

Tesis Doctoral



MicroNanoHerramientas para las Ciencias de la Vida

M^a José López Martínez
Octubre 2008



MICRO/NANOHERRAMIENTAS PARA APLICACIONES A CELULAS VIVAS

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias de Materiales

Autora: M^a José López Martínez

Director: José Antonio Plaza

El Dr José Antonio Plaza Plaza, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) con destino en el IMB-CNM, director de la presente Tesis Doctoral

INFORMA:

Que el presente trabajo de investigación que lleva por título "*MicroNanoherramientas para las Ciencias de la Vida*" y presentado para optar al grado de Doctor ha sido realizado bajo su dirección por M^a José López Martínez.

Bellaterra, 22 de Julio de 2008

José Antonio Plaza Plaza



El Dr. José Peral Pérez Professor Titular del *Departament de Química* de la *Universitat Autònoma de Barcelona*, se declara conforme con la presentación de la tesis,

"MicroNanoHerramientas para las Ciencias de la Vida"

Presentada por M^a José López Martínez para optar al grado de Doctor en Ciencias por la *Universitat Autònoma de Barcelona*.

Bellaterra, 22 de julio de 2008

Dr. José Peral Pérez

A los que están
A los que desgraciadamente ya no
A los que vienen de camino

The future is uncertain... but this uncertainty is at the very
heart of human creativity.

Ilya Prigogine (Premio Nóbel de Química 1977)

Resumen

La aparición de los Sistemas Micro/Nano-Electro-Mecánicos (MEMS/NEMS) en microfluídica abre un amplio campo de aplicaciones dentro de la medicina, la biología y la bioquímica. Esto ha hecho que se estén desarrollando, entre otros, dispositivos para suministrar fármacos de forma localizada, microagujas para inyectar DNA o microherramientas para funcionalizar superficies de manera controlada.

El trabajo presentado en esta memoria ha estado enmarcado dentro dos proyectos, MINAHE y MINAHE II. El objetivo principal del primero consistió en desarrollar tecnologías para fabricar micro/nanoherramientas que pudieran ser acopladas fácilmente a un cabezal de un Microscópio de Fuerza Atómica (AFM). El segundo proyecto se centró en buscar una aplicación en células vivas para los dispositivos fabricados durante el primer proyecto. Siguiendo la tendencia actual de la microelectrónica de integración de tecnologías, en el trabajo presentado se ha conseguido desarrollar dos tecnologías para fabricar dos generaciones de micro/nanopipetas que serán discutidas a lo largo de esta memoria.

La primera se ha centrado en la integración de tecnologías de micromecanización en silicio con ataques anisotrópicos y tecnología de nanomecanización mediante *Focused Ion Beam* (FIB). Durante la primera generación, se ha desarrollado un proceso tecnológico comenzando por la definición de los elementos que debían componer las micro/nanopipetas. Sobre un soporte se ha fabricado un microcanal. Este microcanal debía acabar en punta para poder depositar microgotas sobre una superficie. Una vez identificados los componentes del dispositivo, se procedió a su fabricación en la Sala Blanca (SB) Integrada de Nano y Microelectrónica de clase 100-10000 que existe en el Instituto de Microelectrónica de Barcelona, IMB-CNM (CSIC). El proceso de fabricación permitió detectar problemas de diseño y encontrar soluciones para implantarlas en el diseño de la siguiente generación de dispositivos. Los dispositivos conseguidos fueron acoplados a un cabezal de un AFM para ser utilizados como herramientas para funcionalizar superficies. Este trabajo permitió definir una base tecnológica para la fabricación de la primera generación de micro/nanopipetas. Por otro lado, el conocimiento adquirido durante este proceso permitió mejorar aspectos no resueltos aunque si identificados para obtener nuevas micro/nanopipetas.

La segunda generación se centró en solucionar los problemas tanto tecnológicos como de diseño encontrados en los dispositivos de la primera, teniendo en mente su posible aplicación en el campo de las Ciencias de la Vida. Se cambiaron los grabados anisotrópicos por grabados secos profundos para tener un mayor control de los procesos. También se mejoró el encapsulado soldando anódicamente los chips de silicio con los chips de vidrio y se aumentó el rendimiento introduciendo la técnica de *Manual Cleaving* para la obtención de los chips individuales en lugar de la etapa de serrado. Como el objetivo final de esta nueva generación sería la utilización de los dispositivos fabricados en aplicaciones biológicas, se diseñaron nuevas micro/nanopipetas transparentes, condición indispensable para este tipo de aplicaciones. Además, en algunos diseños, el tamaño de la punta de los dispositivos debía de estar comprendida en el orden de las pocas micras o nanómetros para poder atravesar con éxito la zona pelúcida y la membrana de un embrión de ratón evitando el fenómeno de lisado de la célula y/o la rotura de la punta de la micro/nanopipeta. Para conseguir este tipo de puntas se volvió a combinar la fabricación en microsistemas con el nanomecanizado en FIB. Finalmente, para demostrar la versatilidad y la integración monolítica que ofrece la tecnología de fabricación propuesta se han fabricado dispositivos adicionales diferentes a las micro/nanopipetas como microelectrodos, microfiltros y micromezcladores.

Resum

L'aparició dels Sistemes Micro/Nano-Electro-Mecànics (MEMS/NEMS) en microfluídica amplia el camp d'aplicacions per a la medicina, la biologia i la bioquímica. Això ha fet que es desenvolupin dispositius per subministrar fàrmacs de manera local, microagulles per la injecció de DNA o microeines per a funcionalitzar superfícies de manera controlada.

El treball presentat en aquesta memòria s'ha emmarcat dins de dos projectes, el MINAHE y el MINAHE II. L'objectiu principal del primer va consistir en desenvolupar tecnologies per a la fabricació de micro/nanoeiens per poder acoblar-les a capçals d'un Microscopi de Força Atòmica (AFM). El segon projecte s'ha centrat en la cerca d'aplicacions en cèl·lules vives dels dispositius fabricats durant el primer projecte. Seguint a la tendència actual de la microelectrònica d'integració de tecnologies, s'ha aconseguit desenvolupar dues tecnologies per fabricar dues generacions de micro/nanopipetes que seran discutides en aquesta memòria.

La primera s'ha centrat en la integració de tecnologies de micromecanització en silici amb gravats anisotròpics i tecnologies de nanomecanització mitjançant *Focused Ion Beam* (FIB). Durant la primera generació s'ha desenvolupat un procés tecnològic que ha començat per la definició dels elements que formaven part de les micro/nanopipetes. Damunt d'una base s'hauria de fabricar un microcanal. Aquest microcanal hauria d'acabar en punta per poder dipositar microgotes sobre una superfície. Un cop identificat els components del dispositiu, es va continuar amb la seva fabricació dins de la Sala Blanca (SB) Integrada de Nano y Microelectrònica de classe 100-10000 situada al *Instituto de Microelectrónica de Barcelona, IMB-CNM* (CSIC). El procés de fabricació va permetre detectar problemes de disseny i trobar solucions per implantar-les en el disseny de la següent generació de dispositius. El dispositiu fabricat s'ha pogut acoblar a un capçal d'un AFM per fer-lo servir com a eina per la funcionalització de superfícies. Aquest treball va permetre definir una base tecnològica per la fabricació de la primera generació de micro/nanopipetes. D'altra banda, el coneixement adquirit durant aquest procés va permetre millorar aspectes no resoltos però si identificats per obtenir noves micro/nanopipetes.

La segona generació es va centrar en solucionar els problemes tecnològics i de disseny trobats en els dispositius de la primera, pensant en la seva possible aplicació en les Ciències de la Vida. Es van canviar els gravats anisotròpics per gravats secs

profunds per obtenir el màxim control del procés. També es va millorar l'encapsulat realitzant una soldadura anòdica entre el xip de silici i el de vidre i el rendiment va augmentar introduint la tècnica de *Manual Cleaving* per a l'obtenció dels xips individuals en lloc del serrat de l'òbvia. Com l'objectiu final d'aquesta nova generació era la utilització dels dispositius fabricats per aplicacions biològiques, es van dissenyar les noves micro/nanopipetes amb les parets transparents, condició indispensable per aquest tipus d'aplicacions. Afegir que alguns dissenys haurien d'incorporar puntes de l'ordre dels nanometres o les poques micres per poder travessar amb èxit la zona pel·lúcida i la membrana d'un embrió de ratolí. D'aquesta manera s'evitaria el llisat de l'embrió i/o la ruptura de la punta de la micro/nanopipeta. Per aconseguir aquestes puntes es va tornar a combinar la fabricació en micro sistemes amb el nanomecanitzat en FIB. Finalment per demostrar la versatilitat i la integració monolítica que ofereix la tecnologia de fabricació proposada s'han fabricat dispositius addicionals diferents a les micro/nanopipetes com microelectrodes, microfiltres i micromescladors.

Summary

Micro/Nano-Electro-Mechanical Systems (MEMS/NEMS) applications for in vivo cell studies open a wide range of new applications in medicine, biology, and biochemistry. This has led to develop devices for local drug delivery, microneedles for DNA injection, and micronozzles for cell holding among others.

The work presented in this manuscript is framed within two projects: MINAHE and MINAHE II. The main goal of MINAHE was the development of technologies suitable for fabrication of micro/nano tools. Tools fabricated under MINAHE has found application in gold surface patterning and sub-picoliter dosage driven by an Atomic Force Microscope. MINAHE II employed these micro/nano tools on cellular applications.

Following the current integration trend in microelectronics, two different integrative technologies have been developed and will be discussed here. The first technology presented is based on Microsystems technology combined with Focused Ion Beam (FIB) nanomilling. The fabricated device has been fitted to an Atomic Force Microscopic (AFM) for gold surface patterning. Experience developed in the first generation of micro/nano dispensers promoted a number of upgrades to produce a new generation of dispensers with emphasis for application in the Life Sciences.

Technological processes were developed from component definition to back-end fabrication. Microchannel were defined on- substrate with micronozzles at the tip. The whole ensemble had AFM chip dimensions. This design favoured the use of microchannels as micro/nanodispensers and could effectively be used as surface functionalization tools. Once the components were identified, fabrication processes took place at *Instituto de Microelectrónica de Barcelona*, INM-CNM (CSIC) Clean Room (100-10000) facilities. First generation of micro/nanodispensers has successfully formed Self Asssembled Monolayers (SAM).

Experience developed in the first generation micro/nanodispensers promoted a number of upgrades to produce a Second generation of dispensers with an emphasis for applications in the Life Sciences. Transparent new devices were defined with specific shapes for cell manipulation. Anisotropic etching was replaced by Dry Reactive Ion Etching (DRIE) for improved process control. Packaging was improved with anodic bonding between silicon and glass chips and individual chip yield was increased by manual cleaving instead of wafer dicing. Transparent wall

micro/nanodispensers would be designed due to biological application. To avoid lysis (cellular damage) or broken nozzles, some nozzles were designed sharply, in order to pierce wall and membrane surrounding live cells. FIB nanomachined render this type of nozzle.

