera simultánea las señales óptica y mecánica. Los datos obtenidos son analizados empleando los métodos descritos en los epígrafes anteriores obteniendo para cada partícula un valor de cambio en frecuencia y otro de cambio en reflectividad.

Una vez medidas las distintas partículas, se representan los resultados obtenidos en la señal mecánica (cambio en frecuencia y/o masa boyante) y en la señal óptica (cambio en reflectividad normalizado, $\Delta R/R_0$) como una dispersión de puntos en dos dimensiones (Fig. 5.6). En esta representación bidimensional se pueden apreciar 5 nubes de puntos distintas, que se corresponden con cada una de las poblaciones de partículas estudiadas. Ninguna de estas nubes de puntos solapa con otra, por lo que la distinción entre las poblaciones es inequívoca, sin embargo, si se atiende únicamente a la señal mecánica o a la señal óptica (histogramas proyectados vertical y horizontalmente, Fig. 5.6.), algunas de las distribuciones de estas poblaciones sí solapan, por lo que resultarían indistinguibles mediante una única medida.

En el caso de las medidas de masa boyante, histograma proyectado en el eje vertical en Fig. 5.6, las distribuciones de las partículas de PMMA 12.4 μm ($m_{PMMA}=199\pm 9$ pg), poliestireno 19 μm ($m_{PS-19}=180\pm 9$ pg) y sílice 8.4 μm ($m_{SiO-8}=220\pm 15$ pg) solapan, lo que haría imposible distinguir una mezcla de estas partículas (problema de la masa boyante).

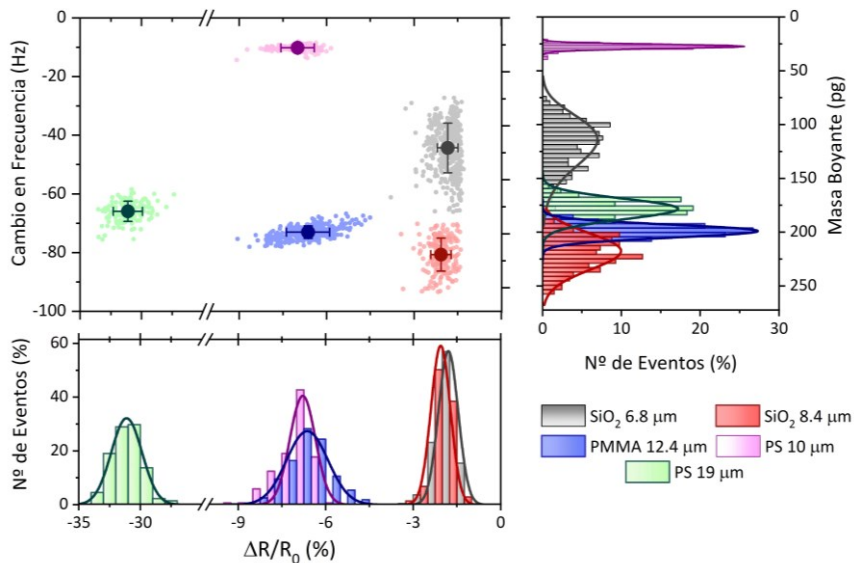


Figura 5.6.: Espectros mecano-ópticos medidos para distintas poblaciones de micropartículas. Dispersión de puntos bidimensional del cambio en frecuencia (o masa boyante, eje vertical) y del cambio en reflectividad normalizado producido por cada partícula individual siendo las distintas poblaciones de micropartículas: sílice de 6.8 μm (puntos grises, $N=432$), sílice 8.4 μm (puntos rojos, $N=205$), poliestireno 10 μm (puntos morados, $N=152$), PMMA 12.4 μm (puntos azules, $N=311$) y poliestireno 19 μm (puntos verdes, $N=131$). Los puntos más grandes y de color más intenso representan el valor promedio de cada población, siendo su barra de error la desviación estándar. **Proyección vertical.** Distribución en masa boyante medida (barras) para las distintas poblaciones de partículas y el ajuste de las mismas (línea continua) a la función de densidad de probabilidad de masa boyante (Ec. 5.3). **Proyección horizontal.** Distribución en cambio en reflectividad normalizado (barras) para las distintas poblaciones de partículas y el ajuste de las mismas (línea continua) a una distribución normal. Los agregados de partículas se han eliminado de esta representación siguiendo el criterio descrito en el epígrafe 5.3.

Análogo al problema de la masa boyante, también existe un problema para distinguir entre partículas muy distintas si solo se atiende a su cambio en reflectividad, histogramas proyectados en el eje horizontal en Fig. 5.6. En este caso se aprecia el solapamiento de dos pares de poblaciones: por una parte, las micropartículas de sílice de 6.8 μm ($\Delta R_{SiO-6}/R_0 = -1.8 \pm 0.4\%$), y 8.4 μm ($\Delta R_{SiO-8}/R_0 = -2.0 \pm 0.3\%$) y, por otro lado, las micropartículas de PMMA ($\Delta R_{PMMA}/R_0 = -6.6 \pm 0.7\%$) y poliestireno 10 μm ($\Delta R_{PS-10}/R_0 = -7.0 \pm 0.6\%$). En este caso, el solapamiento entre poblaciones es debido a que el cambio en reflectividad está determinado tanto por el diámetro de las partículas como por su índice de refracción.

En el caso de las dos poblaciones de partículas de sílice, el hecho de que produzcan un cambio en reflectividad similar se debe a que ambas partículas presentan el mismo índice de refracción y un tamaño similar. No obstante, el cambio en reflectividad obtenido con las partículas de 8.4 μm es ligeramente

más grande, lo que se puede atribuir al mayor tamaño de estas partículas. Este mismo fenómeno se repite en el caso de las dos poblaciones de micropartículas de poliestireno, donde, para el mismo índice de refracción, las partículas más grandes ($19 \mu\text{m}$, $\Delta R_{PS-19}/R_0 = -31 \pm 1\%$) producen un cambio en reflectividad mucho mayor (Fig. 5.6, proyección horizontal). Por su parte, en las partículas de PMMA y poliestireno $10 \mu\text{m}$, a pesar de presentar índices de refracción muy distintos (tabla 5.1.), sus distribuciones en cambio en reflectividad también solapan. En este caso, este solapamiento es debido a la combinación de los dos mecanismos que producen el cambio de la reflectividad: al ser más grandes, las partículas de PMMA dispersan más luz que las de poliestireno de $10 \mu\text{m}$, sin embargo, en estos tamaños el efecto del cambio del índice de refracción ya empieza a ser notable este fenómeno, lo que hace que el cambio en reflectividad producido por las micropartículas de poliestireno de $10 \mu\text{m}$ sea ligeramente mayor que el de las micropartículas de PMMA, a pesar de que estas tienen mayor tamaño.

Los resultados obtenidos con las distintas poblaciones de micropartículas (Fig. 5.6) ponen de manifiesto la versatilidad que ofrece complementar la señal mecánica con la señal óptica y viceversa. Dado que los parámetros obtenidos mediante ambas señales dependen tanto de una propiedad intensiva de las partículas (índice de refracción, en el caso de la señal óptica y densidad en el caso de la señal mecánica) como del tamaño de estas, es posible que una de las distribuciones solape aun cuando las partículas sean de distintos materiales y tamaños. Sin embargo, si se da este caso, en la otra señal este solapamiento no se producirá, lo que permite la distinción inequívoca de las poblaciones con una única medida.

5.5. Conclusiones

En este capítulo se ha presentado un método de medida simultánea de propiedades mecánicas y ópticas para la caracterización de partículas suspendidas en un medio acuoso basado en los dispositivos RMT fabricados y utilizando el sistema de transducción óptica. La validez de este método se ha probado con medidas experimentales de 5 poblaciones de micropartículas suspendidas en agua de distintos tamaños y materiales.

También se ha demostrado, tanto teórica como experimentalmente, que la adquisición de solo una de estas señales, ya sea mecánica u óptica, no permite una distinción inequívoca entre poblaciones de partículas de tamaños y materiales distintos. Esta imposibilidad de distinguir algunas poblaciones de partículas se debe a que el cambio en reflectividad está determinado por el

tamaño e índice de refracción de la partícula mientras que el cambio en frecuencia depende de la masa boyante de la partícula, que depende a su vez tanto del tamaño como de la densidad de esta. Esta dependencia con el tamaño puede llevar a que distribuciones, ya sea de cambio en reflectividad o de masa boyante, medidas para poblaciones de partículas muy diferentes solapen. Por el contrario, al medir ambas señales de manera simultánea se puede asignar a cada partícula una matriz de dos elementos: cambio en reflectividad y cambio en frecuencia. De esta manera, al representar los datos como una dispersión de puntos bidimensional se rompe la degeneración de las poblaciones consiguiendo distinguir de forma inequívoca entre todas las poblaciones de partículas medidas.

También se ha demostrado que complementar la señal mecánica con la medida de la señal óptica permite conocer el número de partículas que se encuentran simultáneamente dentro de la región suspendida. Utilizar esta fuente de información supone una ventaja frente a los resonadores con microcanales integrados convencionales, en los que es necesario medir simultáneamente múltiples modos de vibración para separar la contribución de la masa y la posición de cada partícula.

Bibliografía

- 1 Darr, J. A., Zhang, J., Makwana, N. M. & Weng, X. Continuous Hydrothermal Synthesis of Inorganic Nanoparticles: Applications and Future Directions. *Chemical Reviews* **117**, 11125-11238, doi:10.1021/acs.chemrev.6b00417 (2017).
- 2 A, N., Kovooru, L., Behera, A. K., Kumar, K. P. P. & Srivastava, P. A critical review of synthesis procedures, applications and future potential of nanoemulsions. *Advances in Colloid and Interface Science* **287**, 102318, doi:<https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102318> (2021).
- 3 Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C. & Galloway, T. S. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin* **62**, 2588-2597, doi:<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.025> (2011).
- 4 Peng, L. *et al.* Micro- and nano-plastics in marine environment: Source, distribution and threats — A review. *Science of The Total Environment* **698**, 134254, doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134254> (2020).

- 5 Mattsson, K. *et al.* Brain damage and behavioural disorders in fish induced by plastic nanoparticles delivered through the food chain. *Scientific Reports* **7**, 11452, doi:10.1038/s41598-017-10813-0 (2017).
- 6 Dawson, A. L. *et al.* Turning microplastics into nanoplastics through digestive fragmentation by Antarctic krill. *Nature Communications* **9**, 1001, doi:10.1038/s41467-018-03465-9 (2018).
- 7 Van Cauwenberghe, L. & Janssen, C. R. Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environmental Pollution* **193**, 65-70, doi:<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.06.010> (2014).
- 8 Smith, M., Love, D. C., Rochman, C. M. & Neff, R. A. Microplastics in Seafood and the Implications for Human Health. *Current Environmental Health Reports* **5**, 375-386, doi:10.1007/s40572-018-0206-z (2018).
- 9 Enders, K. *et al.* Tracing microplastics in aquatic environments based on sediment analogies. *Scientific Reports* **9**, 15207, doi:10.1038/s41598-019-50508-2 (2019).
- 10 DeBlois, R. W. & Bean, C. P. Counting and Sizing of Submicron Particles by the Resistive Pulse Technique. *Review of Scientific Instruments* **41**, 909-916, doi:10.1063/1.1684724 (1970).
- 11 Berne, B. J. & Pecora, R. *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*. (Dover Publications, 2000).
- 12 Stockslager, M. A. *et al.* Rapid and high-precision sizing of single particles using parallel suspended microchannel resonator arrays and deconvolution. *Review of Scientific Instruments* **90**, 085004-085013, doi:10.1063/1.5100861 (2019).
- 13 Byun, S. *et al.* Characterizing deformability and surface friction of cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 7580-7585, doi:10.1073/pnas.1218806110 (2013).
- 14 Shaw Bagnall, J. *et al.* Deformability of Tumor Cells versus Blood Cells. *Scientific Reports* **5**, 18542, doi:10.1038/srep18542
<https://www.nature.com/articles/srep18542#supplementary-information>
(2015).
- 15 Weng, Y. *et al.* Mass sensors with mechanical traps for weighing single cells in different fluids. *Lab on a Chip* **11**, 4174-4180, doi:10.1039/C1LC20736A (2011).

- 16 Bryan, A. K. *et al.* Measuring single cell mass, volume, and density with dual suspended microchannel resonators. *Lab on a Chip* **14**, 569-576, doi:10.1039/C3LC51022K (2014).
- 17 Grover, W. H. *et al.* Measuring single-cell density. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 10992-10996, doi:10.1073/pnas.1104651108 (2011).
- 18 Kang, J. H. *et al.* Noninvasive monitoring of single-cell mechanics by acoustic scattering. *Nature Methods* **16**, 263-269, doi:10.1038/s41592-019-0326-x (2019).
- 19 Lee, D. *et al.* Pulled microcapillary tube resonators with electrical readout for mass sensing applications. *Scientific Reports* **6**, 33799-33807, doi:10.1038/srep33799
<https://www.nature.com/articles/srep33799#supplementary-information> (2016).
- 20 Ko, J. *et al.* in *2019 20th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems & Eurosensors XXXIII (TRANSDUCERS & EUROSENSORS XXXIII)*. 748-751.
- 21 Tamayo, J., Kosaka, P. M., Ruz, J. J., San Paulo, Á. & Calleja, M. Biosensors based on nanomechanical systems. *Chemical Society Reviews* **42**, 1287-1311, doi:10.1039/C2CS35293A (2013).
- 22 Dominguez-Medina, S. *et al.* Neutral mass spectrometry of virus capsids above 100 megadaltons with nanomechanical resonators. *Science* **362**, 918, doi:10.1126/science.aat6457 (2018).
- 23 Malvar, O. *et al.* Mass and stiffness spectrometry of nanoparticles and whole intact bacteria by multimode nanomechanical resonators. *Nature Communications* **7**, 13452, doi:10.1038/ncomms13452 (2016).
- 24 Malitson, I. H. Interspecimen Comparison of the Refractive Index of Fused Silica*,†. *J. Opt. Soc. Am.* **55**, 1205-1209, doi:10.1364/JOSA.55.001205 (1965).
- 25 Sultanova, N., Kasarova, S. & Nikolov, I. Dispersion Properties of Optical Polymers. *Acta Physica Polonica A* **116**, 3, doi:10.12693/APhysPolA.116.585 (2009).

- 26 Byun, S., Hecht, V. C. & Manalis, S. R. Characterizing Cellular Biophysical Responses to Stress by Relating Density, Deformability, and Size. *Biophys J* **109**, 1565-1573, doi:10.1016/j.bpj.2015.08.038 (2015).
- 27 Olcum, S., Cermak, N., Wasserman, S. C. & Manalis, S. R. High-speed multiple-mode mass-sensing resolves dynamic nanoscale mass distributions. *Nature Communications* **6**, 7070-7077, doi:10.1038/ncomms8070 (2015).
- 28 Calistri, N. L. *et al.* Microfluidic active loading of single cells enables analysis of complex clinical specimens. *Nature Communications* **9**, 4784-4790, doi:10.1038/s41467-018-07283-x (2018).
- 29 Ko, J., Lee, D., Lee, B. J., Kauh, S. K. & Lee, J. Micropipette Resonator Enabling Targeted Aspiration and Mass Measurement of Single Particles and Cells. *ACS Sensors* **4**, 3275-3282, doi:10.1021/acssensors.9b01843 (2019).

Capítulo 6:

Espectrometría Multiparamétrica de Partículas Asistida por Fuerzas Hidrodinámicas

En el capítulo 5 se ha mostrado que la combinación de la medida del máximo cambio en la frecuencia de resonancia (señal mecánica) y el máximo cambio en reflectividad (señal óptica) producidos por el paso de partículas a través de las zonas suspendida e iluminada respectivamente, permiten una distinción inequívoca entre partículas de distintos materiales y tamaños¹. Sin embargo, a menos que las partículas hayan sido caracterizadas anteriormente mediante otras técnicas (p. ej. microscopía), resulta imposible conocer si las diferencias entre las distintas poblaciones medidas en el espectro mecano-óptico son debidas a una diferencia en el tamaño, en el material o en ambas. Este problema es consecuencia de que los cambios medidos en ambas señales dependen tanto del tamaño como de una propiedad intensiva de la partícula (como puede ser la densidad de masa o el índice de refracción). Por tanto, si se pudiera conocer el tamaño de las partículas se conseguiría una caracterización muy completa de la muestra clasificando las partículas tanto por su tamaño como por su material (densidad e índice de refracción). En trabajos anteriores usando microcanales suspendidos resonantes (SMR) se ha propuesto resolver este problema midiendo dos veces la masa boyante de cada partícula en líquidos de distintas densidades, consiguiendo de esta manera separar la contribución del volumen y la densidad a la masa boyante²⁻⁴. Esta técnica tiene como ventaja que permite una medida directa de la densidad de las partículas, pero, como contrapartida, se reduce drásticamente la eficiencia de la medida aumentando la complejidad del proceso de fabricación del dispositivo y el sistema de bombeo.

Por otra parte, los dispositivos microfluídicos han demostrado ser de gran utilidad para ordenar y caracterizar partículas en flujo a través de su tamaño y forma. En estos microcanales se obtiene un ordenamiento pasivo de las partículas gracias al fenómeno de la migración inercial de partículas lo que lleva a una clasificación pasiva y altamente eficiente de las partículas a través de sus tamaños^{5,6}. Este fenómeno consiste en que las fuerzas que el fluido ejerce sobre las partículas producen un desplazamiento lateral haciendo que estas ocupen una posición determinada dentro del canal en función de su forma y tamaño. De esta manera, partículas inicialmente introducidas con una distribución aleatoria terminan moviéndose con una velocidad constante y ocupando una posición en el canal determinada por su forma^{7,8}. Por lo tanto, en los resonadores microcapilares transparentes (RMT) fabricados el fenómeno de la migración inercial de partículas permitirá aprovechar este ordenamiento pasivo⁹. Además, estas fuerzas hidrodinámicas determinan la velocidad con la que las partículas atraviesan la zona suspendida del dispositivo, lo que quedará registrado en las señales mecánica y óptica y supone una nueva fuente de información sobre las partículas.

En este capítulo se desarrolla un método adicional para interpretar los cambios en las señales mecánica y óptica producidos por el paso de una partícula teniendo en cuenta, además del máximo cambio máximo en la amplitud de las señales, la duración de estos eventos en el tiempo, lo que nos permitirá conocer el tiempo que tarda la partícula en atravesar las zonas suspendida e iluminada. De esta manera se puede obtener información sobre la velocidad de cada partícula (y, en consecuencia, de su tamaño y las fuerzas hidrodinámicas a las que está sometida) sin introducir ningún cambio en el sistema experimental. A lo largo de este capítulo se estudian las fuerzas hidrodinámicas que actúan sobre las partículas. Para este propósito se desarrollarán modelos teóricos (tanto analíticos como simulaciones por elementos finitos) para entender la dependencia de estas fuerzas con parámetros como el caudal dentro del microcanal o el tamaño de la partícula. Además, se medirá experimentalmente el efecto que tienen estas fuerzas sobre las señales mecánica y óptica. Este estudio de las fuerzas hidrodinámicas permitirá relacionar la velocidad de la partícula con su tamaño, lo que finalmente permitirá la detección de partículas basada en la adquisición simultánea de tres magnitudes independientes (óptica, mecánica e hidrodinámica). Este nuevo método permite una caracterización más fiable de las partículas y abre la puerta a medir propiedades intensivas de las partículas como la densidad.

6.1. Medida de la velocidad de las partículas

La velocidad de una partícula inmersa en un fluido, está directamente relacionada con las fuerzas hidrodinámicas a las que está sometida (Ley de Stokes, Ec. 1.135). Estas fuerzas hidrodinámicas están determinadas tanto por el caudal aplicado como por la geometría de la partícula, por lo que el estudio de la velocidad que adquiere en el flujo permitirá inferir su tamaño. Los cambios temporales (eventos) medidos en las señales óptica (cambio en la potencia reflejada) y mecánica (cambio en la frecuencia de resonancia) contienen información sobre la velocidad de cada partícula, siendo la duración de los mismos inversamente proporcional a la velocidad de la partícula (Fig. 6.1.).

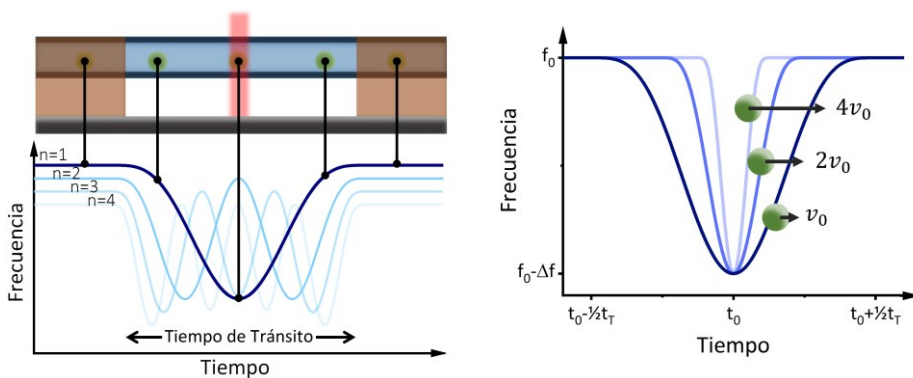


Figura 6.1.: Principio de medida de la velocidad. (Izquierda) Representación esquemática de cómo afecta la posición de la partícula en el resonador a la señal en frecuencia medida para los cuatro primeros modos flexurales de oscilación. (derecha) Señal en frecuencia en el primer modo flexural esperada para tres partículas idénticas con distintas velocidades: $v_0, 2v_0, 4v_0$.

Para cuantificar la duración de los eventos en la señal mecánica (tiempo de tránsito, t_T), deduciremos una expresión analítica a partir de la ecuación de Navier-Stokes que depende tanto del tamaño de la partícula como de la diferencia de presión aplicada entre los extremos de la zona suspendida. Para ello asumiremos que las partículas se mueven a una velocidad constante (véase epígrafe 6.3. para la justificación de esta velocidad constante), de forma que el tránsito de la partícula prueba la forma del modo (será el resultado de la convolución de una delta de Dirac y la forma del modo). De esta manera, la señal de la frecuencia en función del tiempo, $f_n(t)$, se puede expresar sustituyendo la variable espacial (x) por la variable temporal (t) en la forma teórica del modo (Ec. 6.1).

$$f_n(t) = f_{n0} + \frac{\Delta f}{(\psi_{n,max})^2} \psi_n^2 \left(\frac{t - t_0}{t_T} + \frac{1}{2} \right) \quad (6.1)$$

Siendo f_{n0} la frecuencia de resonancia para el n -ésimo modo, Δf el máximo cambio en frecuencia producido por la partícula a su paso, ψ_n la forma del modo (teórica), $\psi_{n,max}$ el valor de la forma del modo en su máxima amplitud y t_0 el instante en el que la partícula se encuentra en la mitad de la región suspendida del resonador.

Al ajustar los eventos en la señal mecánica a esta función (Ec. 6.1) se obtiene tanto el máximo cambio en frecuencia (con el que seguidamente se calcula la masa boyante de la partícula) como el tiempo de tránsito. Finalmente, la velocidad (v) de la partícula se obtiene como el inverso del tiempo de tránsito multiplicado por la longitud, L , de la región suspendida $v = L/t_T$.

La duración de los eventos en la señal óptica también varía de manera inversamente proporcional a la velocidad de la partícula, sin embargo, como el tamaño de la zona iluminada no está tan bien definido como el de la longitud suspendida resulta mucho más complicado obtener la velocidad de la partícula a través de estos datos.

6.2. Migración inercial de partículas: componente radial de la fuerza hidrodinámica

Cuando una partícula se encuentra inmersa en un fluido en movimiento (o, lo que es equivalente, cuando una partícula se mueve dentro de un fluido) experimenta una fuerza que se puede obtener como la integral del tensor de tensiones del fluido sobre la superficie de la partícula (Ec. 1.121). Esta fuerza es proporcional a la velocidad de la partícula (Ec. 1.136) y estará dirigida en la misma dirección que el flujo (componente axial). No obstante, si no hay cierta simetría también pueden aparecer componentes de esta fuerza en las direcciones ortogonales al flujo (componente radial). Este es el caso de las partículas introducidas en los dispositivos RMT fabricados, en las que, salvo que su centro se encuentre alineado con el eje del tubo capilar, se obtendrá un flujo asimétrico a su alrededor. Esta asimetría en el flujo alrededor de la partícula tiene su origen en el perfil de velocidades parabólico que se obtiene al aplicar una diferencia de presión entre los extremos del dispositivo (tubería cilíndrica, Ec. 111), de tal manera que en unas partes de la partícula la velocidad del fluido será mayor que en otras lo que puede producir un desplazamiento lateral de las partículas (migración inercial).

El sistema experimental desarrollado en esta tesis no permite medir el desplazamiento lateral de las partículas, sin embargo, el estudio de la componente radial de la fuerza hidrodinámica es necesario, ya que dicha componente determina la posición de la partícula en la dirección radial del microcanal. Esta posición influye de manera directa la magnitud de la componente axial de la velocidad de las partículas (a la que el sistema experimental sí es sensible).

En trabajos anteriores se ha demostrado que la fuerza que aparece en la dirección radial resulta de la suma de dos fuerzas de sentidos opuestos^{7,10}. Por una parte, está la fuerza inducida por el gradiente del perfil parabólico de velocidades (centrífuga) y, por otra parte, se encuentra la fuerza inducida por el efecto de la pared (centrípeta). La aparición de estas fuerzas tiene su origen en la perturbación del flujo causado por la presencia de las partículas, de tal manera que la velocidad del fluido (y, por tanto, su presión) varía a lo largo de la superficie (Fig. 6.2a.). Finalmente, esta diferencia de presión produce una fuerza neta que provocará el desplazamiento de la partícula. La magnitud de estas fuerzas varía en función de posición del centro de la partícula en la dirección radial: maximizándose la fuerza causada por el gradiente de velocidades cuando la partícula se encuentra más alejada del centro, mientras que la fuerza inducida por el efecto de la pared se minimiza en el centro del microcanal. De esta manera, existirá una posición en la dirección radial en la que ambas fuerzas tengan la misma magnitud, consiguiendo así una posición de equilibrio.

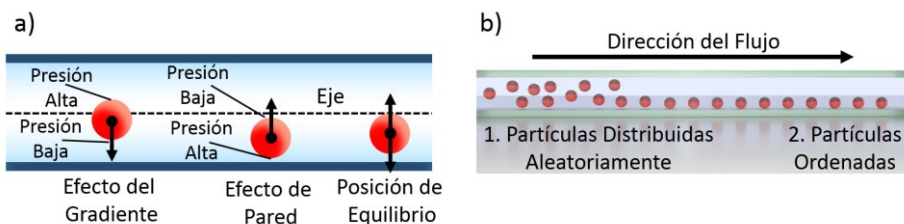


Figura 6.2.: Migración inercial de partículas. a) Representación esquemática de las fuerzas que actúan sobre una partícula en la dirección radial. b) Representación esquemática del proceso de ordenación de partículas mediante migración inercial.

El fenómeno de la migración inercial de partículas se usa habitualmente en microfluídica para ordenar micropartículas de manera pasiva⁷ y resultará también útil en los dispositivos fabricados. Gracias a este fenómeno, cuando se introduce una población de partículas con una distribución aleatoria, todas las partículas sufren el desplazamiento lateral hasta alcanzar la posición de equilibrio. Pasada una cierta longitud, todas las partículas se encuentran alineadas (Fig. 6.2b). Esta posición de equilibrio depende tanto del caudal en la

tubería como de la geometría de las partículas, por lo que partículas de distinta forma ocuparán posiciones de equilibrio diferentes.

Para comprender de manera cuantitativa cómo actúan las fuerzas en la dirección radial para los dispositivos fabricados en esta tesis se simula mediante el método de elementos finitos (FEM, Comsol Multiphysics, módulo de flujo laminar) una tubería cuyas dimensiones reproducen la región suspendida del dispositivo empleado*. Dentro de esta tubería se encuentra una partícula esférica y se impone una diferencia de presión entre los extremos del tubo de tal manera que se consigue un caudal de 10 nL/s. Con los resultados se calcula la fuerza que el fluido ejerce sobre la partícula como la integral del tensor de tensiones del fluido sobre la superficie de la partícula y se obtiene su componente radial. Esta simulación se repite secuencialmente variando tanto el tamaño de la partícula como la posición del centro de esta (Fig. 6.3a). Al tener la fuerza en función de la posición de la partícula se puede obtener la posición de equilibrio como el punto en el que la fuerza cambia de signo. Estas simulaciones muestran que, para el tamaño de las partículas y los caudales empleados en los experimentos, la fuerza que ejerce el fluido sobre la partícula en la dirección radial siempre tiene signo positivo (Fig. 6.3a). El hecho de que la fuerza sobre la partícula sea centrífuga en todas las posiciones indica que el fenómeno que domina esta fuerza es el gradiente de perfil de velocidades. Sin embargo, se produce un cambio en la curvatura de esta fuerza, lo que indica que la fuerza inducida por el efecto de la pared también tiene una contribución no despreciable. Por lo tanto, las partículas precipitarán sobre la pared del capilar en lugar de ocupar una posición de equilibrio donde se equilibren las dos fuerzas descritas.

El resultado de estas simulaciones concuerda con la posición de las partículas observadas en los experimentos mediante la inspección de estas con la cámara CCD incluida en el sistema interferométrico, Fig. 6.3b. Este resultado también se encuentra en buen acuerdo con trabajos previos en microfluídica donde se estudia la posición de equilibrio de partículas de gran diámetro (con respecto al diámetro del canal)⁸.