A crucial advantage in MEMS technology is versatility and monolithic integration. MEMS versatility can yield different devices although using the same technological process. We took advantage of this feature and manufactured microelectrodes, microfilters and micromixers as well.

As a conclusion, it is worth emphasizing that research in this work range from micro/nanotechnologies to chemistry and biology. The first generation fabricated technology successfully formed SAM over gold surfaces. The second generation pierced walls and membranes in live cell. These devices present quite some advantages compared to conventional glass capillary. The proposed technology allows extreme definition of sizes and shapes in order not to damage cells. Microelectrodes fabricated will be tested inside a neuron cell to record electrical measurements. Work to develop this new application is still in progress.

Agradecimientos

Hace algún tiempo, hablando con un muy buen amigo me comentó que durante la tesis había aprendido a relativizar las cosas que le pasaban...creo que hasta este momento no he empezado a comprender lo que quería decirme. Es ahora cuando ha llegado el momento de mirar hacia atrás, reflexionar sobre todo lo que ha pasado durante estos años, disfrutar recordando los buenos momentos, intentar olvidar los menos agradables y por supuesto, agradecer a toda la gente que se ha implicado en este proyecto, en mayor o menor dedicación.

Quién me hubiera dicho que al acabar el máster experimental en química analítica, Jaume Esteve y Francisco Javier Muñoz estarían buscando a una persona que supiera de electroquímica con custodia compartida. Después se formó el grupo de nanotecnología que me adoptó completamente. Finalmente, Jose Antonio Plaza me ofreció una beca asociada a su proyecto de Micro/Nanoherramientas. Así empezó todo.

Agradecer en primer momento a José Antonio Plaza sus enseñanzas tecnológicas y la confianza depositada en mí para desarrollar este trabajo, yo a veces he tenido mis dudas, gracias por el trabajo realizado. Me gustaría agradecer también a Abdelhamid Errachid el hecho de haber sufragado mis gastos durante estos últimos meses que al pasar noche y día, de lunes a domingo escribiendo no han sido demasiados. A Jaume Esteve y a Eva M. Campo agradecer la ayuda y los consejos que me han ofrecido en todo este tiempo.

Este trabajo no se hubiera podido realizar sin todo el personal ingeniero, técnico y operario que realizan su labor dentro Sala Blanca. Hacen lo posible y lo imposible en los procesos para poder fabricar los dispositivos, especialmente me gustaría mencionar a Zenón "Al-Majara" Navarro. También agradecer al personal mecánico que encontraran siempre la pieza que necesitaba en aquel momento y no olvidar al personal de mantenimiento que contribuyen, entre otras cosas, a mantener las condiciones de Sala para que podamos realizar nuestro trabajo.

Al personal administrativo agradecer su indispensable ayuda a la hora de realizar todo el papeleo y al personal informático su vigilancia constante para que no falten este tipo de recursos.

Este trabajo tampoco hubiera podido ser realizado sin una búsqueda bibliográfica previa, gracias a Elisenda Benet por facilitar hasta el *paper* más imposible. Y a Mercè Montllor por recibirme siempre con una sonrisa en la cara.

A las Martas por dejarme hacer las probatinas que necesitaba en el laboratorio, por tener siempre una respuesta, a Marta Duch por tener siempre un minuto para realizar una foto SEM y a Marta Gerboles por encontrarlo para realizar una soldadura.

A Kirill Zinoviev por fabricar los dispositivos de metacrilato y su ayuda en las pruebas realizadas. A Núria Ibañez por fabricar los dispositivos de LTCC que tan bien me fueron y los consejos para conseguir que un tubo no se desenganche del dispositivo. A Julian Alonso por dejar los equipos para fabricar los dispositivos de LTCC. A Andreu Llobera agradecer que me haya enseñado el mundo del PDMS. A Victor Cadarso por estar disponible para realizar metalizaciones. A Miquel Vellvehí agradecer la realización de las pruebas de conductividad de los dispositivos en la mesa de puntas. A Alberto Moreno el encapsulado de los chips.

A Raquel Pérez que me introdujera en el mundo de la microfluídica, gracias también por los consejos transatlánticos que has ido enviando. A Laura Malatto que vino desde Argentina para aprender sobre los procesos de Sala y me acabó ayudando con la microfluídica, gracias por tus mini-simulaciones. A David Caballero agradecer las pruebas realizadas con el AFM y a Elisabet Fernández las realizadas con las células. Gracias a Elena Ibañez por suministrar los ovocitos y embriones. A Carme Nogués y LLeonard Barrios por haberme introducido en el mundo de los cultivos celulares. A Jordi Llobet y a María Jesús López agradecer sus trabajos realizados con el FIB. A Xavier Borrisé sus fotos SEM, a Javier del Campo por dejarme la micropump para realizar las últimas pruebas. *Al Laboratori d'Electrodeposició i Corrosió* del departamento de Química Física de la UB por las deposiciones de la capa de CoNi

Gracias también a Nuria Torres, Margarita Narducci, Sergio Díez, Juan Pablo Esquivel y Raquel Cumeras por hacer más llevaderas y amenas las largas horas pasadas en el despacho y fuera de él. Tampoco puedo, ni quiero, olvidarme de mi antiguo despacho y de la gente que pasó por él: Marta Gerboles, Marta Duch, Roger Escudé, Javier Diaz y I@s ya Drs/Dras Rafael Rubio, Celeste Fleta, Asunción Alonso, Neus Sabaté, Ana Ruíz, María Jesus López, Peter Ivanov, Joaquín Santander y José Antonio Plaza.

Gracias a la gente de los desayunos, a la de mis ex cinco minutos de descanso para fumar o mis actuales para hablar de cualquier cosa, a los de los vinitos y cervecitas, verbenas, fiestas de disfraces, de cumpleaños o playeras, conciertos y escapadas varias: Iñigo Martín, Jorge Barreto, Jahir Orozco, Jesús García, Hector Cabezas, Olivier Lazcka, Neus Godino, Irene Fernández, Ingrid Hernandez, Susana Martínez, Isabel Burdallo, David Muñoz, Diana Bonilla, Olga Ordeig, Xavi Muñoz, Lia Moreno, Pablo Fernández, Diana Dávila, Nuria Crivillers, Maria Cano, Humberto Mata, Loreta Guitierrez, Julia Bote, Gemma Guardiola, Gemma Rius, Ana Tárrega, Sara Chamadoira, Juan Pablo Balbuena, Andrey Ipatov, Libertad Solé, David Almansa, Mónica Sarrión, María Sanchez, Amelia Barreiro, Humberto Campanela, Consuelo Guardiola, Ricardo Martínez, Raquel Palencia, Marta Fernández.

Mi paso por el CNM no hubiera sido el mismo si no hubiera conocido a Alfredo Cadarso, Fanny Caler y Javi Gonzalo. Sólo por ello, ya ha merecido la pena pasar por aquí. Gracias por todos los momentos vividos durante todos estos años.

A la gente de CATUCI que tan bien me acogieron e hicieron que no encontrara a faltar mi familia durante mi estancia en California. Especialmente a Maria Eugenia Eugenio, Francesc Galobardes, Laura Marchal, Sergio López, Sierim Lim, Albert Farré, Victor Noguera, Pere Margalef, Mercé Dalmau, Alfred Grau, José Cembranos, Lihn Dihn, Mike Jensen.

Pero no todo es trabajo, y hay gente que me han hecho creer que otra investigación es posible y que luchara por ello, es por eso que quisiera agradecer a la gente de Precarios y D-Recerca la labor que están haciendo. Especialmente a Jordi Cabana, Oriol Ramos, Gerard Ascenci y Elena Taboada. También agradecer la labor que está llevando a cabo AMIT, en especial me gustaría mencionar a Francesca

Campabadal, Joaquina Álvarez y María Villarroya. María algún día me tienes que explicar cual es tu secreto para sacar tiempo de donde sea y ayudar en todo

A Emi Evangelio, Sara Sevilla, Rosa Saura y a mis floretas, Montse Busoms, Bego Lozano y Elena García, por estar siempre ahí, por ayudarme en todo, por hacerme desconectar siempre, por darme otro punto de vista... voy a parar aquí o no acabaría nunca esta lista.

A mi familia, a mi madre, a mi hermana y a mi cuñado por aún sin llegar a comprender muy bien que es esto de la tesis, me habéis apoyado en todo, por tener tanta paciencia incluso en las ocasiones donde no lo he puesto nada fácil. A mis tíos y a mis primos. El diseño de la portada se lo debo a uno de ellos. Gracias, simplemente me encanta.

Espero no dejarme a nadie...han sido muchos años y últimamente me falla la memoria...debe de ser la edad...si alguien no se encuentra, que no se lo tome a mal, que también le estoy eternamente agradecida.

Índice

Resumen	i
Resum	iii
Summary	v
Agradecimientos	vii
1 Introducción	1
1.1 Proyectos en los que se enmarca el trabajo	3
1.2 Estructuración de la memoria	7
2 Contextualización teórica	9
2.1 Conceptos teóricos generales	11
2.1.1 Microfluídica	11
2.1.1.1 μ TAS y lab-on-a-chip	19
2.1.1.2 MEMS en microfluídica	23
2.2 Aspectos comerciales	27
2.2.1 Microfluídica	27
2.2.2 MEMS	28
2.3 Tecnologías de fabricación para microfluídica	31
2.3.1 Tecnologías basadas en LTCC y en polímeros	32
2.3.2 Tecnologías de microfabricación en silicio	37
2.3.3 Tecnologías de nanomecanización:	
<i>Focused Ion Beam</i>	41
2.4 Estado del arte en el IMB-CNM	43
2.5 Microdispositivos para las ciencias de la vida y la química.	
Biofuncionalización, manipulación y estudio de células vivas	45
2.5.1 BioMEMS	46

2.5.2	Microagujas, micropipetas y microdispensadores	47
2.5.3	Micromezcladores y microreactores	51
2.5.4	Microfiltros y microseparadores	53
2.6	Objetivos de la tesis	55
2.7	Referencias	57