* El dispositivo utilizado para las medidas mostradas en este capítulo tiene un diámetro externo de 44 μm , un diámetro interno de 34 μm , una longitud de 500 μm y una masa de 2.3 μg .

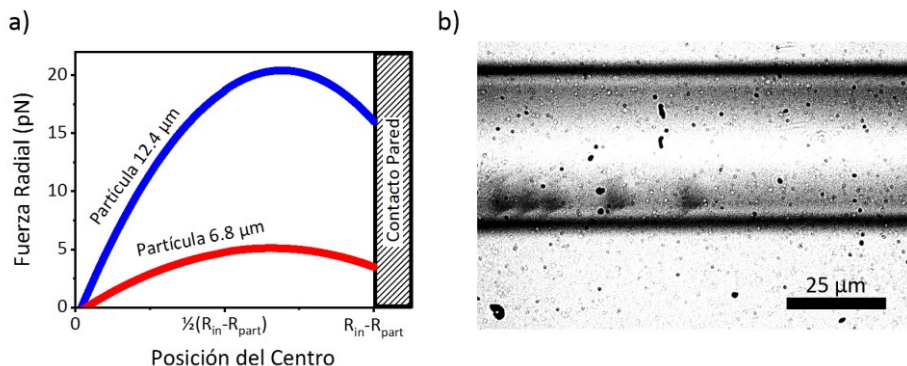


Figura 6.3.: Componente radial de la fuerza hidrodinámica en los dispositivos empleados. a) Componente radial de la fuerza función de la posición obtenida mediante las simulaciones por el método de elementos finitos para partículas de distintos diámetros con un caudal de 10 nL/s. **b)** Imagen obtenida con la cámara CCD del sistema de transducción interferométrico de micropartículas de sílice de 6.8 μm atravesando la zona suspendida del dispositivo.

Conocer que todas las partículas se encuentran en contacto con la pared del capilar permite una interpretación más sencilla de los resultados de la velocidad de las partículas, tal y como se verá en los siguientes epígrafes. Cabe destacar que en los dispositivos empleados en esta tesis las partículas no siguen una distribución anular, como es habitual en los canales de sección circular⁷, si no que todas las partículas se mueven en la misma línea. Esto se debe a que el eje del capilar es perpendicular a la dirección de la gravedad, por lo que, en la región en la que el capilar no está estirado el peso de las partículas es mucho mayor que las fuerzas hidrodinámicas, lo que da una dirección preferente para que las partículas precipiten sobre la pared del capilar. Esta distribución lineal permite que los resultados de las medidas ópticas sean más fáciles de interpretar (véase capítulo 5), ya que permite que todas las partículas se alineen con el centro del haz. Por el contrario, una distribución anular provocaría, que algunas partículas no pasasen bajo el spot, haciéndolas ópticamente indetectables.

6.3. Velocidad Límite: Componente Axial de la Fuerza Hidrodinámica

El movimiento de las partículas en la dirección paralela al flujo (dirección axial), también resulta de la suma de dos fuerzas de signo opuesto: la fuerza de empuje y la fuerza de rozamiento. La fuerza de empuje es proporcional a la velocidad del fluido en la posición del centro de la partícula, mientras que la fuerza de rozamiento es proporcional a la velocidad de la partícula (Ley de Stokes). En los experimentos mostrados en esta tesis se fija inicialmente una

diferencia de presión que se mantiene constante a lo largo de todo el experimento, con lo que se obtiene un flujo estacionario. Asimismo, el diámetro interno del capilar se mantiene constante tanto en la región suspendida como en una longitud suficientemente grande a los extremos de esta región. Por esta razón, las fuerzas de empuje y rozamiento en la partícula se encontrarán equilibradas causando que la velocidad de una partícula se mantenga constante (velocidad límite) a lo largo de la región suspendida[†]. La magnitud de esta velocidad límite dependerá directamente del tamaño de la partícula y de la posición de su centro en el campo de velocidades del fluido.

Como se ha demostrado en el epígrafe anterior, gracias a la acción de la componente radial de la fuerza hidrodinámica, las partículas utilizadas se mueven estando en contacto con la pared del capilar. De esta manera, la posición del centro de cada partícula estará determinada por su radio, lo que combinado con el perfil parabólico de velocidades que presenta el fluido dentro del dispositivo (Ec. 1.111), abre la puerta a relacionar de manera unívoca la velocidad una partícula con su tamaño. De esta manera, para un mismo caudal, las velocidades más grandes se corresponderán con las partículas de mayor tamaño.

Cabe destacar que, a pesar de que el principio de medida propuesto en este capítulo no es sensible al desplazamiento lateral descrito en el epígrafe anterior, este resulta imprescindible para poder interpretar la medida de la velocidad. En ausencia de desplazamiento lateral, partículas idénticas ocuparían posiciones aleatorias a lo largo de la dirección radial, causando que su velocidad pueda ser cualquiera dentro de un cierto intervalo, lo que imposibilitaría relacionar de manera unívoca velocidad y tamaño.

Para obtener una relación cuantitativa entre velocidad y tamaño se calcula la fuerza que ejerce el fluido sobre la partícula, lo que se consigue integrando el tensor de tensiones del fluido sobre la superficie de la partícula (Ec. 1.121). Para una mayor sencillez en el cálculo, se considera que la partícula no perturba el perfil parabólico de velocidades y se aproxima la forma de la partícula a un

[†] Se ha observado experimentalmente que para caudales inferiores a 5 nL/s las partículas no mantienen una velocidad constante al atravesar la zona suspendida. No obstante, como para todos los experimentos mostrados en esta tesis se emplea caudales superiores a ese umbral, este efecto será despreciable. Véase el apartado «Nuevos fenómenos hidrodinámicos» en el capítulo de Perspectivas Futuras para una discusión más detallada de este tema.

hexaedro regular. Al integrar el tensor de tensiones las dos únicas caras que contribuirán a la fuerza en la dirección axial son aquellas cuyas normales son paralelas a esta dirección. La integral sobre la cara cuya normal es paralela al sentido del flujo dará la fuerza de empuje (F_{emp}), mientras que la integral sobre la cara opuesta dará la fuerza de rozamiento (F_{roz}) (Fig. 6.4a). La fuerza de empuje (F_{emp}), se calcula integrando el tensor de tensiones en la cara trasera de la partícula (Ec. 6.2, Fig. 6.4a). Como el tamaño de la partícula es mucho menor que la longitud del canal se desprecia la contribución de la componente σ_{xx} .

$$\begin{aligned}
 F_{emp} &= \iint (\sigma_{xz} + \sigma_{xy}) dS \\
 &= \int_{R_{in}-R_{part}}^{R_{in}} \int_{-R_{part}}^{R_{part}} \frac{2u_0\mu}{R_{in}^2} (x + y) dy dz \\
 &= \frac{4\mu u_0 R_{part}^2}{R_{in}^2} (R_{in} - R_{part})
 \end{aligned} \tag{6.2}$$

Siendo σ el tensor de tensiones del fluido, S la superficie de integración, R_{in} el radio interno de la región suspendida, R_{part} el radio de la partícula, u_0 la velocidad del fluido en el eje del microcanal y μ la viscosidad del fluido.

La fuerza de rozamiento (F_{roz}), se extrae de la Ley de Stokes (Ec. 1.135). Sin embargo, como este sistema no tiene la misma simetría que la descripción canónica de la Ley de Stokes (vista en el epígrafe 1.8.), se introduce un factor de corrección, $A(R_{part})$. Aunque no se puede conseguir una expresión analítica de este factor de corrección se puede suponer que dependerá de la diferencia entre el área del canal y la partícula (Ec. 6.3).

$$F_{roz} = 6\pi\mu A(R_{part}) R_{part} v \propto \frac{6\pi\mu R_{part} v}{R_{in}^2 - R_{part}^2} \tag{6.3}$$

Siendo v la velocidad de la partícula.

Al encontrarse en un flujo estacionario, ambas fuerzas se encontrarán equilibradas, por lo que la partícula se moverá con una velocidad constante (velocidad límite), que se obtiene al igualar la fuerza de empuje a la de rozamiento (Ec. 6.4).

$$v_x = \frac{2u_0}{3\pi A(R_{part}) R_{in}^2} R_{part} (R_{part} - R_{in}) \tag{6.4}$$

Esta ley muestra una dependencia monótona creciente con el radio de la partícula y es directamente proporcional a la velocidad del fluido.

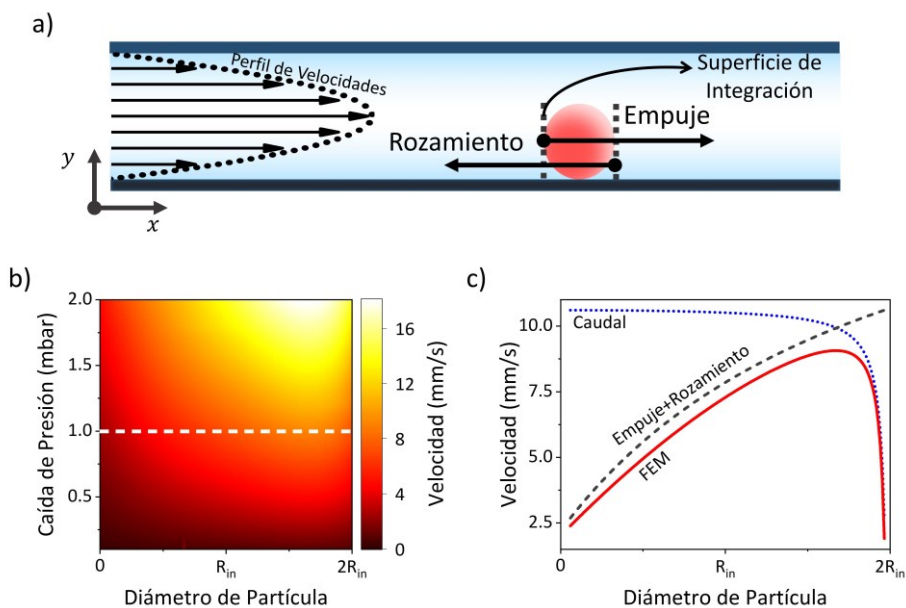


Figura 6.4.: Modelo de la componente axial de la fuerza hidrodinámica. a) Representación esquemática de las fuerzas que actúan sobre la partícula. b) Velocidad límite calculada mediante elementos finitos en función de la caída de presión y el tamaño de la partícula. c) Sección del mapa de colores anterior (línea discontinua blanca), para una diferencia de presión fija. Comparación de la velocidad límite simulada mediante elementos finitos (línea roja sólida) y la velocidad obtenida mediante el modelo analítico (líneas punteadas).

Para comprobar la validez de este modelo se simula por el método de elementos finitos (FEM, Comsol Multiphysics, módulos de flujo laminar y mecánica estructural) en el corte longitudinal en dos dimensiones una partícula esférica que se puede mover libremente dentro de un tubo lleno de agua, con unas dimensiones que reproducen las condiciones experimentales. Entre los extremos de este tubo se establece una diferencia de presión (caída de presión) y se coloca la partícula separada $1 \mu\text{m}$ de la pared del tubo para evitar problemas de convergencia. Esta simulación se calcula en dos pasos. En primer lugar, se calcula el campo de velocidades (estacionario) con la partícula fija. En un segundo paso, este resultado se utiliza como valor inicial para una simulación en función del tiempo en la que se deja la partícula libre. La partícula empieza a moverse en la dirección axial aumentando su velocidad hasta que alcanza un valor constante, velocidad límite. Esta velocidad límite obtenida mediante las simulaciones es análoga a la velocidad medida experimentalmente a través del tiempo de tránsito. Esta simulación se repite secuencialmente variando tanto el diámetro de la partícula como la caída de

presión para obtener el valor de la velocidad límite (Fig. 6.4b). El resultado de estas simulaciones muestra que, para un tamaño de partícula fijo la velocidad crece linealmente con la caída de presión, como cabría esperar por el modelo propuesto. Por otra parte, si se mantiene fija la caída de presión mientras se varía el tamaño de la partícula la velocidad de las partículas crece de manera monótona con el radio hasta un cierto valor, $\sim 3/4$ del diámetro del tubo. Para diámetros más grandes, la velocidad de la partícula comienza a decrecer hasta hacerse nula para el caso en el que diámetro de tubo y de partícula sean iguales.

Esta disminución en la velocidad límite para partículas grandes parece contradecir el modelo analítico. Sin embargo, se debe a un fenómeno que es compatible con dicho modelo: las partículas grandes obstruyen parcialmente el microcanal reduciendo el caudal. Esta reducción en el caudal implica una reducción en la velocidad del fluido (u_0), factor directamente proporcional a la velocidad límite. Esta reducción del caudal se puede modelizar como un incremento de la resistencia del sistema hidráulico, causado por la partícula. De esta manera, a la resistencia total del sistema hidráulico se le sumará una resistencia efectiva causada por el paso de la partícula en la zona suspendida. Aplicando la ley de Poiseuille (Ec. 1.116) se puede calcular la resistencia efectiva como la resistencia de una tubería cilíndrica de longitud igual a la del diámetro de la partícula y una sección transversal igual a la diferencia entre la sección transversal del tubo y la de la partícula, lo que permite obtener el valor de la velocidad del fluido (Ec. 6.5).

$$u_0 \propto \Delta p \left(1 - \frac{R_{part}}{R_{in}^2 - R_{part}^2} \right) \quad (6.5)$$

De esta manera, el efecto de obstrucción es despreciable cuando las partículas tienen un tamaño pequeño (el caudal se mantiene constante) mientras que se hace notable cuando las partículas tienen un tamaño comparable al diámetro del microcanal (línea azul punteada en Fig. 6.4c). Cuando se tiene en cuenta este efecto el modelo analítico se encuentra en muy buen acuerdo con las simulaciones (Fig. 6.4c).

Nótese, que este fenómeno hace que exista una misma velocidad para dos partículas de tamaños muy distintos. *A priori*, esta duplicidad impediría la distinción inequívoca entre partículas de distintos diámetros. Sin embargo, desde una perspectiva experimental este fenómeno no supone un problema ya que deben evitarse las partículas de tamaños próximos al diámetro del canal ya que producen atascos con gran facilidad.

6.4. Espectrometría hidrodinámica de partículas

Para comprobar la validez del modelo desarrollado en los epígrafes anteriores, se introduce en el dispositivo mezclas de micropartículas de sílice $6.8\ \mu\text{m}$ y de PMMA $12.4\ \mu\text{m}$ en suspensión acuosa (tabla 5.1.), mientras se miden simultáneamente las señales mecánica y óptica. El análisis de la señal mecánica permite medir tanto el cambio en frecuencia producido por cada partícula como el tiempo de tránsito de la misma, con lo que se puede calcular la masa boyante y la velocidad de la partícula. Se ha elegido este par de partículas teniendo en cuenta que ambas poblaciones no solo presentan diámetros muy distintos, sino que, además, ambas se distinguen de manera inequívoca a través de su masa boyante y del cambio en reflectividad. De esta manera, se puede asociar a cada evento en la señal mecánica un tipo de partícula, siendo las de PMMA aquellas que producen un mayor cambio en frecuencia. Atendiendo a las medidas realizadas con anterioridad, se establece como criterio de distinción que, todo evento con una masa boyante superior a $175\ \text{pg}$ (cambio en frecuencia de $-65\ \text{Hz}$) se corresponde con partículas de PMMA, mientras que, si el evento da una masa inferior, se trata de una micropartícula de sílice $6.8\ \mu\text{m}$ (Fig. 6.5a).

Para las medidas de la velocidad de la mezcla de partículas, se conecta en serie al RMT un resistor microfluídico de $7.8\ \text{mbar}\cdot\text{s/nL}$ fabricado en PDMS (véase epígrafe 2.3.) y se establece una diferencia de presión entre los extremos del dispositivo. Con el fin de mejorar la reproducibilidad de las medidas, se espera 5 minutos antes de la obtención de las medidas de la señal mecánica para asegurar un flujo estacionario. Estas medidas se repiten aplicando distintas diferencias de presión entre los extremos del dispositivo. Los resultados obtenidos muestran que, como predice el modelo, las micropartículas de mayor diámetro, son aquellas que presentan una velocidad media mayor mientras que, las partículas de menor diámetro presentan velocidades más lentas (Fig. 6.5b). Además, el valor medio de la velocidad aumenta de manera lineal con la diferencia de presión aplicada.

Para comparar los resultados experimentales con los de las simulaciones anteriores (epígrafe 6.3.), se representa la velocidad medida de cada partícula (puntos en Fig. 6.5c) y la velocidad límite obtenida en las simulaciones por elementos finitos (líneas continuas en Fig. 6.5c) en función del caudal. Nótese que no se pueden comparar la presión aplicada en las simulaciones con la diferencia de presión aplicada experimentalmente entre los extremos del dispositivo, por lo que es necesario calcular el caudal para comparar ambos

resultados. En el caso de los experimentos, el caudal se obtiene a través de la diferencia presión aplicada y el valor de la resistencia microfluídica utilizada mientras que, en el caso de las simulaciones, el caudal se calcula integrando el perfil de velocidades en la sección transversal del tubo. Esta comparación entre los resultados experimentales y las simulaciones demuestran la validez del modelo propuesto y confirman que la medida de la velocidad puede aportar información sobre el tamaño de las partículas.

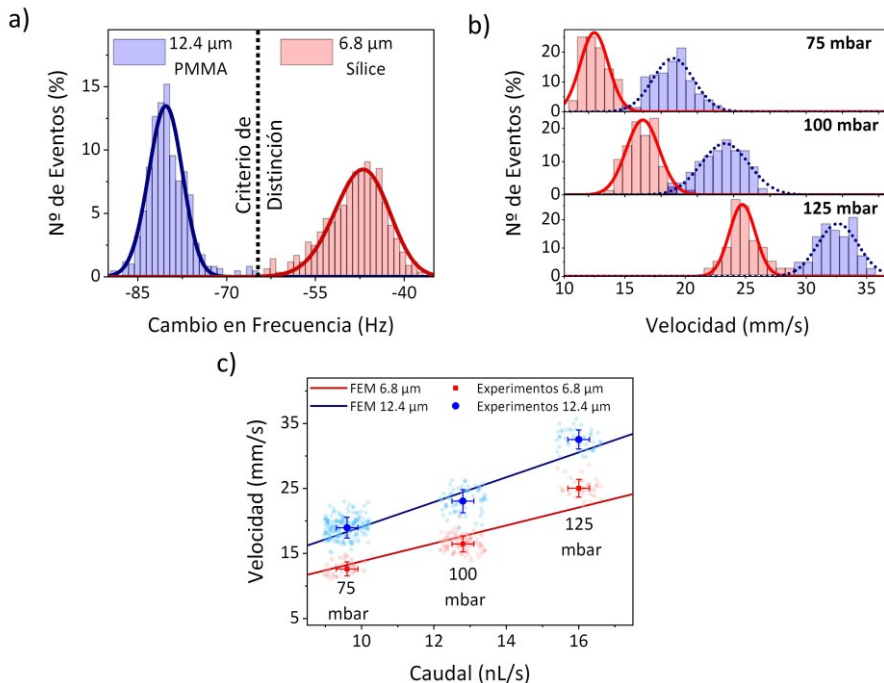


Figura 6.5.: Medida de la velocidad de las partículas en función del tamaño y la diferencia de presión. a) Distribución en masa boyante de las dos poblaciones de partículas y criterio de distinción entre ambas. b) Distribuciones de velocidad medidas para las mezclas de partículas a distintas diferencias de presión. Aplicando el criterio de distinción se pueden marcar las partículas de sílice 6.8 μm (barras rojas) y las de PMMA 12.4 μm (barras azules) c) Velocidad medida experimentalmente para las partículas en función del caudal (círculos azules para partículas de PMMA y cuadrados rojos para partículas de sílice 6.8 μm), los puntos de mayor tamaño y color más oscuro representan el valor medio de cada población de partículas y valor esperado según las simulaciones de elementos finitos (líneas continuas).

Los parámetros de cambio en frecuencia y velocidad obtenidos a través del análisis de la señal mecánica se pueden complementar con el cambio en reflectividad obtenido mediante el análisis de la señal óptica, lo que permite representar las medidas de las partículas como una dispersión tridimensional de puntos (espectro mecano-opto-fluídico, Fig. 6.6). Esta distinción multiparamétrica hace que la técnica propuesta sea aún más robusta y versátil, con la ventaja añadida de que, como la velocidad solo depende del tamaño de

las partículas, se podrá conocer si las diferencias en masa boyante y reflectividad de poblaciones distintas de partículas se deben a que están formadas por distintos materiales o si, por el contrario, están formadas por el mismo material y tienen tamaños diferentes.

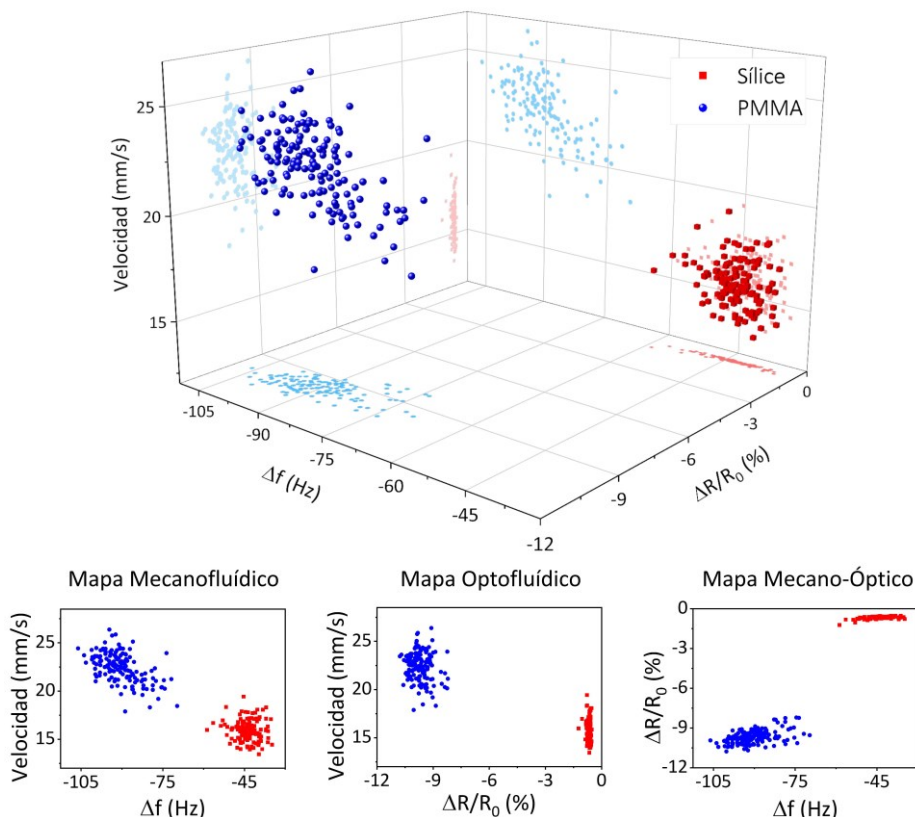


Figura 6.6.: Espectro Mecano-opto-fluídico de una mezcla de partículas. Medida simultánea de cambio en frecuencia, cambio en reflectividad y velocidad para una mezcla de micropartículas de sílice 6.8 μm y PMMA 12.4 μm imponiendo un caudal de 13 nL/s, representadas como una nube de puntos tridimensional (arriba) y las proyecciones bidimensionales de estos puntos (abajo).

6.5. Medida de longitud de partículas: análisis de la señal óptica

En los epígrafes anteriores se ha conseguido medir la velocidad de la partícula a través de la señal mecánica, lo que ha permitido obtener información sobre su tamaño a través del estudio de las fuerzas hidrodinámicas. Sin embargo, dado que el valor de la velocidad de la partícula depende tanto del tamaño de estas como del caudal, este principio de medida puede llevar a la malinterpretación del tamaño de la partícula si el caudal varía. A pesar de mantener una diferencia de presión fija, el caudal dentro del dispositivo puede

variar, ya sea por las propias fluctuaciones del sistema de bombeo (± 1 mbar) o bien porque se produzcan atascos dentro del dispositivo.

Para evitar este problema se puede complementar el análisis de la duración temporal del evento en la señal mecánica con el análisis de la duración en la señal óptica, permitiendo así eliminar la dependencia con el caudal en la medida de tamaños. La forma de doble gaussiana característica del cambio en reflectividad producido por la dispersión de luz que ocasiona el paso de una partícula (véase capítulo 5) presenta dos mínimos que se corresponden con los extremos de la partícula alineados con el centro del haz (simulación por elementos finitos, Fig. 6.7a). De esta manera, el tiempo transcurrido entre ambos mínimos (Δt) será igual al producto de la velocidad por el diámetro de la partícula $\Delta t = 2R_{part}/v$. Por lo tanto, la medida del tiempo transcurrido entre estos dos mínimos en la señal óptica permitirá determinar el radio de una partícula cuando se combina con la medida del tiempo de tránsito obtenido en la señal mecánica (Ec. 6.6).

$$R_{part} = L \frac{\Delta t}{2t_T} \tag{6.6}$$

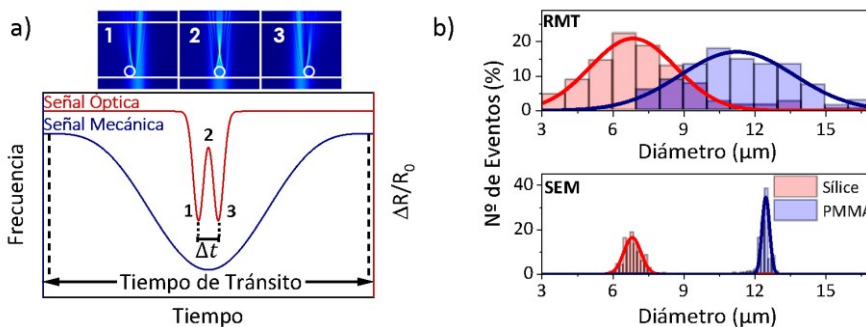


Figura 6.7.: Determinación de la longitud de la partícula. a) (arriba) Simulaciones por elementos finitos. Intensidad de luz dentro del capilar para distintas posiciones de la partícula (abajo) Relación entre señal mecánica, óptica y velocidad de la partícula. **b)** Diámetro de las partículas medidas con esta técnica (arriba) comparada con el diámetro medido mediante SEM (abajo).

Al aplicar este método de medida a las dos poblaciones de partículas estudiadas en este capítulo, se obtiene un valor de $7 \pm 2 \mu\text{m}$ para las partículas de sílice y $11 \pm 2 \mu\text{m}$ para las micropartículas de PMMA (histograma en la parte superior de la Fig. 6.7b). El valor medio de estos resultados se encuentra en buen acuerdo con los obtenidos mediante el análisis de imágenes de microscopía electrónica (histograma en la parte inferior de la Fig. 6.7b). La gran dispersión obtenida en estos datos se puede atribuir al pequeño tamaño de las partículas empleadas: cuanto menor es el radio de una partícula estos dos mínimos

locales están peor definidos (epígrafe 5.3., Fig. 5.4) y la determinación del parámetro Δt tendrá un mayor error. Más adelante (capítulo 7) se mostrará que para partículas de mayor tamaño la dispersión en tamaños medida con esta técnica se ajusta mejor al resultado obtenido mediante el análisis de imágenes de microscopía.

6.6. Conclusiones

En este capítulo se ha propuesto la medida de la duración temporal de los eventos de paso de partículas en las señales mecánica y óptica para obtener información sobre el tamaño de las mismas que se pueda complementar con los datos de masa boyante y reflectividad obtenidos mediante el máximo cambio de dichas señales. Cabe resaltar que estas nuevas medidas no requieren ningún cambio en el sistema de transducción óptico ni en los dispositivos fabricados.

Se ha demostrado que la duración del evento mecánico se puede relacionar de manera directa con la velocidad que tienen las partículas al atravesar la región suspendida del dispositivo. Esta velocidad está directamente relacionada a su vez con la geometría de las partículas por lo que se ha desarrollado un modelo analítico basado en el cálculo de las fuerzas hidrodinámicas resultantes sobre una partícula. En el modelo desarrollado, las partículas introducidas en el dispositivo experimentan una fuerza que se puede descomponer en una componente paralela a la dirección del flujo (dirección axial) y otra componente ortogonal a esta (dirección radial). En el caso de las fuerzas radiales, se ha demostrado –tanto con simulaciones como experimentalmente– que producen un desplazamiento lateral en las partículas, lo que finalmente produce que estas se encuentren en contacto con la pared del capilar cuando pasan por la región suspendida. Aunque este ordenamiento pasivo de las partículas no tiene un efecto directo en las medidas de las señales mecánica y óptica, permite una fácil interpretación de los resultados de velocidad de las partículas y de cambio en reflectividad. En ausencia de este fenómeno, las partículas ocuparían posiciones aleatorias dentro del tubo capilar, lo que produciría una gran dispersión en los datos de velocidad y reflectividad, haciendo más difícil la distinción entre distintas poblaciones de partículas.

Por su parte, la componente axial de la fuerza produce el desplazamiento de las partículas siguiendo la dirección del flujo. Cuando las partículas pasan por la zona suspendida la fuerza neta resultante en esta componente es nula debido a que las dos fuerzas que actúan en esta dirección (empuje y rozamiento) se encuentran equilibradas, lo que produce que las partículas se muevan con una

velocidad constante (velocidad límite). Como ambas fuerzas dependen de la geometría de la partícula, la velocidad medida para cada partícula se puede relacionar directamente con su tamaño, razón por la que se ha desarrollado un modelo analítico que permita conocer la relación entre ambos parámetros. La validez de este modelo se ha contrastado con simulaciones por el método de elementos finitos, mostrando que la velocidad límite depende linealmente con el caudal aplicado mientras que crece con el cubo del radio de la partícula (hasta un cierto punto). Asimismo, las medidas experimentales realizadas con micropartículas de distintos diámetros reproducen el comportamiento previsto por el modelo teórico, lo que corrobora su validez.