3. Micro/nanopipetas: Primera generación 67

3.1	Introducción	69
3.2	Diseño de las micro/nanopipetas	71
3.3	Proceso tecnológico y fabricación de las micro/nanopipetas	73
3.3.1	Descripción del proceso tecnológico	73
3.3.2	Diseño de las máscaras	75
3.3.3	Proceso de fabricación	81
3.3.3.1	Proceso de fabricación en Sala Blanca	81
3.3.3.2	Obtención de los chips individuales: Serrado obleas	90
3.3.3.2.1	<i>Serrado de la oblea con resina de protección</i>	92
3.3.3.2.2	<i>Serrado de la oblea sin resina de protección</i>	93
3.3.3.2.3	<i>Serrado en dados de 2 x 2 chips</i>	94
3.3.3.3	Apertura del depósito de las micro/nanopipetas	96
3.3.3.3.1	<i>Grabado con TMAH</i>	96
3.3.3.3.2	<i>Micro/nanomecanización con FIB</i>	98
3.3.3.4	Apertura de la punta de las micro/nanopipetas	102
3.3.3.4.1	Ruptura controlada	112
3.3.3.4.2	Micro/nanomecanización con FIB	106
3.3.3.5	Grabado de la capa sacrificial de óxido de silicio para la obtención del microcanal	116
3.3.3.5.1	<i>Grabado en HF sin agitación</i>	120

3.3.3.5.2	<i>Grabado en HF con agitación orbital</i>	122
3.3.4	Conexión fluido híbrido de micro a macro	124
3.3.4.1	Conexión de los chips con tubos de teflón	125
3.3.4.2	Conexión de los chips con dispositivos de LTCC	126
3.3.4.3	Conexión de los chips con dispositivos de metacrilato	132
3.4	Caracterización y aplicaciones de las micropipetas	135
3.4.1	Comprobación apertura canal	135
3.4.2	Funcionalización (<i>micropattern</i>) con micropipetas	136
3.4.2.1	Funcionalización superficies de oro	137
3.4.2.2	Funcionalización de superficies en microarrays	140
3.5	Conclusiones	143
3.6	Referencias	147

4 Micro/nanopipetas: Segunda generación 149

4.1	Introducción	151
4.2	Estudios tecnológicos preliminares	153
4.2.1	Run prueba definición cavidades con DRIE	153
4.2.2	Run prueba oxidación del polisilicio	158
4.3	Diseño de las micro/nanopipetas	161
4.4	Proceso tecnológico y fabricación de las micro/nanopipetas	163
4.4.1	Descripción del proceso tecnológico	163
4.4.2	Diseño de las máscaras	165
4.4.2.1	Chips de silicio	165
4.4.2.2	Chips de vidrio	174
4.4.3	Proceso de fabricación de micropipetas con capa estructural de óxido de silicio obtenida al oxidar una capa de polisilicio	175
4.4.3.1	Proceso de fabricación en Sala Blanca	175
4.4.4	Proceso de fabricación micropipetas con capa estructural de óxido de silicio depositado	190

4.4.4.1	Estudio de la capa sacrificial adecuada para capa estructural de óxido de silicio depositado	190
4.4.4.1.1	<i>Resina como capa sacrificial</i>	191
4.4.4.1.2	<i>Aluminio como capa sacrificial</i>	194
4.4.4.2	Proceso de fabricación en Sala Blanca	199
4.4.4.3	Fabricación de los chips de vidrio por <i>Sand Blasting</i>	205
4.4.4.4	Soldadura anódica	207
4.4.4.5	Deposición de la capa estructural	208
4.4.4.6	Obtención de los chips individuales: <i>Manual Cleaving</i>	209
4.4.4.7	Apertura de la punta de las micro/nanopipetas	212
4.4.4.7.1	<i>Ruptura controlada</i>	212
4.4.4.7.2	<i>Nanomecanización con FIB</i>	216
4.4.4.8	Grabado de la capa sacrificial de aluminio para la obtención del microcanal.	217
4.4.5	Conexión microfluídica integrado monolítico de micro a macro	219
4.4.5.1	Conexión de los chips con tubos de Nylon	219
4.4.5.2	Conexión de los chips con tubos de poliimida	220
4.5	Caracterización y Aplicación de las micro/nanopipetas	223
4.5.1	Comprobación de fugas y pruebas de resistencia de presión de las conexiones	223
4.5.2	Pruebas realizadas con fluidos	225
4.5.3	Aplicación de las micro/nanopipetas en biología celular	233
4.5.3.1	Test inserción de puntas de micro/nanopipetas de aluminio y óxido de silicio	236
4.5.3.2	Test inserción de puntas de micro/nanopipetas de óxido de silicio	239
4.6	Conclusiones	243
4.7	Referencias	247

5.	Dispositivos adicionales obtenidos con tecnología de micro/nanopipetas segunda generación	249
5.1	Micromezcladores	251
	5.1.1 Proceso de fabricación de los micromezcladores	251
	5.1.2 Caracterización de los micromezcladores	255
5.2	Microfiltros	257
	5.2.1 Proceso de fabricación de los microfiltros	257
	5.2.2 Caracterización de los microfiltros	262
	5.2.2.1 Caracterización altura columnas microfiltros	263
5.3	Electrodos	268
	5.3.1 Deposición de oro por <i>electroless</i>	272
	5.3.1.1 Deposición directa de oro en las puntas de los microelectrodos	273
	5.3.1.2 Estudio del proceso del electroless de oro en las puntas de los microelectrodos	274
5.4	Conclusiones	283
5.5	Referencias	285
6.	Conclusión final y Líneas de trabajo	287
ANEXO A		A.1
ANEXO B		B.1
ANEXO C		C.1
ANEXO D		D.1

1 Introducción



Este primer capítulo servirá para detallar los dos proyectos que han enmarcado la investigación realizada y presentada en esta memoria, así como la estructura dispuesta. Los proyectos en los que se ha trabajado fijaron unos objetivos generales a desarrollar. En el caso del primer proyecto consistía en desarrollar una tecnología de fabricación de dispositivos microfluídicos para ser acoplados a cabezales de AFM y poder realizar de esta manera una funcionalización localizada sobre una superficie de oro. El objetivo general del segundo proyecto en el que se centró el trabajo fue el desarrollo de una tecnología de fabricación para conseguir dispositivos microfluídicos transparentes y de esta manera poder trabajar con células vivas.

1.1 Proyectos en los que se enmarca el trabajo

Como se ha comentado, el trabajo presentado en esta memoria se ha enmarcado dentro de dos proyectos. El primero, titulado *Micro/NanoHerramientas para cabezales de Microscopios de Fuerza Atómica (MINAHE)*, tenía como objetivo el desarrollo de tecnología de fabricación de herramientas con partes funcionales con dimensiones del orden de las micras y/o nanómetros. Estas micro/nanoherramientas se diseñaron para ser adaptadas a cabezales de microscopio de AFM, STM o en equipos específicos de menos coste. Dentro de este proyecto se realizaron diferentes dispositivos, como por ejemplo voladizos y puntas para acoplarlos a microscopios AFM o equipos similares. También se trabajó en el desarrollo de la tecnología para la fabricación de micro/nanopipetas para intentar dispensar pequeñas cantidades de líquidos o gases o para fijar (mediante aspiración) partículas. Más datos sobre este proyecto son mostrados en la Tabla 1.I.

Tabla 1.I: Datos de los proyectos MINAHE y MINAHE II

Título del proyecto	Micro/NanoHerramientas para cabezales de Microscopios de Fuerza Atómica	<i>Micro/Nanoherramientas para el estudio de células vivas II</i>
Acrónimo	MINAHE	MINAHE II
Organismo financiador	MICYT	MEC
Participantes	UB CNM ICMAB	CNM UAB UB
Centro de ejecución	Centro Nacional de Microelectrónica (CSIC)	Centro Nacional de Microelectrónica (CSIC)
Investigador Principal	José A. Plaza	José A. Plaza
Contrato o convenio	TIC-2002-04280-C03-02	TEC2005-07996-C02-01
Duración	Noviembre 2002- Noviembre 2005	Enero 2006-Diciembre 2008

El trabajo dentro de este proyecto se dividió en tres partes. En la primera se desarrolló la tecnología necesaria para la fabricación de las micro/nanoherramientas. Ésta sería probablemente una de las contribuciones más

1. Introducción

grandes que se obtendrían del proyecto porque no sólo serviría para fabricar los dispositivos propuestos, si no que también serviría para obtener una base tecnológica para futuros dispositivos y proyectos. La experiencia del grupo en el campo de la micromecanización del silicio se extendió a la nanofabricación de algunas partes de los dispositivos. En la segunda parte, relacionada con la primera, se diseñarían las micro/nanoherramientas donde diferentes tipos de actuación serían evaluados y simulados con el Método de Elementos Finitos (FEM) para su optimización. Finalmente se caracterizarían las micro/ nanoherramientas.

El segundo proyecto en el que se ha enmarcado este trabajo, todavía en vigor, es la continuación del MINAHE y lleva por título *Micro/Nanoherramientas para el estudio de células vivas (MINAHE II)*, más datos de este proyecto son presentados en la Tabla 1.I. En este proyecto se busca una aplicación concreta a las micro/nanoherramientas fabricadas durante la duración del MINAHE, esta aplicación consiste en el estudio de células vivas.

Las micro/nanoherramientas, como su nombre indica, pueden tener algunas de sus partes funcionales del orden de las pocas micras o de los nanómetros, cosa que permite la manipulación y/o estudio de células que no sería posible con herramientas o equipos macroscópicos. Este proyecto está compuesto por dos líneas de trabajo, la primera se centra en el diseño de herramientas capaces de manipular y/o interactuar con células vivas para su estudio desde el exterior. En este punto los objetivos a desarrollar se pueden dividir en tres. El primero se basa en desarrollar las tecnologías para la fabricación de las micro/nanoherramientas donde se han extendido los conocimientos adquiridos en el MINAHE para la micro/nanofabricación de silicio en combinación con técnicas de micro/nanomecanización. El segundo objetivo consiste en el diseño de las micro/nanoherramientas donde se han estudiado los posibles principios de actuación, se han optimizado mediante la simulación por FEM de ciertas partes funcionales de los dispositivos y se han implementado estas micro/nanoherramientas en los equipos necesarios para su caracterización. El tercer objetivo de la primera línea de trabajo consiste en asentar las bases para el estudio de células. Se prevé analizar los efectos que estas micro/nanoherramientas puedan tener en la viabilidad celular. La segunda línea de trabajo del proyecto consiste en la fabricación de unos voladizos que funcionen

como electrodos para poder realizar medidas eléctricas o electroquímicas sobre o en el interior de una célula viva.

El trabajo realizado y presentado en esta memoria se ha centrado especialmente en el desarrollo de tecnología para la fabricación de micro/nanopipetas, un ejemplo concreto de micro/nanoherramientas.

Aunque utilizando esta misma tecnología también se han conseguido fabricar otros dispositivos como microfiltros, micromezcladores y microelectrodos. La primera generación de las micronanopipetas ha sido acoplada a cabezales de un AFM para realizar microestampados sobre superficies de oro mientras que la segunda generación ha sido acoplada a un micromanipulador para poder penetrar la capa pelúcida y la membrana de ovocitos y/o embriones sin lisar las células.

Para conseguir estos objetivos, se han intentado adecuar las técnicas de microfabricación existentes en el Instituto de Microelectrónica de Barcelona, IMB-CNM (CSIC) por un lado y por otro, se han combinado estas técnicas existentes en el centro con otras de nanomecanización que han hecho posible la obtención de posibles partes submicrométricas. Se ha aprovechado la experiencia previa del grupo en diseños de MEMS para el diseño de las micro/nanopipetas. Con la simulación FEM se han simulado los aspectos más relevantes de las estructuras propuestas para la optimización de los dispositivos.

Este estudio y desarrollo se ha realizado con las facilidades existentes en el IMB-CNM (CSIC), entre los que se encuentra: Sala Blanca (SB) con los equipos necesarios para la fabricación de circuitos integrados y microsistemas (1000m², clase 100-10000), Laboratorio de Microsistemas donde se han realizado los procesos que no se podían hacer dentro de SB, Laboratorio de Nanotecnología SB cuyo *Focused Ion Beam* (FIB) ha sido utilizado para la nanomecanización de algunos de los dispositivos, programas de Diseño (Cadence Design Framework II) y Simulación (ANSYS V.8.0) donde se han podido diseñar las máscaras y realizar las simulaciones de micro/nanoestructuras por el Método de Elementos Finitos (FEM).

La colaboración del *Institut de Bioenginyeria de Catalunya* (IBEC) en los dos proyectos, ha permitido la utilización del FIB y el Microscopio de Fuerza Atómica (AFM) situados en el Parque Científico de Barcelona para realizar la

1. Introducción

micro/nanomecanización de algunos de los dispositivos y el microestampado e inspección de las superficies de oro respectivamente.

La colaboración de la *Unitat de Biologia Cel·lular* del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad Autónoma de Barcelona en el MINAHE II ha permitido utilizar ovocitos, embriones y el microscopio invertido para demostrar que las micro/nanopipetas podían atravesar la zona pelúcida y el citoplasma de la célula sin lisar la célula.

Se podrá comprobar a través de la lectura de la memoria presentada que estas colaboraciones han hecho que el trabajo realizado sea muy interdisciplinar ya que sin la presencia de estos dos grupos en los respectivos proyectos, el trabajo presentado no hubiera sido completo.

1.2 Estructuración de la memoria

La investigación realizada para la obtención de esta tesis se ha centrado en el desarrollo de diversas tecnologías para poder fabricar diferentes dispositivos o herramientas que cubran una necesidad real como es el estudio individual a nivel celular y sub-celular de células vivas. Para ello se han desarrollado dos tecnologías para fabricar micro/nanopipetas que permitan, por un lado funcionalizar selectivamente una superficie de oro que conducirá en un futuro a la creación de *arrays* de proteínas para estudios específicos, y por otro tener acceso a células vivas desde el exterior y poder en un futuro inyectar líquidos, sustancias o partículas que puedan realizar un estudio desde el interior.

En el capítulo *1. Introducción* se exponen los proyectos que han enmarcado la investigación de la tesis y expone los puntos en los que se divide la memoria.

Esta introducción va seguida del capítulo *2. Contextualización teórica* donde se realiza una descripción teórica y del estado del arte sobre MEMS, BioMEMS, microfluidica y μ TAS en general y las micro/nanopipetas, micromezcladores y microfiltros en particular, también se trata el trabajo previo realizado en el CNM sobre este tema.

En el capítulo *3. Micro/nanopipetas: Primera generación* se centra, como su nombre indica, en la primera tecnología realizada para la fabricación de las micro/nanopipetas. En él se describen tanto los procesos de fabricación seguidos dentro y fuera de SB para la obtención de los primeros dispositivos, como las pruebas realizadas acoplando estos dispositivos a un AFM para realizar el microestampado sobre superficies de oro. También se explican los problemas encontrados durante el proceso de fabricación, así como la manera como de resolverlos.

En capítulo *4. Micro/nanopipetas: Segunda generación*, se describe la segunda tecnología utilizada para la fabricación de las micro/nanopipetas de la segunda generación. Esta nueva tecnología sirvió para solucionar con éxito los problemas detectados durante el primer proceso tecnológico. Se explica también las pruebas realizadas acoplando estos nuevos dispositivos a un micromanipulador para poder penetrar con éxito la zona pelúcida y la membrana de ovocitos y/o embriones.

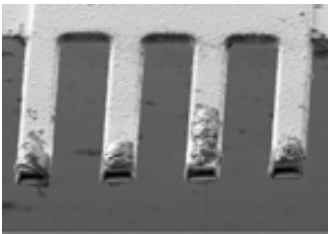
1. Introducción

En el capítulo 5. *Dispositivos adicionales obtenidos con la tecnología de segunda generación*, se da una descripción de otros dispositivos fabricados (micromezcladores, microfiltros y microelectrodos en voladizo) con la misma tecnología que se utilizó para la fabricación de las micro/nanopipetas segunda generación. Los micromezcladores y los microfiltros fueron diseñados en chips diferentes pero en la misma oblea que contenía las micro/nanopipetas, no hizo falta ningún paso adicional ni ningún proceso tecnológico nuevo para su fabricación. Los microelectrodos se obtuvieron evitando la etapa de grabado de la capa sacrificial de las micro/nanopipetas, todavía son objeto de estudio y los resultados preliminares son los presentados en esta memoria.

Finalmente esta memoria termina con la exposición de las conclusiones extraídas de este trabajo y del trabajo futuro en el capítulo 6. *Conclusión final y líneas de trabajo futuro* ya que los buenos resultados obtenidos han hecho posible la petición de un nuevo proyecto, el MINAHE III que será la continuación del presente MINAHE II.

2

Contextualización teórica



Este capítulo presenta una pequeña descripción teórica de los campos en los que se ha desarrollado la investigación presentada en esta memoria y una serie de definiciones de los términos que aparecen en ella. Comentar que no ha sido tarea fácil debido a la gran confusión en la utilización de estos términos que se ha detectado en la bibliografía consultada. Como se podrá comprobar en la mayoría de los casos, la diferencia entre un término u otro resulta ser muy sutil. Después de la contextualización teórica, se detallarán los objetivos que han marcado el desarrollo del trabajo presentado.

2.1 Conceptos teóricos generales

Para intentar comprender los objetivos que han marcado el desarrollo de la investigación realizada, primero hay que intentar comprender los campos en los que se ha trabajado. Es por ello por lo que se empezará definiendo brevemente la microfluídica y los Sistemas Micro-Electro-Mecánicos (MEMS).

2.1.1 Microfluídica

La **microfluídica** es la ciencia y tecnología de sistemas que procesan o manipulan pequeñas cantidades de líquidos (entre 10^{-9} y 10^{-18} litros) utilizando canales con dimensiones entre las decenas hasta las centenas de micras [1]. Implica estudios teóricos y experimentales del flujo de un líquido en el interior de canales del orden de las micras fabricados en un chip. Cuando estos canales disminuyen sus dimensiones por debajo del rango micrométrico, se utiliza el término de nanofluídica [2]. Estos estudios abarcan desde el proceso fabricación hasta el manejo y aplicación de los chips fabricados.

En sus orígenes, la microfluídica se centró en el desarrollo de microcanales para análisis moleculares. A continuación apareció un interés en crear sistemas fiables de detección frente a posibles ataques biológicos que, junto con la posibilidad de realizar análisis a nivel molecular, aumentaron la motivación en la investigación microfluídica.

El flujo del líquido en el interior del microcanal viene caracterizado por fenómenos que normalmente se menosprecian cuando se trabaja en la escala macro. Janasek *et al.* describen la relación existentes entre diferentes parámetros al pasar de sistemas macrofluídicos a microfluídicos [3]. La sección transversal del canal es uno de los factores que determina el comportamiento del líquido en su interior y se denomina diámetro hidráulico (D_h). Depende del area y del perímetro del canal,

$$D_h = \frac{4S}{P_m}$$

Donde S es la sección mojada del canal y P_m el perímetro mojado. Esto significa que para una sección circular, D_h queda definido como,

$$D_h = d$$

Donde d es el diámetro del canal. Siempre que la sección del conducto no sea circular o bien se considera que el canal está lleno de líquido, estos datos coinciden con el área (A) y el perímetro (C) de la sección transversal y D_h quedará definido como [4],

$$D_h = \frac{2ab}{a+b}$$

La Tabla 2.I muestra algunos ejemplos para calcular el diámetro hidráulico en secciones de canales con diferentes formas y suponiendo que se encuentran llenos de líquido. En canales rectangulares al existir dos lados con medidas diferentes, se suele hablar de diámetro equivalente. Observar que si un lado es mucho mayor que el otro ($b \gg a$), el diámetro hidráulico se puede simplificar ($D_h \approx 2a$), esto significa que la dimensión más pequeña del canal será la que determine el comportamiento del flujo [5].

Tabla 2.I: Diámetros hidráulicos para secciones de canales en forma circular, rectangular o anillo. También se detalla el área de la sección y la línea de contacto [5]



Área de la sección transversal (A)	$\frac{\pi d^2}{4}$	$a \cdot b$	$\frac{\pi}{4} (d_{\max}^2 - d_{\min}^2)$
Línea de contacto (C)	πd	$2a + 2b$	$\pi (d_{\max} + d_{\min})$
Diámetro hidráulico (D_h)	d	$\frac{2ab}{a+b}$	$d_{\max} - d_{\min}$

El fenómeno de transporte también debe ser considerado al trabajar con fluidos en la escala micro. El tiempo (t_{diff}) necesario para que las especies difundan en una distancia dada (L) depende de su coeficiente de difusión (D),

$$t_{diff} = \frac{L^2}{D}$$

Esto implica que a menor longitud del canal, menor es el tiempo que se necesita para que una especie difunda por él, por lo tanto menor será el tiempo de respuesta. Por otro lado, hay que tener en cuenta que con canales fabricados del orden de la micra, la cantidad de fluido que circula por su interior se encuentra en la escala de los nanolitros. El movimiento de los fluidos se describe con un conjunto de ecuaciones de derivadas parciales, no lineales conocidas como ecuaciones de Navier-Stokers. Como el objetivo principal de esta tesis ha sido el desarrollo de tecnología de fabricación y no el estudio del comportamiento de los fluidos en el interior del canal, no se entrará en la explicación en detalle de estas ecuaciones. Fijando las condiciones de contorno, se obtienen una serie de números adimensionales que representan la importancia de diversos fenómenos físicos de los fluidos en la escala nano [6]. La Tabla 2.II muestra un listado de algunos de estos números: el número de Reynolds (Re) relaciona las fuerzas de inercia con las viscosas, el número de Weber (We) relaciona las fuerzas de inercia con la tensión superficial, el número de Capilaridad (Ca) relaciona las fuerzas viscosas con la tensión superficial y el número de Péclet (Pe) relaciona la convección con la difusión.