Al margen del análisis de las fuerzas hidrodinámicas también se ha demostrado que la medida del tiempo entre los dos mínimos registrados en la señal óptica cuando una partícula pasa bajo la zona iluminada se pueden utilizar para determinar de manera más directa el tamaño de la partícula. Esto se debe a que ambos mínimos se corresponden con sendos extremos de la partícula alineados con el centro del haz láser. Al registrar la diferencia de tiempo entre estos dos puntos se puede calcular el tamaño de la partícula si se conoce el valor de la velocidad (la cual ha sido previamente obtenida a través del análisis de la señal mecánica). Este método presenta como principal ventaja frente al análisis de las fuerzas hidrodinámicas el hecho de que este es independiente de las variaciones en el caudal.

Los métodos mostrados en este capítulo permiten introducir un tercer parámetro adicional en las medidas de las partículas, consiguiendo una distinción más precisa de partículas mediante su representación en forma de dispersión de puntos tridimensional. Además, conocer de manera directa el tamaño de cada partícula permitirá calcular parámetros intensivos de cada partícula como la densidad de masa o el índice de refracción.

Bibliografía

- 1 Martín-Pérez, A. et al. Mechano-Optical Analysis of Single Cells with Transparent Microcapillary Resonators. *ACS Sensors* **4**, 3325-3332, doi:10.1021/acssensors.9b02038 (2019).
- 2 Weng, Y. et al. Mass sensors with mechanical traps for weighing single cells in different fluids. *Lab on a Chip* **11**, 4174-4180, doi:10.1039/C1LC20736A (2011).

- 3 Bryan, A. K. *et al.* Measuring single cell mass, volume, and density with dual suspended microchannel resonators. *Lab on a Chip* **14**, 569-576, doi:10.1039/C3LC51022K (2014).
- 4 Grover, W. H. *et al.* Measuring single-cell density. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 10992-10996, doi:10.1073/pnas.1104651108 (2011).
- 5 Volpe, A., Gaudioso, C. & Ancona, A. Sorting of Particles Using Inertial Focusing and Laminar Vortex Technology: A Review. *Micromachines* **10**, 594 (2019).
- 6 Carey, T. R., Cotner, K. L., Li, B. & Sohn, L. L. Developments in label-free microfluidic methods for single-cell analysis and sorting. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **11**, e1529-e1545, doi:10.1002/wnan.1529 (2019).
- 7 Amini, H., Lee, W. & Di Carlo, D. Inertial microfluidic physics. *Lab on a Chip* **14**, 2739-2761, doi:10.1039/C4LC00128A (2014).
- 8 Di Carlo, D., Edd, J. F., Humphry, K. J., Stone, H. A. & Toner, M. Particle Segregation and Dynamics in Confined Flows. *Physical Review Letters* **102**, 094503, doi:10.1103/PhysRevLett.102.094503 (2009).
- 9 Martín-Pérez, A. *et al.* Hydrodynamic assisted multiparametric particle spectrometry. *Scientific Reports* **11**, 3535, doi:10.1038/s41598-021-82708-0 (2021).
- 10 SegrÉ, G. & Silberberg, A. Radial Particle Displacements in Poiseuille Flow of Suspensions. *Nature* **189**, 209-210, doi:10.1038/189209a0 (1961).

Capítulo 7:

Detección y Caracterización de Células

En los capítulos anteriores se ha presentado un método para caracterizar micropartículas en suspensión en un medio acuoso a partir de sus propiedades físicas. Tal y como se ha comentado anteriormente, una técnica como la presentada en esta tesis cuenta con potenciales aplicaciones en campos muy diversos (nanofabricación, control medioambiental, etc.). Sin embargo, teniendo en cuenta sus propiedades descritas en los capítulos anteriores, los resonadores microcapilares transparentes (RMT) resultan especialmente prometedores para aplicaciones en biología y medicina. Algunas técnicas, como la espectrometría de masa nanomecánica, permiten la medida de diferentes propiedades (como masa y rigidez) de los analitos biológicos¹ pero requieren condiciones de alto vacío e incluso, temperaturas criogénicas². Determinados analitos biológicos, como proteínas, resisten tales condiciones de presión y temperatura; sin embargo, otras entidades más complejas, como células animales u organismos unicelulares, son muy susceptibles a cambios en las condiciones ambientales. Por ejemplo, cuando se encuentran en una atmósfera gaseosa, células y bacterias se deshidratan^{3,4}, lo que altera sus propiedades físicas, y puede concluir en su destrucción. Además de ofrecer unas condiciones de medida óptimas para este tipo de entidades biológicas complejas, también existen muchas muestras de interés clínico compuestas por coloides. El ejemplo más representativo de este tipo de muestras es la sangre, que se compone de una mezcla de diferentes células (principalmente, eritrocitos, leucocitos y trombocitos) suspendidos en una disolución acuosa (plasma sanguíneo). Por lo tanto, disponer de técnicas que permitan la caracterización de este tipo de muestras sin necesidad de ningún tratamiento previo (como podría ser la separación por centrifugado) no solo permitirá caracterizar células en las mejores condiciones desde el punto de vista

biológico, sino que además simplifica este tipo de análisis y los hace más rápidos.

La técnica más extendida en el ámbito clínico para el análisis de células en suspensión acuosa es la citometría de flujo, que consiste en hacer pasar la muestra por un tubo capilar de vidrio. En un cierto punto del capilar, se enfoca un haz de luz y se recoge la intensidad de luz transmitida por el tubo. Esta intensidad cambiará cuando una célula pase por la zona iluminada, lo que permitirá caracterizar las distintas células presentes en la muestra⁵, permitiendo una alta eficiencia de medida (miles de células por minuto). Además, mediante el uso de marcadores fluorescentes, la citometría de flujo puede conseguir el estudio simultáneo de decenas de propiedades de células individuales⁶. No obstante, a pesar de ofrecer análisis precisos y multiparamétricos, el uso de marcadores fluorescentes no siempre resulta adecuado para el estudio de procesos biológicos ya que éstos pueden interferir en el ciclo de vida celular. Por esta razón, el desarrollo de técnicas que permitan una caracterización de analitos biológicos libre de marcadores ha atraído el interés de la biofísica y la nanotecnología en los últimos años. En este aspecto, se ha demostrado que las propiedades físicas de células están estrechamente relacionadas con aspectos como la concentración de proteínas⁷, el tipo de línea celular⁸⁻¹⁰, o la etapa del ciclo celular en el que se encuentran¹¹⁻¹³.

Los resonadores mecánicos con microcanales integrados (SMR) se han propuesto como alternativa, siendo una técnica muy versátil para el análisis celular ya que permiten una caracterización sin necesidad de emplear marcadores, pudiendo medir en un medio fisiológico propiedades físicas de interés como, masa¹⁴, densidad^{15,16}, compresibilidad¹¹ o deformabilidad^{8,17,18}. Asimismo, se ha demostrado que este tipo de sensores son capaces de seguir en tiempo real distintos procesos biológicos midiendo el ritmo de crecimiento de células y estudiando el efecto de distintos fármacos sobre este parámetro⁹. Los resonadores basados en capilares de vidrio prometen ser de gran utilidad en este aspecto, habiendo demostrado ya que pueden utilizarse para caracterizar microorganismos unicelulares de gran tamaño (*Paramecium Aurelia*, ~10 ng)¹⁹. No obstante, para poder medir partículas de mayor interés en medicina (p. ej. células animales) es necesario conseguir reducir el límite de detección de estos dispositivos ya que la masa boyante de estas se encuentra en torno a ~100 pg. Por esta razón, los dispositivos desarrollados en esta tesis resultan ideales para la caracterización de células, con la ventaja adicional de permitir obtener de manera simultánea información sobre el tamaño y las propiedades ópticas de las células.

En este capítulo, se han aplicado los métodos presentados en los capítulos 5 y 6 para caracterizar mediante sus propiedades físicas dos líneas celulares de tejido mamario humano, siendo una línea sana (MCF-10A) y otra de adenocarcinoma (MCF-7).

7.1. Preparación y caracterización previa de células

Las células empleadas en estos experimentos fueron cultivadas en el laboratorio de Bionanomecánica del Instituto de Micro y Nanotecnología del CSIC. Para estos cultivos se han empleado las líneas celulares MCF-7 y MCF-10A comercialmente disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC, EE.UU.). Las células de la línea MCF-7 fueron cultivadas usando el medio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Life Technologies Corporation, EE.UU.) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS), 500 U/mL de penicilina y 0.1 mg/mL de estreptomina. Por otra parte, las células de la línea MCF-10A fueron cultivadas en el medio HAM-F12 (Gibco) suplementado con un 5% de suero equino, 20 ng/mL factor de crecimiento epidérmico, 0.5 µg/mL de hidrocortisona, 100 ng/mL de toxina colérica, 10 µg/mL de insulina, 500 U/mL de penicilina y 0.1 mg/mL de estreptomina. Ambas líneas celulares se mantienen a 37° C en una incubadora humidificada con una atmósfera al 5% de dióxido de carbono.

Tras su cultivo, se añade tripsina a las células y se resuspenden en sus respectivos medios de cultivo (DMEM para MCF-7 y HAM-F12 para MCF-10A). Seguidamente, se realiza un centrifugado suave de las células y estas se resuspenden en un cierto volumen de tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés «phosphate-buffered saline») con un 5% de dimetil sulfóxido (DMSO) tal que se consiga una concentración de 10^6 células/mL. La introducción de DMSO en el medio de medida de las células permite que estas sean menos propensas a la formación de agregados. Las células se miden inmediatamente después de su resuspensión en el medio de medida.

Una vez cultivadas las células, se caracteriza su distribución de tamaños. A diferencia de las micropartículas (capítulo 5), las células no pueden caracterizarse utilizando el microscopio electrónico de barrido (SEM) debido a las condiciones de vacío. Por esta razón, la caracterización de las células se realizará mediante un microscopio óptico, que permite obtener imágenes de las células inmersas en un medio acuoso. Para la obtención de dichas imágenes

se coloca en el microscopio una muestra de cada una de las líneas celulares suspendidas en PBS con un 5% de DMSO y se toman imágenes de las células a medida que precipitan en la superficie del recipiente que contiene la muestra. Las imágenes obtenidas se analizan de igual manera que las obtenidas por SEM. Este análisis muestra que ambas líneas celulares presentan una distribución de diámetros gaussiana, presentando la línea MCF-10A un diámetro medio de $17 \pm 2 \mu\text{m}$ con una desviación de $\pm 2 \mu\text{m}$ y la línea MCF-7 un diámetro medio de $19 \mu\text{m}$ con una desviación de $\pm 3 \mu\text{m}$ (Fig. 7.1a.). El análisis de estas imágenes muestra que la línea MCF-7 forma agregados con mayor frecuencia que la línea MCF-10A (Fig. 7.1b).

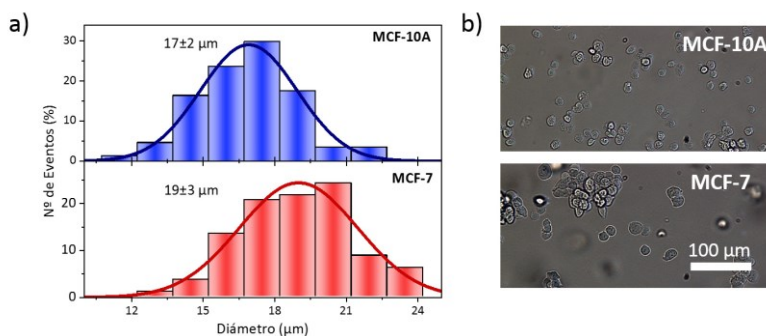


Figura 7.1.: Caracterización morfológica de las líneas celulares empleadas. a) Distribuciones de tamaños medidas mediante el análisis de imágenes de microscopía óptica para las líneas celulares MCF-10A (arriba, barras azules, $N=178$) y MCF-7 (abajo, barras rojas, $N=196$). Las líneas continuas representan el ajuste de la distribución a una gaussiana. **b)** Imágenes de microscopía óptica de la línea celular MCF-10A (arriba) y la línea MCF-7 (abajo). Ambas imágenes están tomadas con la misma magnificación.

7.2. Espectrometría mecano-óptica de células: distinción entre células sanas y tumorales

En los capítulos anteriores se ha demostrado la utilidad de la técnica propuesta utilizando micropartículas como muestra de calibración. Con dichas partículas se ha conseguido realizar una distinción inequívoca dado que se trataba de partículas de materiales y tamaños distintos. Sin embargo, en el caso de dos líneas celulares del mismo tejido (MCF-10A y MCF-7), la distinción mediante la medida de parámetros biofísicos resulta especialmente desafiante dado que, al ser células del mismo tejido, todas sus propiedades físicas (tamaño, densidad e índice de refracción) tendrán valores similares.

Para este estudio se prepara una suspensión acuosa con cada una de estas líneas celulares y se hacen pasar por uno de los dispositivos fabricados* mientras se mide de manera simultánea la señal óptica y la señal mecánica del dispositivo en función del tiempo. Cuando una célula pasa por la región suspendida del dispositivo produce un cambio tanto en la señal mecánica como en la señal óptica análogos a los medidos con la micropartículas (Fig. 7.2), lo que justifica el empleo de esta técnica y la utilización del mismo análisis de los datos que en el caso de las micropartículas. Cabe destacar que, dado el gran tamaño de las células empleadas (entre 12 μm y 24 μm), los eventos medidos en la señal óptica muestran dos mínimos muy bien definidos (Fig. 7.2b).

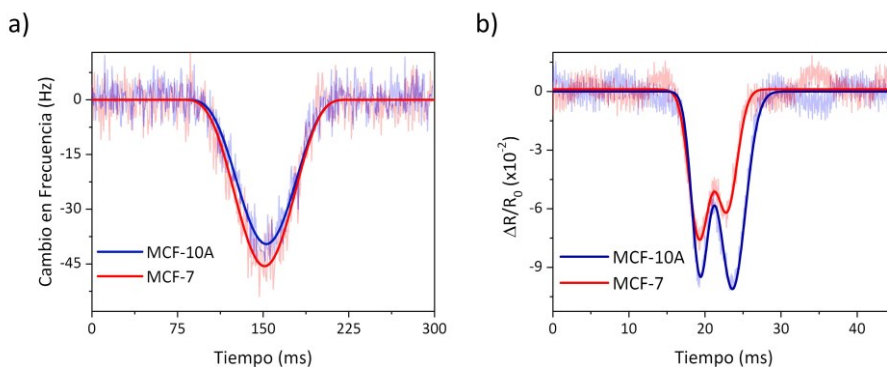


Figura 7.2.: Detección mecano-óptica de células. a) Cambio en la señal mecánica producido por el paso de una célula MCF-10A (azul) y otra MCF-7 (rojo). Las líneas de color menos intenso representan la medida experimental mientras que las líneas de color más intenso representan el ajuste a la forma del modo al cuadrado. **b)** Cambio en la señal óptica producida por el paso de una célula MCF-10A (azul) y otra MCF-7 (rojo). Las líneas de color más claro representan la medida experimental mientras que las líneas de color más oscuro representan el ajuste a una gaussiana doble.