Tabla 2.II: Números adimensionales explicados en este capítulo

Símbolo	Nombre	Ecuación	Relación	Ec. en texto
Re	Reynolds	$\frac{\nu \rho d}{\eta}$	inercia/viscosidad	Ec. 2.1
We	Weber	$\frac{\rho v^2 l}{\gamma}$	inercia/tensión superficial	Ec. 2.2
Ca	Capilaridad	$\frac{\eta v}{\gamma}$	viscosidad/tensión superficial	Ec. 2.3
Pe	Péclet	$\frac{\nu l}{D}$	convección/difusión	Ec. 2.4

El número de Reynolds (Re) representa la proporción entre las fuerzas de inercia (donde ν es la velocidad característica del fluido y ρ la densidad del fluido) y las fuerzas viscosas (η/d , donde η es la viscosidad dinámica y d el diámetro del microcanal).

$$Re = \frac{\nu \rho d}{\eta} \quad \text{Ec. 2.1}$$

Al depender del diámetro del microcanal, los Re obtenidos en microfluídica son bajos, lo que indica que se trabaja con flujos laminares porque las fuerzas que dominan son las viscosas. Flujo laminar significa que el movimiento del fluido es perfectamente ordenado, el fluido se mueve en láminas paralelas sin entremezclarse.

El número de Weber (We) es una medida de la importancia relativa de la inercia del fluido comparada con su tensión superficial.

$$We = \frac{\rho v^2 l}{\gamma} \quad \text{Ec. 2.2}$$

Donde ρ es la densidad del fluido, v la velocidad del fluido y γ la tensión superficial. A mayor tensión superficial, menor We y mayor influencia de las fuerzas capilares sobre el movimiento del fluido. Como el movimiento de líquidos en microcanales viene determinado por bajos números de Reynolds ($Re < 1$) y Weber ($We < 1$), significa que las fuerzas que predominan son la viscosa y la capilar, al contrario de la macro-escala, donde las fuerzas que gobiernan el movimiento son las gravitatorias, la inercia y la presión hidrostática.

El número de Capilaridad (Ca) es la relación entre las fuerzas viscosas y la tensión superficial que actúa en la interfase. Ca pequeños indican que la tensión superficial domina el flujo.

$$Ca = \frac{\eta v}{\gamma} \quad \text{Ec. 2.3}$$

Donde η es la viscosidad dinámica, v la velocidad del fluido y γ la tensión superficial.

Por último, se explicará el número Péclet (Pe) porque relaciona el transporte de masa entre convección y difusión para flujos que contienen más de una especie, esto quiere decir que influye en el proceso de mezclado de dos soluciones. Dependiendo de la aplicación requerida se puede preferir una mezcla por difusión antes que por convección.

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

Ec. 2.4

Donde v la velocidad del fluido, l la longitud del canal y D es el coeficiente de difusión de las dos especies. En el caso de querer realizar una reacción química entre dos especies se requieren tiempos de mezclado rápidos, es decir, una mezcla por convección.

Las **fuerzas viscosas** pueden definirse como la fricción entre un fluido y un sólido, es decir la fricción entre el líquido que se encuentra en el interior del canal con las paredes que lo definen. Éstas hacen que el flujo dentro de un microcanal sea laminar. El comportamiento de la interfase líquido-sólido es de difícil previsión porque las moléculas del líquido existentes en la interfase están en continua interacción por un lado con otras moléculas del líquido y por otro con el sólido.

A nivel microscópico, las fuerzas que afectan a cada molécula son diferentes en el interior del líquido que en la superficie. Así, en el seno de un líquido cada molécula está sometida a fuerzas de atracción que en promedio se anulan. Esto permite que la molécula tenga una energía bastante baja. Sin embargo, en la superficie existe una fuerza neta hacia el interior del líquido. Energéticamente, las moléculas situadas en la superficie tienen una mayor energía promedio que las situadas en el interior, por lo tanto la tendencia del sistema será disminuir la energía total. Para ello se disminuye el número de moléculas situadas en la superficie, de ahí la reducción de área hasta el mínimo posible.

La **tensión superficial** (γ) mide las fuerzas internas que hay que vencer para poder expandir el área superficial de un líquido. La energía necesaria para crear una nueva área superficial, trasladando las moléculas de la masa líquida a la superficie de la misma. La tensión superficial tiene como principal efecto la tendencia a disminuir en lo posible la superficie de un líquido para un volumen dado, de aquí que un líquido rodeado de aire adopte forma esférica, ya que es la forma con menor relación área/volumen y menos energía. El valor de la tensión superficial depende de la temperatura y de la naturaleza de las dos fases puestas en contacto. Para un líquido dado, disminuye con la temperatura, debido al aumento de la agitación térmica. Se denomina tensoactividad al fenómeno por el cual una sustancia reduce la tensión superficial al disolverse en agua u otra solución acuosa.

Cuando una gota se encuentra sobre una superficie sólida, la tensión superficial también intenta minimizar la energía total. El ángulo definido por la curvatura de la gota sobre la superficie se conoce como **ángulo de contacto** (θ). Este ángulo se utiliza para medir la capacidad que tiene un líquido para mojar una superficie. La Figura 2.1 muestra dos ejemplos representativos del comportamiento de un líquido sobre una superficie sólida horizontal. Principalmente depende de la relación que existe entre las fuerzas adhesivas entre el líquido y el sólido y las fuerzas cohesivas existentes en el interior del líquido.

Cuando las fuerzas adhesivas (líquido-superficie) con la superficie del sólido son muy grandes en relación a las fuerzas cohesivas (dentro del líquido), el ángulo de contacto es menor de 90 grados, teniendo como resultado que el líquido moja la superficie, se expande sobre la superficie. Cuando esto ocurre se habla de superficies hidrofílicas (Figura 2.1a). Un ejemplo se encontraría depositando una gota de agua sobre una capa de óxido de silicio, donde el agua se distribuiría por esta superficie. Por el contrario, una superficie es hidrofóbica (Figura 2.1b) cuando el ángulo de contacto es mayor de 90°. Las fuerzas cohesivas del líquido son mayores, esto significa que mantiene su forma de gota y no moja la superficie. Un ejemplo de este fenómeno se puede observar cuando se deposita agua sobre la superficie de una oblea de silicio.

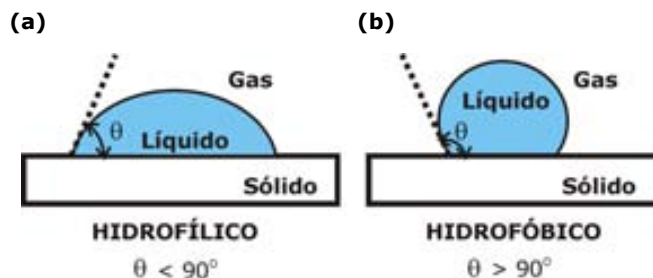


Figura 2.1: Comportamientos representativos de un líquido en contacto con una superficie sólida horizontal. Para una superficie hidrofílica el ángulo de contacto es menor de 90°, el líquido se extiende sobre la superficie. Por el contrario, cuando el ángulo formado entre el líquido y la superficie es mayor de 90°, el líquido se contrae y mantiene forma de gota sobre una superficie hidrofóbica [5].

Se conoce como **capilaridad** al fenómeno por el cual el líquido sube o baja al entrar en contacto con las paredes de un conducto de diámetro reducido. En el caso de un microcanal, éste puede succionar un líquido incluso en contra de la fuerza de gravedad.

La capilaridad se produce cuando las fuerzas adhesivas entre el líquido y el sólido son mayores que las fuerzas cohesivas dentro del líquido, esto significa que el líquido moja las paredes del microcanal. La capilaridad puede inducir el movimiento de un líquido dentro de un microcanal [7]. Un ejemplo claro se encuentra en la naturaleza, donde las plantas utilizan sus microcapilares para distribuir savia y agua hasta las hojas.

Para demostrar el fenómeno de la capilaridad se utiliza un tubo capilar de vidrio sumergido verticalmente en un líquido como muestra la Figura 2.2. Esto causa que el menisco tenga una forma curva cuando el líquido está en contacto con una superficie vertical. Si el líquido en contacto es agua, se forma un menisco cóncavo; la tensión superficial succiona la columna líquida hacia arriba hasta que el peso del líquido sea suficiente como para que la fuerza de la gravedad se equilibre con las fuerzas intermoleculares (Figura 2.2a). El peso de la columna líquida es proporcional al cuadrado del diámetro del tubo, por lo que un tubo con diámetro menor succionará el líquido en una longitud de columna líquida mayor que un tubo de mayor diámetro. Por el contrario, si el líquido es mercurio, las fuerzas intermoleculares del líquido exceden a las existentes entre el líquido y el sólido, el líquido no moja las paredes del capilar, por lo tanto, se forma un menisco convexo y la capilaridad trabaja en sentido inverso, la columna de líquido no sube por el capilar (Figura 2.2b). Dependiendo del ángulo de contacto, un líquido puede subir o no por un tubo capilar.

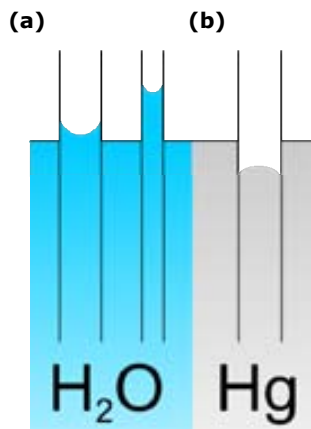


Figura 2.2: Efectos de la capilaridad en un tubo sumergido parcialmente en un líquido para caso hidrofílico en el ejemplo del agua e hidrofóbico con el mercurio.

Existen diferentes aproximaciones en desarrollo para inducir el movimiento dentro de un canal modificando los ángulos de contacto del líquido en las paredes. La Figura 2.3 muestra algunas de estas aproximaciones como la generación de

gradientes térmicos, el uso de sustancias químicas que reaccionen disminuyendo la capacidad del líquido de mojar las paredes, el uso de líquidos que recubren a su paso la pared con una película delgada o el uso de luz para generar el movimiento de la gota cuando las paredes están recubiertas de un material fotosensible.

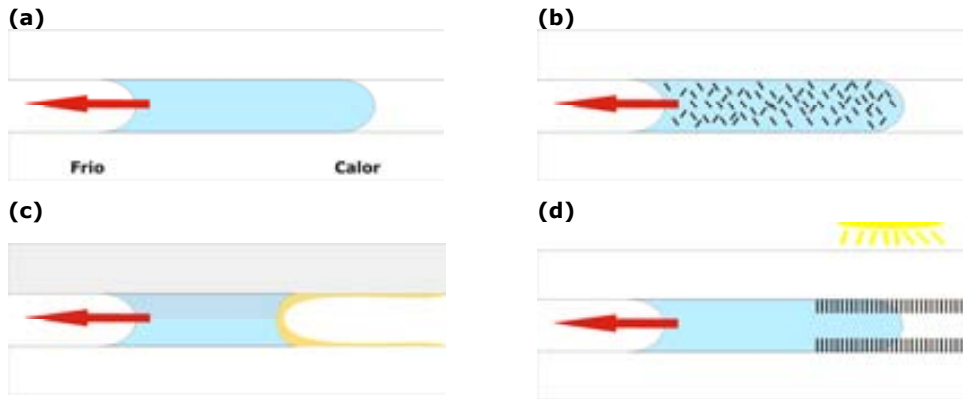


Figura 2.3: Movimiento inducido de una gota dentro de un microcanal generando un variación en la energía de la interfase sólido-líquido mediante (a) gradiente térmico, (b) gota conteniendo sustancias químicas que reaccionan disminuyendo la capacidad de mojar las paredes, (c) mediante líquido que deja un recubrimiento en las paredes que disminuye la energía superficial y (d) reacciones inducidas por radiación de luz que generan variaciones del líquido en la manera de mojar las paredes.