Tras medir secuencialmente ambas líneas celulares se obtiene que la línea MCF-10A presenta una masa boyante de 133 ± 75 pg, mientras que la línea MCF-7 presenta una masa boyante de 128 ± 100 pg. Estos valores se encuentran en buen acuerdo con las distribuciones de tamaños medidas por microscopía óptica (Fig. 7.1) y el valor de la densidad de las células descrito en la literatura ~ 1.05 g/mL²⁰. Debido al gran parecido tanto en tamaño como en densidad, las distribuciones en masa boyante solapan y no resulta posible distinguir de manera inequívoca entre estas dos líneas celulares (Fig. 7.3.).

Por otra parte, en el caso de la señal óptica se obtiene que el cambio en reflectividad es mayor para la línea celular sana ($\Delta R_{MCF-10A}/R_0 = -10.5 \pm 2.5\%$)

* El dispositivo empleado en este capítulo tiene unas dimensiones de 500 μm de longitud suspendida, 47 μm de diámetro externo y 38 μm de diámetro interno y una masa de 1.8 μg .

que para la línea tumoral ($\Delta R_{MCF-7}/R_0 = -6.0 \pm 2.0\%$). El hecho de que la línea MCF-10A produzca un cambio en reflectividad de mayor magnitud a pesar de que el tamaño de estas células es ligeramente menor que el de la línea tumoral (MCF-7, Fig. 7.1), pone de manifiesto que hay una diferencia en el índice de refracción entre ambas líneas celulares, lo que permite su distinción óptica. Esta diferencia en el índice de refracción de ambas líneas ha sido probada en trabajos previos, en los que se ha medido un índice de refracción ~ 1.36 para la línea sana y una diferencia de $\sim 10^{-2}$ con la línea tumoral, probando además que el índice de refracción en células es proporcional al contenido de proteínas⁷.

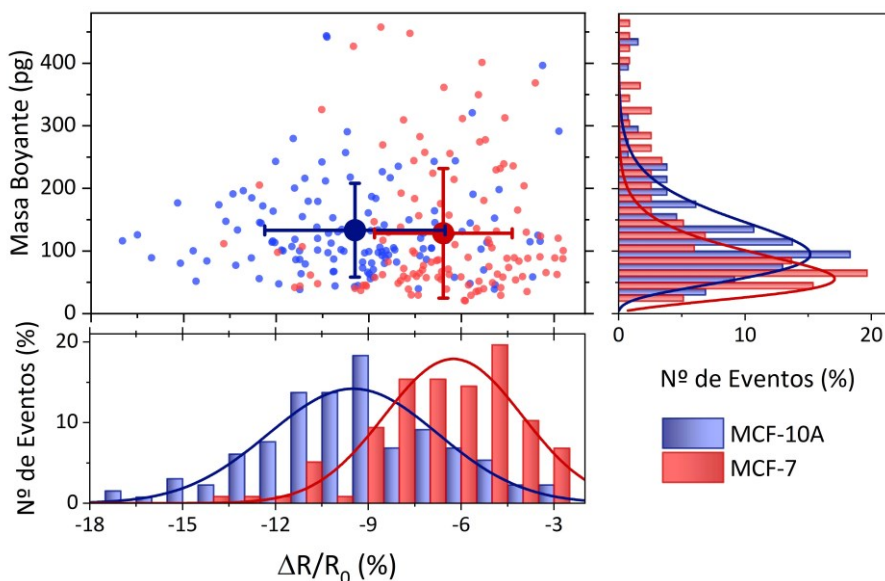


Figura 7.3.: Espectro mecano-óptico de líneas celulares. Dispersión de puntos bidimensional de la masa boyante (eje vertical) y del cambio en reflectividad normalizado (eje horizontal) producido por cada célula individual siendo las distintas poblaciones MCF-7 (puntos rojos, $N=117$) y MCF-10A (puntos azules, $N=131$). Los puntos más grandes y de color más oscuro representan el valor promedio de cada población, siendo su barra de error la desviación estándar. **Proyección vertical.** Distribución en masa boyante medida (barras) para las distintas poblaciones de células y el ajuste de las mismas (línea continua) a una distribución en masa (Ec. 5.3). **Proyección horizontal.** Distribución en cambio en reflectividad normalizado (barras) para las distintas poblaciones de células y el ajuste de las mismas (línea continua) a una distribución normal. Los agregados de partículas se han eliminado de esta representación siguiendo el criterio descrito en el epígrafe 5.2.

Cuando los datos de estas células se representan como una dispersión bidimensional de puntos (Fig. 7.3.) ambas nubes de puntos solapan en gran medida, por lo que no es posible conseguir la distinción inequívoca entre las dos líneas celulares. No obstante, se puede establecer un criterio para identificar que un evento se corresponda a un determinado tipo de línea celular

con una determinada probabilidad. Para ello, se establece como criterio de discriminación que los eventos que produzcan un cambio en reflectividad menor que un cierto umbral ($\Delta R_{umb}/R_0$), serán células sanas (casos negativos), mientras que los valores que superen este umbral se considerarán células tumorales (casos positivos).

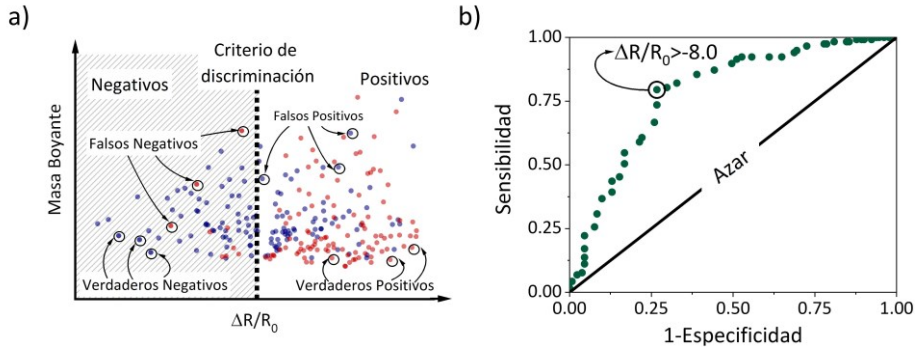


Figura 7.4.: Criterio de distinción entre líneas celulares. a) Concepto del análisis ROC. **b)** Curva ROC obtenida con las medidas de células (puntos verdes). La línea muestra el límite por debajo del cual el sensor no es más útil que una clasificación al azar.

Para determinar el valor óptimo de este umbral se realiza un análisis de la curva característica operativa del receptor (ROC, por sus siglas en inglés «receiver operating characteristic»). En esta curva se representará la sensibilidad[†] en función de la especificidad[‡] para los distintos valores del umbral (Fig. 7.4a), siendo el caso de distinción inequívoca aquel en el que sensibilidad y especificidad son iguales a 1. Como en este caso la distinción inequívoca no es posible, el valor óptimo del umbral de distinción será aquel cuyos valores se acerquen más a este punto. Al representar la curva ROC a partir de los datos obtenidos anteriormente, se obtiene que el umbral de discriminación óptimo es $\Delta R_{umb}/R_0 = -8.0\%$, con el que se consigue una precisión del 76% y una sensibilidad del 80% para distinguir entre estas líneas celulares (Fig. 7.4b). Además de este criterio de distinción basado únicamente en el análisis del dato de la reflectividad, también se han probado otros criterios basados en la masa boyante y en la combinación simultánea de datos de masa boyante y reflectividad. Sin embargo, esos criterios dieron valores de sensibilidad y especificidad mucho menores que los obtenidos con el criterio óptico.

[†] Se define la sensibilidad como la relación entre la suma del número de verdaderos positivos y verdaderos negativos entre el número total de eventos.

[‡] Se define la especificidad como la relación entre el número de verdaderos positivos entre el total de eventos positivos.

La especificidad y sensibilidad obtenidas demuestran que esta técnica puede utilizarse para la distinción libre de marcadores entre células sanas y enfermas, a pesar de que esta tecnología puede optimizarse aún más para este tipo de análisis.

7.3. Medida de la densidad en células

En el epígrafe anterior se ha demostrado que la medida del espectro mecano-óptico permite la distinción entre las dos líneas celulares (MCF-7 y MCF-10A) con una cierta precisión. El método desarrollado en esta tesis permite medir también el diámetro de estas células (epígrafe 6.5). Ambas líneas celulares presentan prácticamente la misma distribución de tamaños (Fig. 7.1) por lo que la determinación del tamaño de estas con el método desarrollado no permitirá una distinción más precisa. Sin embargo, tanto el tamaño de las células como su densidad son parámetros de gran interés biofísico, por lo que la medida de éstos parámetros puede aportar información adicional sobre las muestras analizadas, siendo las células de mayor tamaño aquellas que se encuentran en un estadio más avanzado del ciclo de vida celular. Asimismo, en trabajos previos se ha demostrado que la densidad se mantiene constante en las células hasta que comienzan la mitosis: momento en el que la densidad empieza a disminuir por el rápido aumento del volumen^{21,22}, lo que demuestra su interés biofísico.

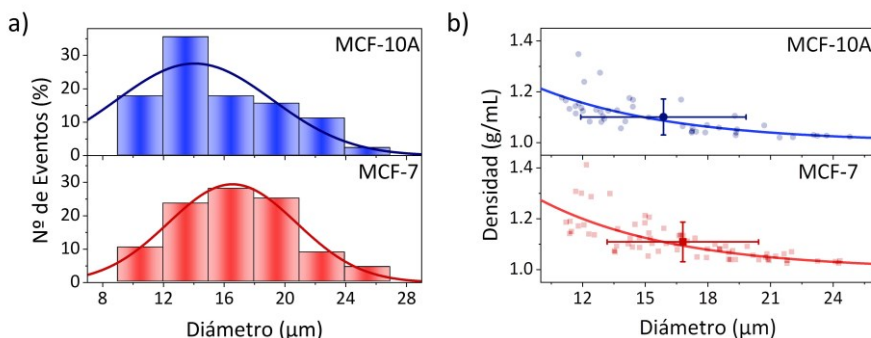


Figura 7.5. Medida de la densidad de líneas celulares. **a)** Distribución de tamaños medida con los dispositivos fabricados (barras) y su ajuste a una distribución normal (líneas). **b)** Densidad en función del tamaño medida para las distintas líneas celulares (puntos) y su ajuste a una función exponencial. Los puntos de mayor tamaño y color más intenso representan el valor promedio de cada población.

Tras aplicar este análisis a las medidas de las células se obtiene que estas presentan una distribución normal de tamaños con valor medio de $16 \mu\text{m}$ con una desviación de $\pm 4 \mu\text{m}$ para la línea MCF-10A y un valor medio de $17 \mu\text{m}$ y una desviación de $\pm 4 \mu\text{m}$ para la línea MCF-7 (Fig. 7.5a). Estos resultados se

encuentran en consonancia con los resultados obtenidos mediante el análisis de imágenes de microscopía (Fig. 7.1). Cabe destacar que estos datos de diámetro, al contrario que los medidos para micropartículas, presentan una dispersión similar a la medida mediante microscopía, lo cual es debido a que los eventos en la señal óptica producidos por el paso de las células presentan dos mínimos bien resueltos, permitiendo así un mejor ajuste de la curva.

Una vez se ha demostrado la buena medida del tamaño de las células se puede calcular la densidad de las mismas combinando los datos de diámetro y masa boyante. Dado que las células en suspensión presentan una forma esférica, la densidad de cada célula se puede calcular fácilmente (Ec. 7.1).

$$\rho_{cel} = \rho_{liq} + \frac{3m_b}{4\pi R_{cel}^3} \quad (7.1)$$

Siendo ρ_{cel} la densidad de la célula, ρ_{liq} la densidad del medio en el que se encuentran suspendidas las células (PBS + 5% DMSO, 1.00 g/mL), m_b la masa boyante medida y R_{cel} el radio medido de la célula.

Los resultados obtenidos en este caso muestran un valor medio de 1.10 ± 0.07 g/mL para la línea MCF-10A y de 1.10 ± 0.08 g/mL para la línea MCF-7 (Fig. 7.5b), lo que se encuentra en buen acuerdo con los valores medidos en trabajos anteriores²⁰. Tal y como se ha anticipado anteriormente, cuando se representa la densidad de cada célula en función de su tamaño se aprecia una correlación entre tamaño y densidad, mostrando que la densidad decrece con el diámetro. Este resultado está de acuerdo con lo mostrado por trabajos anteriores en los que se ha estudiado la densidad de células en función de su etapa en el ciclo de vida celular^{21,22}.

7.4. Conclusiones

En este capítulo se ha utilizado el sistema experimental, los dispositivos y los métodos de análisis desarrollados a lo largo de los capítulos anteriores para medir múltiples propiedades físicas (masa boyante, reflectividad, tamaño y densidad) de dos líneas celulares del mismo tejido, siendo una de estas líneas sana (MCF-10A) y la otra tumoral (MCF-7). Se ha demostrado que la medida de la reflectividad permite distinguir entre ambas líneas celulares con una sensibilidad del 80%. Nótese que el valor de la sensibilidad es bastante alto teniendo en cuenta que se trata de una distinción libre de marcadores entre dos líneas celulares del mismo tipo de tejido (todas sus propiedades físicas son muy parecidas). En el caso de células de distintos tejidos esta distinción podría

llegar a ser inequívoca. En cuanto a la medida de la masa boyante, no ha permitido distinguir entre las dos líneas celulares ya que, debido al gran parecido en tamaño y densidad de ambas líneas, las distribuciones en masa se superponen. A pesar de esto, la masa sigue siendo un parámetro muy interesante para la distinción de células ya que podría permitir la distinción entre células de distintos tejidos.

Por otra parte, también se ha medido la densidad de células individuales aprovechando las medidas de tamaño y masa boyante aportados por las medidas de la señal mecánica y óptica. Al igual que la masa, el valor de la densidad no ha permitido una distinción entre la línea celular sana y la tumoral. Sin embargo, se ha demostrado que este parámetro es muy interesante desde un punto de vista biofísico ya que se ha probado que existe una correlación entre el tamaño de las células y su densidad siendo las células más densas aquellas de menor tamaño y viceversa.

Cabe resaltar que, aunque no se han usado marcadores fluorescentes, la técnica y los dispositivos aquí propuestos son perfectamente compatibles con dicha técnica, lo que podría permitir la medida simultánea de aún más parámetros ofreciendo análisis todavía más precisos. Además, como estos dispositivos están fabricados con capilares de sílice, su integración en citómetros de flujo comerciales puede resultar sencilla.