Aunque, probablemente los más populares sean el *electrowetting* y la dielectroforesis [8]. En el *electrowetting* se cambia el ángulo de contacto de un líquido sobre la superficie de un electrodo aplicando un gradiente de potencial. La Figura 2.4 muestra un esquema explicativo de este proceso. Sobre una gota que se encuentra depositada sobre la superficie de un electrodo (Figura 2.4a) se aplica una diferencia de potencial. La interfase sólido-líquido actúa como un condensador, cuanto mayor sea la interfase, mayor será el condensador que hará decrecer la energía electrostática haciendo que la gota se expanda sobre la superficie (Figura 2.4b). En la dielectroforesis el movimiento de partículas es causado por los efectos de polarización en un campo eléctrico no uniforme. Como las constantes dieléctricas de un cuerpo dependen de la frecuencia, las partículas pueden ser separadas y manipuladas utilizando campos de corriente alterna con varias frecuencias.

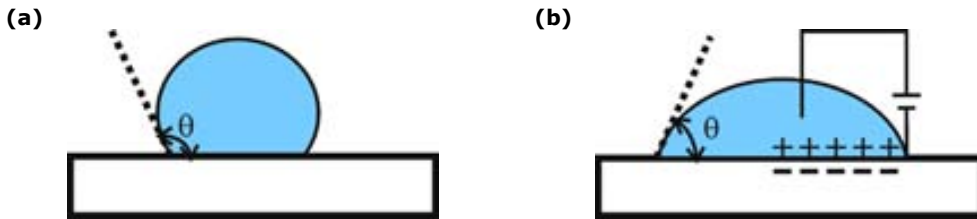


Figura 2.4: Esquema de una gota depositada sobre una superficie (a) antes y (b) después de aplicar una diferencia de potencial. Al aplicar la diferencia de potencial, la interfase sólido-líquido actúa como un condensador que hace que la gota se expanda sobre la superficie.

2.1.1.1 μ TAS y lab-on-a-chip

Los dispositivos o sistemas integrados que realizan todas las etapas de un análisis (muestreo, pretratamiento de muestra, transporte de muestra, reacciones químicas, separación de analito, obtención del producto y detección) en un chip microfluídico son conocidos como microsistemas de análisis total (micro Total Analysis System - μ TAS).

Los μ TAS son sistemas microfluídicos que integran todos los elementos necesarios para realizar un análisis químico [2]. Son una evolución del concepto de sistemas de análisis total (Total Analysis Systems - TAS) aparecido a principios de los años ochenta [9]. Los TAS buscaban automatizar la química analítica incorporando todos los procesos analíticos a un sistema fluídico. Los μ TAS representaban una versión reducida y más rápida de los TAS debido al uso de volúmenes en el orden de los μ l y tiempos de análisis del orden de los segundos. El nombre y concepto de μ TAS fue introducido por A. Manz *et al.* en 1990 [10] que predijeron la miniaturización de los laboratorios, desde la primera etapa hasta la última, es decir, desde el muestreo hasta su detección pasando por la preparación de la muestra, las reacciones químicas, la separación del analito y la obtención del producto final. La Figura 2.5 muestra el tamaño característico que presenta un dispositivo microfluídico en comparación con otros objetos comunes.

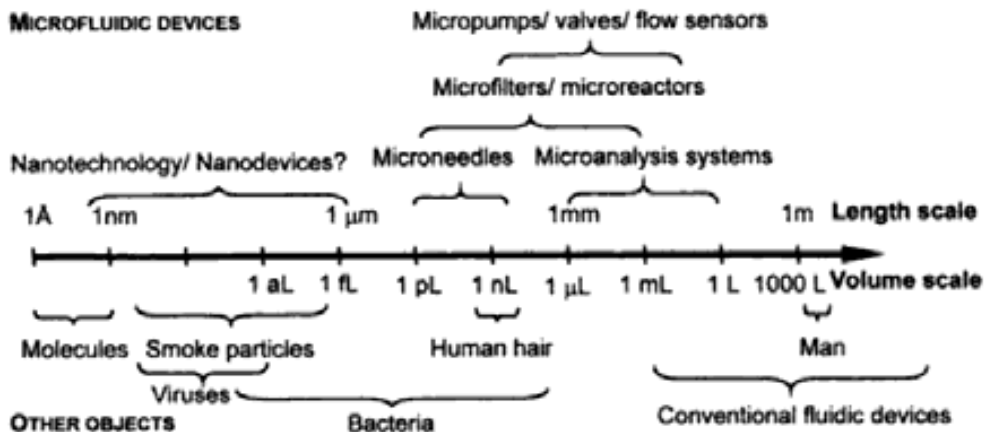


Figura 2.5: Tamaño característico de los dispositivos microfluídicos [11]

Los primeros μ TAS se consiguieron a principio de los noventa donde se transfirieron procesos de electrocinética a dispositivos fabricados con tecnología de microsistemas. El movimiento de los fluidos era producido por electroosmosis, es decir, se producía el movimiento de un líquido polar aplicando un campo eléctrico. Se consiguió la separación de partículas fluorescentes en un chip [12, 13] y de aminoácidos marcados con partículas fluorescentes [14, 15] por electroforesis capilar. Por el momento se trabaja con muestras puras en un sistema microfluídico de principio a fin. Esto es debido a la presencia de partículas que pueda contener una muestra real podrían obturar el microcanal o quedarse adheridas a las paredes del mismo.

La limitación que presentan los sistemas que utilizan electroosmosis para desplazar fluidos se encuentra en su uso, sólo pueden ser utilizados con fluidos polares. Por ello, en otros casos se aplica presión para inducir el movimiento en algunos dispositivos, como en la realización de una cromatografía líquida en un chip [16]. También se utilizan microbombas que contienen una parte móvil para producir un movimiento oscilatorio que hace que el líquido se desplace. Una recopilación del trabajo realizado en microbombas se puede encontrar en [17, 18]. Pérez-Castillejos [5] ha demostrado la capacidad de un ferrofluido para sellar un microcanal y generar presiones con su movimiento al aplicar un campo magnético que han inducido el desplazamiento de un líquido. Los ferrofluidos son suspensiones coloidales estables de partículas superparamagnéticas [19]. Cuando estos líquidos se encontraban

dentro de un microcanal, se podían mover fácilmente aplicando un campo magnético [5]. Se podría decir que funciona como un embolo. La ventaja que ofrecen reside en no necesitar conexiones externas, tampoco limita su uso a líquidos polares.

Efectos como el bombeo electrocinético, el movimiento de fluidos por tensión superficial o por fuerzas electromagnéticas que normalmente no tienen gran influencia en la escala macroscópica, en la microescala ofrecen una serie de ventajas sobre principios mecánicos. Para conseguir reducir el tamaño de un laboratorio convencional y poder integrar los análisis que allí se realizan es necesario conocer como se comportan los fluidos en la escala micro/nanométrica. Lab-on-a-chip es un amplio término utilizado que intenta abarcar cualquier tipo de investigación cuyo objetivo sea la miniaturización de procesos químicos y biológicos [2]. Añadir que no es un término científico bien definido y se ha detectado en la bibliografía que en ocasiones se habla indistintamente de lab-on-a-chip o de μ TAS.

La miniaturización de estos sistemas de análisis no consiste sólo en fabricar microcanales. Existen dificultades debidas a los diferentes elementos que han de ser integrados y también las que aparecen con el comportamiento de los fluidos en la escala micrométrica. Trabajar con volúmenes del orden de los μ l o menores reduce los tiempos de análisis hasta segundos y permite explorar posibles fenómenos que no son posibles o evidentes con dispositivos tradicionales. Estos nuevos fenómenos, como por ejemplo la aparición de nuevas reacciones químicas, junto con la fabricación de nuevos microinstrumentos conducen a nuevas aplicaciones en química, medicina o bioingeniería. Se pueden encontrar numerosos ejemplos fabricados para procesar y detectar células, proteínas, DNA o pequeñas moléculas [20-22]. La Figura 2.6 muestra un sistema integrado con todas las funciones necesarias para analizar una célula. No todas las partes son necesarias en un mismo dispositivo, dependiendo del estudio se integraran unas u otras. Por ejemplo, para la detección del DNA, se deberían lisar las células antes de la detección utilizando un chip PCR¹. En cambio, para un análisis ELISA² se necesitaría la captura selectiva utilizando anticuerpos inmovilizados sobre la superficie microfabricada.

¹ La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como **PCR** por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde.

² La técnica **ELISA** ("*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*" *Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas*) se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente.

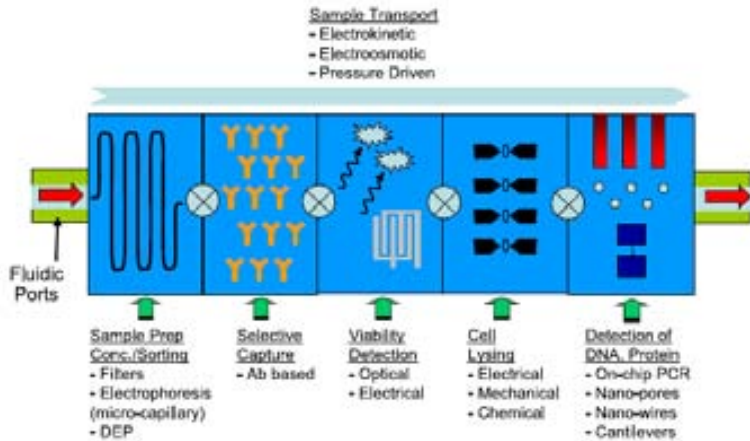


Figura 2.6: Dibujo esquemático de los componentes de un sistema miniaturizado para detección de células o microorganismos [23].

Además de su uso para la detección de células o microorganismos, otra de las líneas de aplicación seguida para el desarrollo de lab-on-a-chip ha sido el estudio de medicamentos [2, 24]. Se han fabricado dispositivos microfluídicos para analizar fármacos existentes y descubrir de nuevos. La Figura 2.7 resume las etapas necesarias para realizar el proceso de análisis en el estudio y descubrimiento de nuevos fármacos mediante métodos microfluídicos.

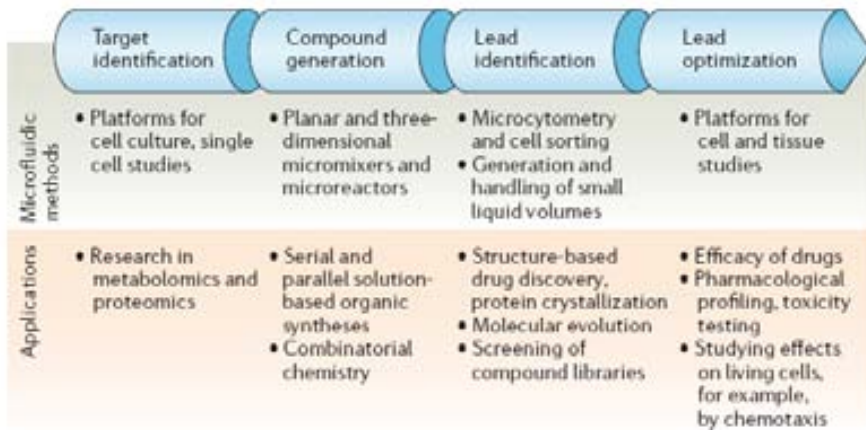


Figura 2.7: Métodos microfluídicos necesarios para el proceso de búsqueda de nuevos fármacos y sus respectivas aplicaciones [2].

2.1.1.2 MEMS en microfluídica

Aunque la mayoría de estudios sobre los chips microfluídicos se han basado en su potencial analítico, se han realizado considerables esfuerzos para aplicar la tecnología de microsistemas (MST) en la obtención de dispositivos microfluídicos. La integración de los elementos que componen un dispositivo microfluídico no se consiguió hasta que se aplicó la tecnología empleada en los MEMS [25] para su fabricación, donde la elevada precisión obtenida para micromecanizar el silicio hizo que se aplicara a otros materiales como vidrio, cerámicas y plásticos.

Los **MEMS** son dispositivos con al menos alguno de los elementos que lo componen del orden de las micras y que han sido fabricados utilizando tecnologías de microfabricación [26]. Los MEMS presentan una serie de ventajas que otros sistemas macroscópicos no pueden alcanzar, como son su pequeño tamaño, peso y consumo, su fabricación por lotes y la posibilidad de incluir electrónica de control. Adicionalmente, en muchos casos, presentan una alta viabilidad y robustez.

Uno de sus mayores atractivos se basa en la versatilidad que les ha permitido tener una gran variedad de aplicaciones y de mercados. Mayoritariamente los MEMS se han basado en tecnologías de microfabricación del silicio [27], en gran parte por el conocimiento y equipos que se tiene para su procesado provenientes de la microelectrónica tradicional, pero también debido a las excelentes propiedades mecánicas, térmicas y eléctricas del silicio. Además de la posibilidad de integrar los dispositivos fabricados en sistemas más complejos.

A finales de los 90 aparecieron los BioMEMS al empezar a utilizar los MEMS para aplicaciones biológicas y biomédicas [23]. Algunas de las ventajas que presentan los BioMEMS son su biocompatibilidad, su pequeño tamaño, su uniformidad, su fiabilidad, su reproducibilidad, su baja potencia, su control preciso, su elevada sensibilidad óptica y eléctrica o su capacidad de interacción con líquidos. Así como la posibilidad de integrar un sensor, un actuador o componentes eléctricos durante su fabricación. También ofrecen la posibilidad de realizar implantes miniaturizados, habilidad para efectuar respuestas rápidas actuando como sensor o proporcionar estimulaciones eléctricas para utilizarlo, por ejemplo, como un marcapasos [28]. Los BioMEMS también proporcionan procedimientos no invasivos y sin dolor para tratamientos. Por ejemplo, una microaguja podría dosificar fármacos o recoger muestras para análisis alcanzando los fluidos intersticiales sin llegar a las terminaciones nerviosas que son las causantes del dolor.

Por otro lado, el reciente paso de la microelectrónica tradicional a la nanoelectrónica está permitiendo el desarrollo de nuevos equipos de nanotecnología para la fabricación de Sistemas Nano-Electro-Mecánicos (NEMS). Los NEMS son dispositivos que tienen alguna de sus partes funcionales con dimensiones por debajo de los 100 nm [29]. De hecho, la combinación de los BioMEMS con la nanotecnología ha hecho posible la realización de sistemas con dimensiones similares a entidades biológicas como bacterias o células [30, 31]. La Figura 2.8 muestra un dibujo esquemático de las áreas de creciente interés que han resultado de la integración de las ciencias de la vida y la biomedicina con los micro/nanosistemas. Las áreas dibujadas a la derecha son aplicaciones que desde la biología se realizan sobre los micro/nanosistemas, mientras que las que aparecen a la izquierda son la solución encontrada en los micro/nanosistemas para problemas existentes en biología y biomedicina.

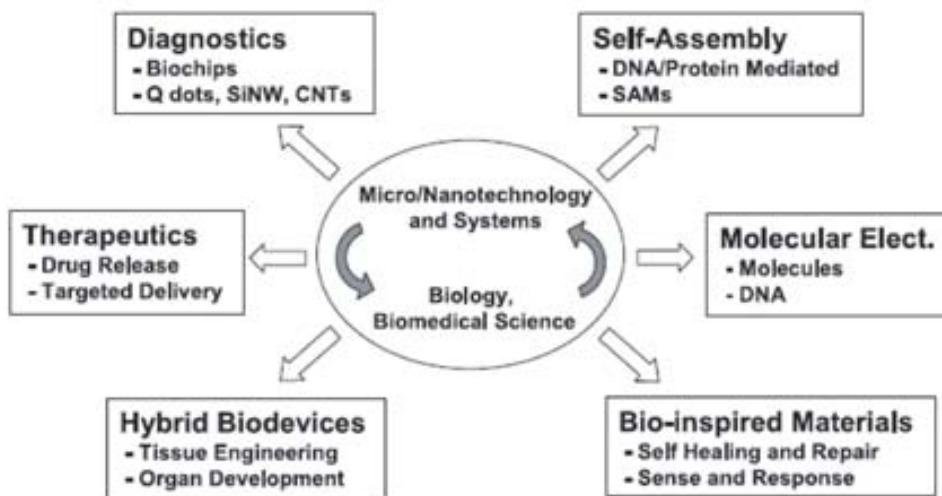


Figura 2.8: Áreas de investigación resultado de la integración de sistemas microneumecánicos con las ciencias biomédicas [23].

A modo de ejemplo, la microscopía de fuerzas atómicas (AFM) ha inducido el desarrollo de micro/nanovoladizos basados en la micro/nanomecanización del silicio. El pequeño espesor que presentan estos dispositivos hace que sean extremadamente sensibles a reacciones químicas y biológicas sobre su superficie. Esta característica, les ha convertido en uno de los dispositivos con mayor interés en el campo de la bioquímica para el reconocimiento molecular [32-34]. La adsorción de moléculas en

la superficie de estos voladizos puede ser detectada estáticamente [35] o por cambio en la frecuencia de resonancia de la estructura [36]. Las tecnologías de silicio pueden ser utilizadas para la producción en masa de estructuras complejas muy precisas en la escala micrónica y submicrónica, abriendo nuevas oportunidades en la biología celular [37, 38]. Los MEMS fabricados en este material han sido empleados para realizar análisis nanomecánicos de células [39, 40], para pesar, manipular y posicionar [41-43] células individuales. De otro modo, se han demostrado las aplicaciones biomoleculares de los BioMEMS realizando reconocimiento [35, 44] o manipulación [45] molecular. Estos sistemas ofrecen ventajas como son elevada versatilidad, bajo coste para la producción en masa y tecnología de manufacturación basada en más de 40 años de experiencia para la industria de semiconductores.

2.2 Aspectos comerciales

Una vez definidos los conceptos teóricos, es conveniente situar los campos en los que se ha trabajado dentro de un contexto industrial. Es por eso que se describirá brevemente los aspectos comerciales de la microfluídica y de los MEMS.

2.2.1 Microfluídica

La microfluídica se ha convertido en una tecnología clave de integración en el desarrollo de muchas compañías dedicadas a las ciencias de la vida [46]. El principal mercado de la microfluídica continúa siendo el estudio y desarrollo de nuevos fármacos debido a las ventajas que ofrece la microfluídica aumentando el número de análisis realizados en paralelo, disminuyendo el tiempo y los costes de los mismos. Los dispositivos microfluídicos están siendo comercializados tanto por pequeñas y medianas empresas como por grandes multinacionales, esto significa que en un futuro inmediato formarán parte indispensable de las tecnologías necesarias para llevar a cabo la tarea de investigación. Se prevé un crecimiento regular del mercado de las aplicaciones en los próximos cuatro años, pero el crecimiento más elevado se producirá en la parte de los diagnósticos. La microfluídica ofrece una ventaja muy competitiva basada en la posibilidad de análisis automatizados y descentralizados, pero también facilita la aparición de diagnósticos moleculares con éxito. La previsión del crecimiento de mercado de los componentes microfluídicos se muestra en la Figura 2.9.

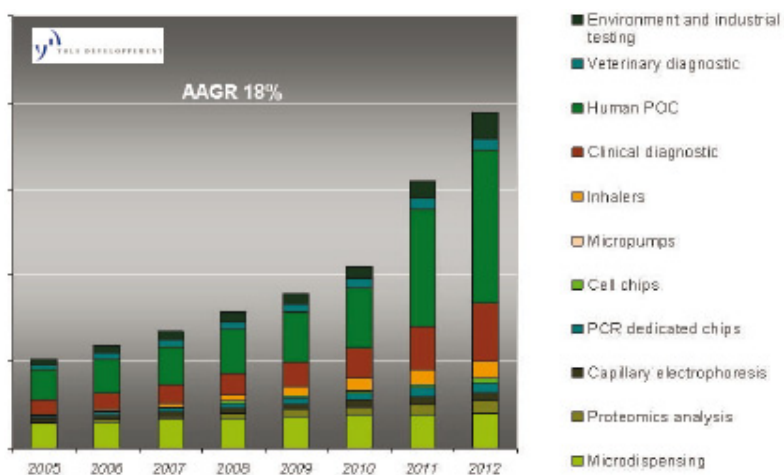


Figura 2.9: Previsión de mercado para los productos microfluídicos para el periodo 2005-2012 (M\$) [46]. AAGR= Average Annual Growth Rate.

Según el gráfico presentado se espera que los componentes microfluídicos para el diagnóstico clínico alcancen un valor de 1B € para el 2011. Para que la microfluídica se introduzca en el mercado de los diagnósticos clínicos hace falta una tecnología de validación desde un punto de vista de la manufacturación. Sólo si las tecnologías se adecuan al mercado de la diagnosis clínica, se conseguirán precios de venta asequibles.