Bibliografía

- 1 Malvar, O. *et al.* Mass and stiffness spectrometry of nanoparticles and whole intact bacteria by multimode nanomechanical resonators. *Nature Communications* **7**, 13452, doi:10.1038/ncomms13452 (2016).
- 2 Naik, A. K., Hanay, M. S., Hiebert, W. K., Feng, X. L. & Roukes, M. L. Towards single-molecule nanomechanical mass spectrometry. *Nature Nanotechnology* **4**, 445-450, doi:10.1038/nnano.2009.152 (2009).
- 3 Bateman, J. B., Stevens, C. L., Mercer, W. B. & Carstensen, E. L. Relative Humidity and the Killing of Bacteria: the Variation of Cellular Water Content with External Relative Humidity or Osmolality. *Microbiology* **29**, 207-219, doi:<https://doi.org/10.1099/00221287-29-2-207> (1962).
- 4 Gil-Santos, E. *et al.* Optomechanical detection of vibration modes of a single bacterium. *Nature Nanotechnology* **15**, 469-474, doi:10.1038/s41565-020-0672-y (2020).

- 5 Moldavan, A. PHOTO-ELECTRIC TECHNIQUE FOR THE COUNTING OF MICROSCOPICAL CELLS. *Science* **80**, 188-189, doi:10.1126/science.80.2069.188 (1934).
- 6 Perfetto, S. P., Chattopadhyay, P. K. & Roederer, M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nature Reviews Immunology* **4**, 648-655, doi:10.1038/nri1416 (2004).
- 7 Liu, P. Y. *et al.* Cell refractive index for cell biology and disease diagnosis: past, present and future. *Lab on a Chip* **16**, 634-644, doi:10.1039/C5LC01445J (2016).
- 8 Shaw Bagnall, J. *et al.* Deformability of Tumor Cells versus Blood Cells. *Scientific Reports* **5**, 18542, doi:10.1038/srep18542
<https://www.nature.com/articles/srep18542#supplementary-information>
(2015).
- 9 Cetin, A. E. *et al.* Determining therapeutic susceptibility in multiple myeloma by single-cell mass accumulation. *Nature Communications* **8**, 1613-1624, doi:10.1038/s41467-017-01593-2 (2017).
- 10 Martín-Pérez, A. *et al.* Mechano-Optical Analysis of Single Cells with Transparent Microcapillary Resonators. *ACS Sensors* **4**, 3325-3332, doi:10.1021/acssensors.9b02038 (2019).
- 11 Kang, J. H. *et al.* Noninvasive monitoring of single-cell mechanics by acoustic scattering. *Nature Methods* **16**, 263-269, doi:10.1038/s41592-019-0326-x (2019).
- 12 Blasi, T. *et al.* Label-free cell cycle analysis for high-throughput imaging flow cytometry. *Nature Communications* **7**, 10256-10264, doi:10.1038/ncomms10256 (2016).
- 13 Leblanc-Hotte, A. *et al.* On-chip refractive index cytometry for whole-cell deformability discrimination. *Lab on a Chip* **19**, 464-474, doi:10.1039/C8LC00938D (2019).
- 14 Burg, T. P. *et al.* Weighing of biomolecules, single cells and single nanoparticles in fluid. *Nature* **446**, 1066-1069, doi:10.1038/nature05741 (2007).
- 15 Grover, W. H. *et al.* Measuring single-cell density. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 10992-10996, doi:10.1073/pnas.1104651108 (2011).

- 16 Bryan, A. K. *et al.* Measuring single cell mass, volume, and density with dual suspended microchannel resonators. *Lab on a Chip* **14**, 569-576, doi:10.1039/C3LC51022K (2014).
- 17 Byun, S., Hecht, V. C. & Manalis, S. R. Characterizing Cellular Biophysical Responses to Stress by Relating Density, Deformability, and Size. *Biophys J* **109**, 1565-1573, doi:10.1016/j.bpj.2015.08.038 (2015).
- 18 Byun, S. *et al.* Characterizing deformability and surface friction of cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 7580-7585, doi:10.1073/pnas.1218806110 (2013).
- 19 Ko, J., Lee, D., Lee, B. J., Kauh, S. K. & Lee, J. Micropipette Resonator Enabling Targeted Aspiration and Mass Measurement of Single Particles and Cells. *ACS Sensors* **4**, 3275-3282, doi:10.1021/acssensors.9b01843 (2019).
- 20 Geltmeier, A. *et al.* Characterization of Dynamic Behaviour of MCF7 and MCF10A Cells in Ultrasonic Field Using Modal and Harmonic Analyses. *PLOS ONE* **10**, e0134999-e0135018, doi:10.1371/journal.pone.0134999 (2015).
- 21 Son, S. *et al.* Resonant microchannel volume and mass measurements show that suspended cells swell during mitosis. *Journal of Cell Biology* **211**, 757-763, doi:10.1083/jcb.201505058 (2015).
- 22 Zlotek-Zlotkiewicz, E., Monnier, S., Cappello, G., Le Berre, M. & Piel, M. Optical volume and mass measurements show that mammalian cells swell during mitosis. *Journal of Cell Biology* **211**, 765-774, doi:10.1083/jcb.201505056 (2015).

Conclusiones Generales

El objetivo principal de esta tesis doctoral es el desarrollo de nuevos sensores basados en microcanales suspendidos resonantes (SMR) más accesibles y que ofrezcan un análisis multiparamétrico de muestras coloidales. Para este fin se ha propuesto un nuevo concepto de fabricación de estos dispositivos basado en la integración de capilares de sílice en sustratos reflectantes de silicio mediante el uso de anclajes poliméricos fotolitografiados: los resonadores microcapilares transparentes (RMT). Dentro de esta estrategia se han probado dos métodos de fabricación distintos: uno basado en la utilización de capilares comerciales de diámetro pequeño ($65\ \mu\text{m}$) y otro basado en la reducción local del diámetro partiendo de capilares comerciales de diámetro grande ($325\ \mu\text{m}$). Tras comparar ambos procesos se ha comprobado que el método basado en la elongación térmica de capilares grandes resulta el más adecuado. Además, los dispositivos obtenidos mediante este proceso son los más pequeños y sensibles en masa (mostrando un límite de detección $\sim 500\ \text{fg}$) obtenidos hasta la fecha entre los resonadores basados en capilares de sílice. A pesar de que estos resonadores son menos sensibles en masa que los SMR tradicionales basados en micropalanca de silicio con microcanales integrados ($\sim 10\ \text{ag}$), este hecho se ve compensado por la sencillez de la fabricación y la ubicuidad de los materiales empleados.

Otro de los objetivos principales de esta tesis es el desarrollo de métodos de análisis complementarios a la medida mecánica (masa) que permitan un análisis más rápido y completo que los SMR convencionales. El diseño de los dispositivos propuestos en la presente tesis doctoral permite que estos no se comporten solo como un resonador mecánico sino también como una cavidad óptica. Esta dualidad «resonador mecánico-cavidad óptica» permite complementar la medida de la frecuencia de resonancia (señal mecánica) con una medida de la potencia de luz reflejada (señal óptica). De esta manera, cuando pasa una partícula a través del dispositivo (o cuando cambiamos el fluido) además de registrarse un cambio en la frecuencia de resonancia mecánica por el cambio de masa, también se podrá registrar un cambio en la potencia de luz reflejada como consecuencia de la luz dispersada por la

partícula (o por el cambio de índice de refracción del fluido). Para aprovechar al máximo este comportamiento dual de los dispositivos se ha propuesto utilizar un sistema de detección interferométrico, con el que se pueden seguir en tiempo real tanto la frecuencia de resonancia mecánica como la potencia de luz reflejada por el dispositivo, lo que permite la medida simultánea de dos parámetros independientes (masa boyante y cambio en reflectividad) con una eficiencia de medida alta (~ 300 partículas/min), además, la combinación de ambos parámetros permite deducir el tamaño de la partícula bajo estudio. Esta combinación de los datos de las medidas en masa con medidas ópticas (espectrometría mecano-óptica) es totalmente nueva en el ámbito de los sensores mecánicos y se ha demostrado en esta tesis que permite resolver de manera sencilla distintos problemas que había en el uso de SMR. De esta manera, la medida de la señal óptica permite diferenciar entre partículas muy distintas, aunque produzcan un cambio en masa similar, así como conocer cuántas partículas se encuentran de manera simultánea en la región suspendida del dispositivo. Cabe destacar que el interferómetro utilizado en esta tesis no tiene ninguna diferencia fundamental comparado con los interferómetros empleados habitualmente para medir la frecuencia de resonancia de un resonador mecánico y que el hecho de poder medir una señal óptica es debido a que los dispositivos están formados por un material transparente montado sobre un sustrato reflectante.

La validez del concepto de espectrometría mecano-óptica se ha demostrado midiendo los cambios producidos en las señales mecánica y óptica por distintos fluidos y por diferentes poblaciones de micropartículas en suspensión acuosa. En el caso de las micropartículas se midieron 5 poblaciones distintas entre las cuales existían varios pares de partículas en los que solapaban o bien las distribuciones de masa boyante, o bien las distribuciones de cambio en reflectividad. Sin embargo, cuando se muestran los datos en una dispersión de puntos bidimensional se consigue distinguir de manera inequívoca las 5 poblaciones, lo que pone de manifiesto la gran versatilidad de la técnica.

Por otra parte, se ha demostrado que el proceso de elongación térmica de capilares de sílice resulta especialmente ventajoso para esta técnica ya que, permite conseguir un perfil ligeramente hiperbólico en los dispositivos. Este perfil hace que el diámetro del capilar varíe en torno a $1 \mu\text{m}$ a lo largo de la región suspendida. Esta variación del diámetro resulta insignificante de cara a los efectos mecánicos e hidrodinámicos, sin embargo, abre un gran rango de posibilidades en la medida de la señal óptica. Este perfil hiperbólico produce que una variación del espesor de las distintas capas de la cavidad óptica continua a lo largo de la longitud suspendida, lo que permite optimizar la

medida simplemente con variar la posición del spot del láser a lo largo del eje del capilar. Esta característica hace que los dispositivos fabricados sean muy versátiles ya que, al contrario de una cavidad óptica de espesor constante, no es necesario fabricar el dispositivo con unas dimensiones específicas a fin de optimizar la medida para un determinado rango de índices de refracción y una determinada longitud de onda del láser. De esta manera, dado un índice de refracción del fluido, una longitud de onda del láser y unas dimensiones del dispositivo arbitrarias se podrá conseguir una medida óptima del cambio en reflectividad simplemente con hacer un barrido en la dirección axial del dispositivo y encontrando la posición en la que se maximiza la sensibilidad en cambio en reflectividad.

Además de fenómenos ópticos y mecánicos, también se han estudiado distintos efectos hidrodinámicos sobre las partículas en suspensión, lo que permite realizar un análisis de dichas partículas basado en la adquisición de tres parámetros independientes (masa boyante, cambio de reflectividad y tamaño). Para el estudio de las fuerzas hidrodinámicas que actúan sobre la partícula se ha propuesto la medida de la duración temporal de los eventos en la señal mecánica (tiempo de tránsito), posibilitando el cálculo de la velocidad de la partícula mientras atraviesa la zona suspendida del resonador. Se ha propuesto un modelo analítico que permite relacionar la velocidad de las partículas con su tamaño y se ha comprobado tanto con simulaciones por elementos finitos como con resultados experimentales. Sin embargo, la medida de la velocidad también depende del caudal dentro del microcanal, por lo que estas medidas se pueden malinterpretar en caso de un flujo inestable. Para evitar este problema se ha propuesto el análisis conjunto de la anchura en las señales óptica y mecánica, lo que permite conocer la longitud de la partícula suprimiendo la dependencia con el caudal, consiguiendo una medida del tamaño de las partículas más precisa.

Finalmente, los métodos desarrollados a lo largo de esta tesis se han aplicado para la medida de propiedades físicas de dos líneas celulares distintas de tejido epitelial mamario: una sana (MCF-10A) y otra tumoral (MCF-7). Dichas medidas han demostrado que esta técnica permite distinguir entre ambas líneas celulares con una sensibilidad del 80% a través de la medida óptica. Cabe destacar que intentar distinguir entre estas dos líneas celulares mediante parámetros biofísicos es un caso especialmente complicado ya que, al proceder del mismo tejido, todas sus propiedades físicas son muy parecidas. Además, aunque el resto de parámetros medidos de estas células (densidad y tamaño) no permitan distinguir entre las dos líneas celulares, resultan de gran interés biofísico. El tamaño y la densidad dependen del momento del ciclo de vida

celular en el que se encuentre cada célula individual. Consecuentemente, los métodos propuestos en esta tesis no solo permiten la distinción entre diferentes líneas celulares, sino que también permiten distinguir entre estadios del ciclo de vida celular dentro de una misma línea.

Aunque no se ha abordado en esta tesis, la introducción de marcadores en las células (por ejemplo, marcadores fluorescentes) es *a priori* un procedimiento perfectamente compatible con el uso de los dispositivos y técnicas de análisis desarrollados en esta tesis. Este uso de marcadores podría utilizarse para obtener aún más información sobre la presencia de ciertas proteínas en los analitos biológicos y complementar dicha información con los parámetros físicos medidos (densidad, tamaño, etc.). Asimismo, como el proceso de fabricación contempla el uso de capilares comerciales de sílice, las técnicas desarrolladas en esta tesis se podrían implementar de manera sencilla en los citómetros de flujo comerciales, lo que la hace especialmente interesante.

Perspectivas Futuras

Aunque los métodos desarrollados en esta tesis se han utilizado para medir propiedades físicas tanto de micropartículas poliméricas y de sílice como de células de tejido mamario –todas ellas con un tamaño comprendido entre 20 μm y 5 μm – esta técnica podría permitir medir las propiedades físicas de partículas y entidades biológicas de tamaños aún menores. Además, los conceptos y fenómenos estudiados en esta tesis pueden sentar las bases para nuevos conceptos de dispositivos de microcanales suspendidos resonantes (SMR) cuyo límite de detección sea aún más pequeño que los actuales. A continuación, se muestran y discuten posibles líneas de investigación futuras, basadas tanto en los resultados mostrados en esta tesis, así como en algunos resultados preliminares obtenidos durante la realización de la misma.

Detección de agentes infecciosos

De cara a aplicaciones clínicas, los dispositivos desarrollados en esta tesis podrían ser muy interesantes para el análisis de fluidos corporales, como sangre, sin necesidad de ninguna preparación previa de la muestra. Las técnicas convencionales de análisis de sangre requieren la separación de la misma mediante centrifugación para analizar por separado sus distintos componentes (plasma, eritrocitos, leucocitos y trombocitos). Una técnica como la desarrollada en esta tesis permitiría distinguir entre todos estos componentes mediante la medida de sus propiedades físicas (masa boyante, tamaño y cambio en reflectividad) a pesar de encontrarse todos ellos mezclados. Asimismo, esta técnica podría permitir la detección de agentes infecciosos (bacterias y hongos) en todo tipo de fluidos corporales.

Al finalizar esta tesis se han realizado pruebas preliminares para probar la capacidad de esta técnica en la detección de bacterias midiendo dos poblaciones de bacterias diferentes: *Escherichia Coli* y *Staphylococcus Epidermidis*. El resonador empleado para estas medidas tiene un diámetro externo de 30 μm , una longitud de 500 μm y una masa de 590 ng. Dado el ruido

en frecuencia (5×10^{-7}), el límite de detección en masa es de ~ 300 fg, lo que es demasiado grande para poder apreciar los cambios en masa esperados que producirían estas bacterias (entre 300 fg y 100 fg de masa boyante para *Escherichia Coli* y entre 60 fg y 30 fg para *Staphylococcus Epidermidis*). Como el cambio en la señal por la masa de las bacterias es del mismo orden que el nivel de ruido, no se podrá medir la masa boyante de estas, no obstante, las bacterias sí producen un cambio en la señal óptica con una relación señal-ruido óptima (Fig. PF.1a). Se han conseguido medir los cambios en reflectividad producidos por el paso de las dos especies de bacterias. Estas distribuciones en reflectividad solapan parcialmente, por lo que se puede realizar una distinción entre las dos especies de bacterias con una cierta precisión (Fig. CGPF.1b).

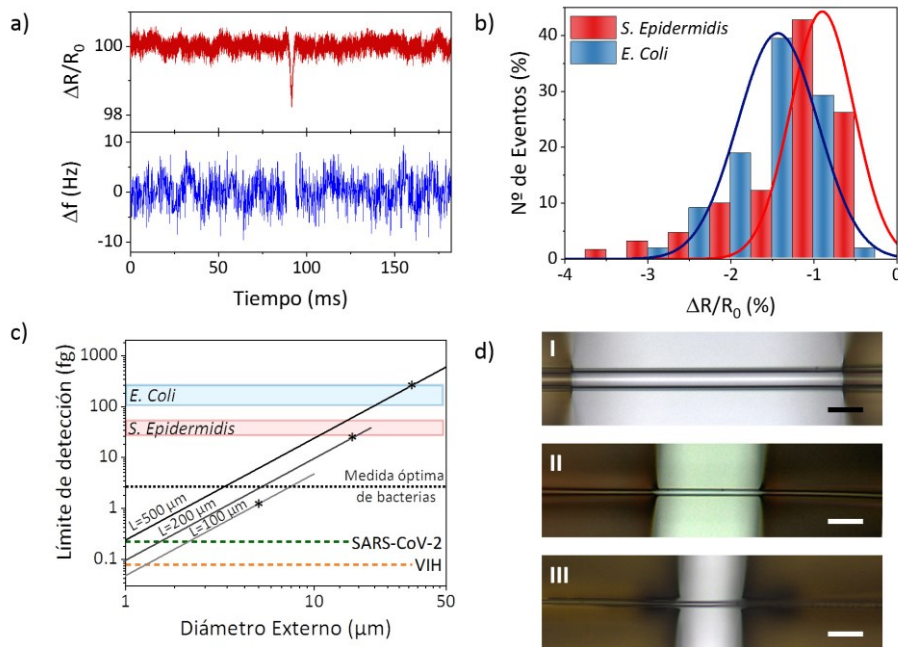


Figura PF.1: Pruebas preliminares para la detección de bacterias. **a)** Señales mecánica y óptica medidas durante el paso de una bacteria *Escherichia Coli*. **b)** Histogramas de cambio en reflectividad medidos para bacterias *Escherichia Coli* y *Staphylococcus Epidermidis*. **c)** Límite de detección calculado en función del diámetro externo para distintas longitudes suponiendo que se conservan el nivel de ruido en frecuencia (5×10^{-7}) y la relación entre diámetros interno y externo ($\lambda=0.75$) utilizada a lo largo de esta tesis. Se han omitido aquellos valores en los que la relación entre la longitud y el diámetro externo es mayor que 10 ya que, a partir de ese valor, el comportamiento del resonador puede divergir de lo previsto en el modelo de Euler-Bernouilli. Los asteriscos representan los valores esperados para los resonadores mostrados en la parte d de esta figura. **d)** Imágenes de microscopía óptica de distintos dispositivos fabricados usando distintas máscaras de fotolitografía para conseguir distintas longitudes suspendidas. Barra de escala 50 μm . I. diámetro externo de 30 μm y longitud de 500 μm (este es el dispositivo más pequeño utilizado para obtener medidas en esta tesis). II. diámetro externo de 16 μm y 200 μm de longitud. III. diámetro de 5 μm y 100 μm de longitud.

Estos resultados preliminares demuestran la validez de la técnica desarrollada en esta tesis para la búsqueda de agentes infecciosos en la sangre: las células sanguíneas podrán ser detectadas a través de su medida en masa y reflectividad mientras que las partículas de menor tamaño que las células no producirán respuesta en masa, pero sí en la señal óptica.

Los trabajos futuros sobre este tipo de dispositivos se centrarán en dos estrategias diferentes, no excluyentes entre ellas. Por un lado, se puede mantener el tamaño de los resonadores utilizados en esta tesis y trabajar en el análisis de la señal mecánica, desarrollando distintos métodos para el procesado de la señal que permitan obtener información de la masa boyante, a pesar de que la relación señal-ruido sea menor que 1.

La otra estrategia consistiría en aumentar la relación señal-ruido en los dispositivos empleados. La manera más directa para mejorar la relación señal-ruido en la señal mecánica es utilizar resonadores de menor tamaño, ya que el límite de detección de estos es directamente proporcional a su masa (Fig. PF.1c). Si se establece como criterio que el tamaño óptimo del dispositivo es aquel que dé un límite de detección menor o igual que la décima parte de la masa del analito, suponiendo que el ruido en frecuencia se mantiene constante, se conseguiría medir la masa de los *Staphylococcus Epidermidis* con un dispositivo de 7 μm de diámetro externo y 100 μm de longitud (Fig. PF.1c). El método de fabricación desarrollado permite obtener resonadores de tamaños más pequeños que los empleados en esta tesis. De hecho, se han llegado a fabricar dispositivos con longitudes suspendidas de 200 μm y 100 μm y diámetros externos entre 20 μm y 5 μm (Fig. PF.1d). Aunque en menor medida, el límite de detección en masa también se puede reducir aumentando la relación entre diámetros interno y externo (λ). Este parámetro se conserva durante el proceso de elongación térmica de los capilares, por lo que este parámetro está inicialmente determinado por las dimensiones del capilar sin estirar, no obstante, sería posible aumentar esta relación para que sea más próxima a 1 atacando al final del proceso de fabricación el capilar de vidrio con ácido fluorhídrico ya que el sustrato de silicio y los anclajes de SU-8 son compatibles con este tipo de ataque.

A pesar de que es la manera más directa de mejorar la resolución en masa, reducir el tamaño de los dispositivos presenta varios problemas desde un punto de vista microfluídico. En primer lugar, dado un cierto caudal, la velocidad del fluido será mayor en un dispositivo cuanto menor sea el diámetro interno del capilar (efecto Venturi). Una mayor velocidad en el fluido, supone también una mayor velocidad de las partículas, lo que requerirá tiempos de

adquisición más cortos, y, por tanto, se medirá con un nivel de ruido más alto. Como alternativa se pueden utilizar un caudal menor que los utilizados en esta tesis, sin embargo, tendrá como contrapartida una reducción en la eficiencia de medida. Si en trabajos futuros se opta por esta estrategia, habrá que resolver este problema.

Nuevos conceptos de fabricación

En esta tesis se ha demostrado que el concepto de resonadores con microcanales integrados resulta muy útil para la medida de propiedades físicas de células y esta técnica es muy prometedora para la medida de bacterias. Sin embargo, resultaría complicado reducir el diámetro de los capilares por debajo de $1\ \mu\text{m}$, lo que dificulta la aplicación de esta tecnología para la caracterización de entidades biológicas como virus (Fig. PF.1c) o proteínas. Por esta razón se ha empezado a estudiar nuevos diseños consistentes en dos resonadores paralelos de nitruro de silicio tipo puente separados una pequeña distancia ($\sim 1\ \mu\text{m}$), pudiendo hacer circular un fluido entre los dos resonadores (Fig. PF.2a) gracias a la tensión superficial del fluido. En estos nuevos dispositivos, la parte suspendida está conectada con un reservorio a cada lado en el que se puede depositar un líquido, de tal manera que el líquido fluirá entre los dos resonadores sin estar presurizado y aprovechando fenómenos como la capilaridad o la difusión para el transporte de las partículas de interés.

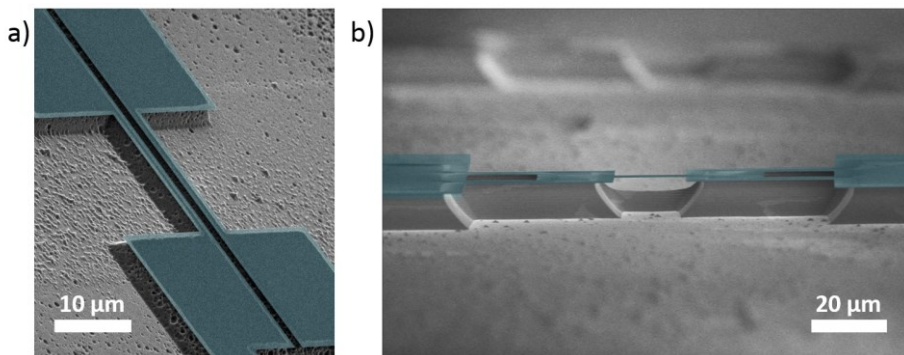


Figura PF.2: Nuevos conceptos de fabricación. Imágenes de microscopía SEM de los resonadores fabricados basados en dos resonadores paralelos. **a)** Vista superior de uno de los dispositivos. **b)** Vista de perfil de uno de los dispositivos. Imágenes en falso color: las zonas coloreadas en azul muestran las partes de nitruro de silicio mientras que las partes en gris indican el sustrato de silicio

Estos dispositivos están siendo fabricados en colaboración con el Instituto de Sistemas Optoelectrónicos y Microtecnología (ISOM-UPM). Para este proceso de fabricación se parte de una oblea de silicio con una capa superficial de $100\ \text{nm}$

nm de nitruro de silicio de baja tensión sobre la que se realiza una litografía electrónica. Posteriormente, se realiza un ataque con iones reactivos (RIE, por sus siglas en inglés «reactive ion etching») para retirar el nitruro de silicio con una geometría deseada. Finalmente, se retira la resina y se realiza un ataque húmedo de la muestra con distintas disoluciones que atacan específicamente el silicio, de esta manera solo atacará aquellas zonas donde haya retirado el nitruro de silicio. Al finalizar el ataque húmedo se obtienen los dispositivos (Fig. PF.2b).

Aunque el diseño y el proceso de fabricación son completamente distintos de los propuestos en esta tesis, los distintos conceptos de detección mecano-óptica, así como el análisis hidrodinámico de las partículas desarrollados en esta tesis son perfectamente aplicables a este tipo de dispositivos.

Nuevos fenómenos hidrodinámicos

A la hora de estudiar fenómenos hidrodinámicos en esta tesis siempre se ha considerado que las partículas se mueven con una velocidad constante cuando atraviesan la zona suspendida como consecuencia del campo de velocidades parabólico y estacionario obtenido en una tubería cilíndrica de sección constante (capítulo 6). Sin embargo, se ha encontrado que cuando se emplean caudales bajos (< 5 nL/s), la forma del cambio en la señal mecánica producida por el paso de una partícula a través de la zona suspendida empieza a divergir de la forma del cuadrado del modo (Fig. PF.3).

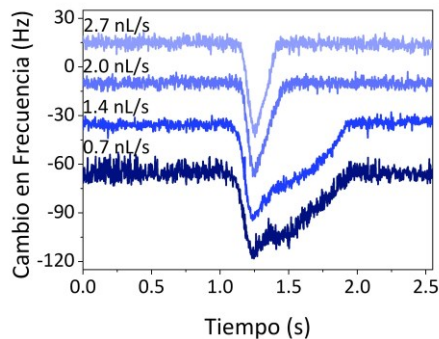


Figura PF.3: Nuevos fenómenos hidrodinámicos. Señal mecánica medida en función del tiempo para el paso de partículas esféricas de sílice de $6.8 \mu\text{m}$ de diámetro usando distintos caudales. Se ha utilizado la señal óptica para comprobar que estos eventos son producidos por una única partícula. Para estas medidas se ha empleado un dispositivo con una longitud suspendida de $500 \mu\text{m}$, un diámetro externo de $45 \mu\text{m}$ y un diámetro interno de $34 \mu\text{m}$. Para conseguir estos caudales bajos se ha conectado en serie al dispositivo RMT el resistor microfluídico de $50 \mu\text{m}$ de anchura (epígrafe 2.3.).

Esta forma de la señal mecánica indica que la partícula no se mueve con una velocidad constante, lo que supone que las fuerzas que actúan sobre las partículas no se encuentran equilibradas. Esto podría ser el resultado de la aparición de fenómenos hidrodinámicos adicionales a los tenidos en cuenta en modelo introducido en el capítulo 6.

En trabajos futuros será necesaria la realización de un estudio sistemático sobre la divergencia de la señal mecánica con respecto del cuadrado de la forma del modo (Ec. 1.54) para conseguir una descripción más precisa de estos nuevos fenómenos, así como el desarrollo de modelos analíticos y simulaciones para comprender el origen de los mismos.

Listado de Trabajos Publicados durante la Realización de esta Tesis

1. Martín-Pérez, A., Ramos, D., Tamayo, J. & Calleja, M. in 2019 20th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems & Eurosensors XXXIII (TRANSDUCERS & EUROSENSORS XXXIII). 2146-2149.
2. Martín-Pérez, A., Ramos, D., Tamayo, J. & Calleja, M. Coherent Optical Transduction of Suspended Microcapillary Resonators for Multi-Parameter Sensing Applications. *Sensors* **19**, 5069-5078 (2019).
3. Martín-Pérez, A. et al. Mechano-Optical Analysis of Single Cells with Transparent Microcapillary Resonators. *ACS Sensors* **4**, 3325-3332, doi:10.1021/acssensors.9b02038 (2019).
4. Martín-Pérez, A. et al. Hydrodynamic assisted multiparametric particle spectrometry. *Scientific Reports* **11**, 3535, doi:10.1038/s41598-021-82708-0 (2021).
5. Martín-Pérez, A., Ramos, D., Tamayo, J. & Calleja, M. Nanomechanical Molecular Mass Sensing Using Suspended Microchannel Resonators. *Sensors* **21**, 3337 (2021).

Listado de Patentes Solicitadas durante la Realización de esta Tesis

1. Martín Pérez, A., Ramos Vega, D., Malvar Vidal, O., Calleja Gómez, M., Tamayo de Miguel, J. Sistema de análisis mecano-óptico, método de fabricación del mismo, uso para identificación y clasificación de poblaciones celulares y procedimiento de análisis mecano-óptico. Ref. PCT/ES2020/070236 (2019).
2. Martín Pérez, A., Ramos Vega, D., Calleja Gómez, M., Tamayo de Miguel, J. *Procedimiento de espectrometría de analitos multiparamétrica asistida por hidrodinámica*. Ref. P202031115 (2020).