Algunas compañías microfluídicas están adaptando sus negocios al modelo de evolución del mercado, aumentando el número de fusiones y adquisiciones producidas. Industrias del campo de la diagnosis están incluyendo la microfluídica como una de sus estrategias para su crecimiento y desarrollo. De hecho la microfluídica se ha identificado claramente como una tecnología que permite dar soporte al desarrollo en el mercado de la biología molecular.

Los ingredientes necesarios para el éxito son:

- La microfluídica se está convirtiendo en una prueba de concepto de un evento signficante. Algunas compañías están totalmente posicionadas para la industrialización de la microfluídica.
- La microfluídica ofrece las soluciones tecnológicas esperadas para la evolución del mercado del diagnóstico.
- Compañías de elevada tecnología innovadoras están entrando en el campo de la diagnosis clínica.
- Ellas hacen que este mercado sea dinámico al convergir tecnologías como la microfluídica en los biomercados

2.2.2 MEMS

Según un informe realizado por Yole Développement [47] la predicción de crecimiento del mercado de los MEMS espera alcanzar un valor de \$14 billones para el 2012 (Figura 2.10). Esto representa doblar la cantidad del 2007 valorada en \$7.1 billones. En el 2008, se espera que el mercado se sitúe en \$7.8 billones. Todos estos datos hacen suponer un crecimiento del 14% para el periodo 2007-2012. El crecimiento para el periodo comprendido en 2007-2010 se espera que sea modesto (11%) produciéndose una fuerte subida a partir del 2010.

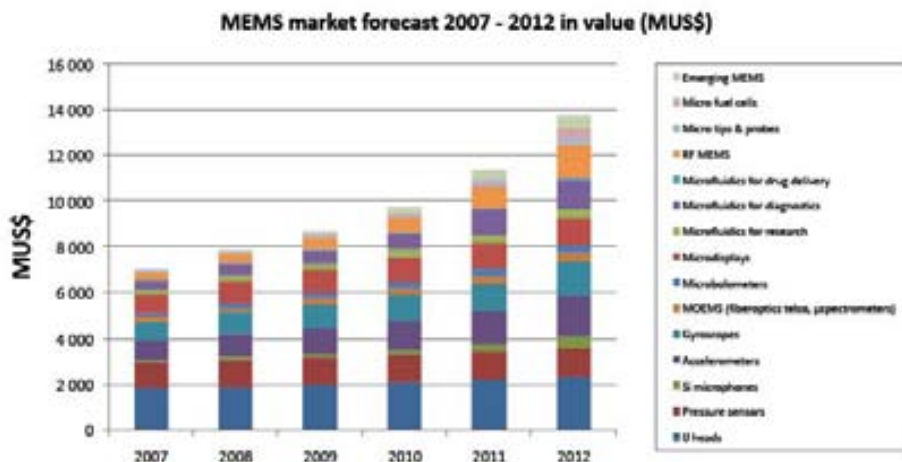


Figura 2.10: Predicción de mercado para los MEMS en US\$ [47].

Durante el 2007 salieron al mercado nuevos dispositivos MEMS. Por primera vez se ha realizado una predicción basada en unidades producidas para el periodo 2007-2012 (Figura 2.11). Durante el 2007 se produjeron 2 billones de unidades de MEMS y se espera aumentar su producción hasta 2.5 billones durante este año.

Para el 2012, se espera alcanzar una producción de 6.7 billones de unidades en todo el mundo.

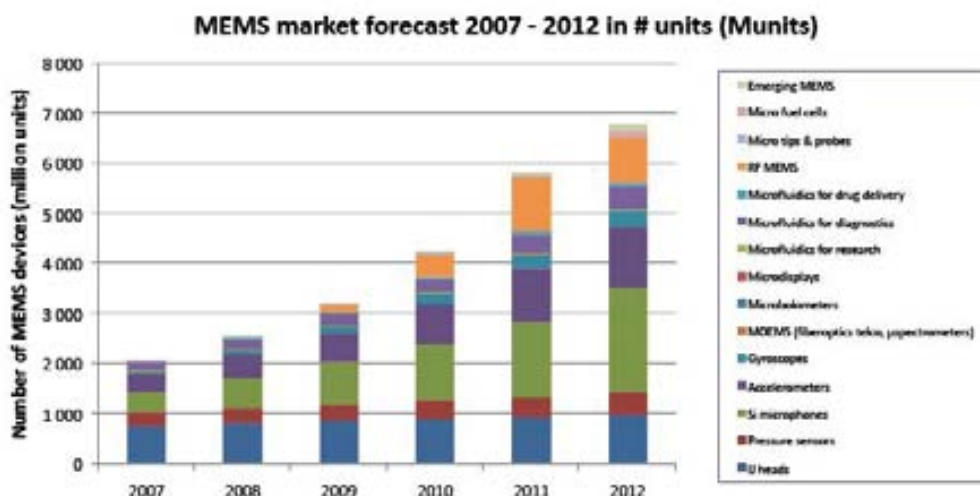


Figura 2.11: Predicción del mercado de los MEMS en millones de unidades [47].

Las aplicaciones de MEMS se pueden dividir en siete campos mayoritarios: Automoción, Aeronáutica, Consumo, Defensa, Industria, Medicina y las Ciencias de la Vida y Telecomunicaciones. Es interesante observar que a pesar del incremento de unidades de MEMS (25%) producido entre el 2007 y el 2008, el mercado sólo creció un 9%. Esto se explica por la elevada presión en los precios que los dispositivos MEMS están experimentando. Después del 2009, los RF MEMS y los micrófonos de silicio contribuirán a aumentar las unidades de dispositivos MEMS (sobre el 45%).

Mientras que el campo de la automoción ha sido históricamente el conductor para el mercado de los MEMS, éste sólo crecerá un 3% entre el 2007 y el 2012. Por otro lado, el campo de la Medicina y las Ciencias de la Vida, el Consumo y las Telecomunicaciones (*wireless*) contribuirán significativamente en el mercado de los MEMS después del 2010. Incrementarán respectivamente un 18%, un 11% y un 40%. En el 2012 las aplicaciones para el consumo constituirán más del 40% del mercado total (en \$). El mercado de los MEMS para nuevas aplicaciones y las pilas de combustible tendrán un fuerte impacto a partir del 2009. Entre el periodo comprendido entre el 2009 y el 2012 su producción aumentará un 67% y un 158% respectivamente. Se espera que los chips microfluídicos para el suministro de fármacos, para la diagnosis clínica y el estudio celular sean de los que más aumenten su producción, con un 42% , un 23% y un 37% respectivamente.

2.3 Tecnologías de fabricación para microfluídica

El uso de tecnologías de microfabricación en campos como la química, la biología o la medicina han permitido la disminución del volumen de muestra y del tiempo empleado en la realización de los análisis [11]. También ha incrementado la posibilidad de automatizar los procesos y de efectuar un número elevado de análisis al mismo tiempo, es decir, la realización de análisis paralelos. El desarrollo de nuevas tecnologías es de gran importancia para alcanzar estos objetivos.

Los métodos de fabricación se pueden dividir en dos grandes grupos: *top-down* y *bottom-up* [48]. Los métodos *top-down* empiezan con diseños a gran escala y van reduciendo sus dimensiones laterales antes de formar nanoestructuras. Por otro lado, los métodos *bottom-up* utilizan átomos o moléculas para construir nanoestructuras. La Tabla 2.III intenta mostrar los materiales utilizados normalmente en estos métodos de fabricación, las dimensiones mínimas alcanzadas, así como las ventajas e inconvenientes que presentan.

Tabla 2.III: Visión general de las técnicas de fabricación para microfluídica más comunes [48].

Método		Material	nm	Ventajas	Inconvenientes
Top-down	volumen	Si , SiO_2, Si_3N_4	~10	Buen control de áreas grandes, adecuado para producción en masa	Procesos litográficos caros
	Superficie	SiO_2, Si_3N_4 , fotoresinas	~100	Relativamente fácil de fabricar	Tiempos de reacción largos, limitada longitud del canal
	Molde	Moléculas, polímeros	~20 nm	Barato y relativamente fácil replicar la estructura del molde	Fabricación del máster cara.
Bottom-up			2-10	Principalmente utilizado para estructuras naturales bien definidas	Poco control de la posición de las estructuras.

2.3.1 Tecnologías basadas en LTCC y en polímeros

Se buscaban materiales compatibles para realizar una integración híbrida con la microelectrónica, con buenas propiedades mecánicas, eléctricas y estable térmicamente, además de fácil proceso de fabricación y un bajo coste. Este material se encontró en el uso de *Low Temperature Cofired Ceramic (LTCC)*. Esta tecnología se basa en la fabricación de dispositivos por láminas de cerámica. A partir de diferentes patrones transferidos a las diferentes capas, se pueden conseguir dispositivos complejos de microfluidica como sistemas de análisis miniaturizados [49]. Esta tecnología fue introducida por Hughes y Dupont como una alternativa al desarrollo en la tecnología en MEMS [50]. El término *co-fired* hace referencia a la posibilidad de sinterizar pastas conductoras que hayan sido serigrafiadas en una lámina de cerámica. Los dispositivos fabricados en tecnología LTCC se encuentran en la escala meso, es decir, sus dimensiones oscilan entre las 10 hasta los centenares de micras.

Existen diferentes procesos de microfabricación asociados a este material como el perforado, el láser o la fotolitografía, entre estos. En el trabajo presentado en esta memoria se ha trabajado con el micromecanizado Computer Numerically Controlled (CNC) que permite fácilmente la rápida fabricación de un prototipo. Las dimensiones mínimas que se pueden obtener con esta técnica dependen de la fresa o broca utilizada y de la contracción sufrida por las cerámicas durante la sinterización. La sinterización es necesaria para eliminar los componentes orgánicos que contenga la cerámica y alcanzar la interpenetración de las partículas de alúmina entre diferentes capas para obtener el dispositivo monolítico. Esto significa que al utilizar una broca de 100 μm y considerando una contracción del 15% en el plano, se pueden conseguir motivos de $\sim 85 \mu\text{m}$.

La Figura 2.12 muestra un esquema con las diferentes etapas seguidas para la obtención de un dispositivo en LTCC. Un patrón previamente dibujado con los componentes del dispositivo definidos es serigrafiado y/o micromecanizado sobre unas láminas de cerámica verde. A continuación estas capas de cerámica son laminadas. La laminación es un proceso importante porque su adecuada realización evitará futuras deformaciones en la estructura interna del dispositivo que produzcan, por ejemplo, fugas.

El proceso de laminado seguido en este trabajo ha sido por termocompresión, es decir, se ha aplicado presión mediante prensa a una temperatura entre 70 y 150°C. Finalmente se obtiene el dispositivo fabricado en LTCC.

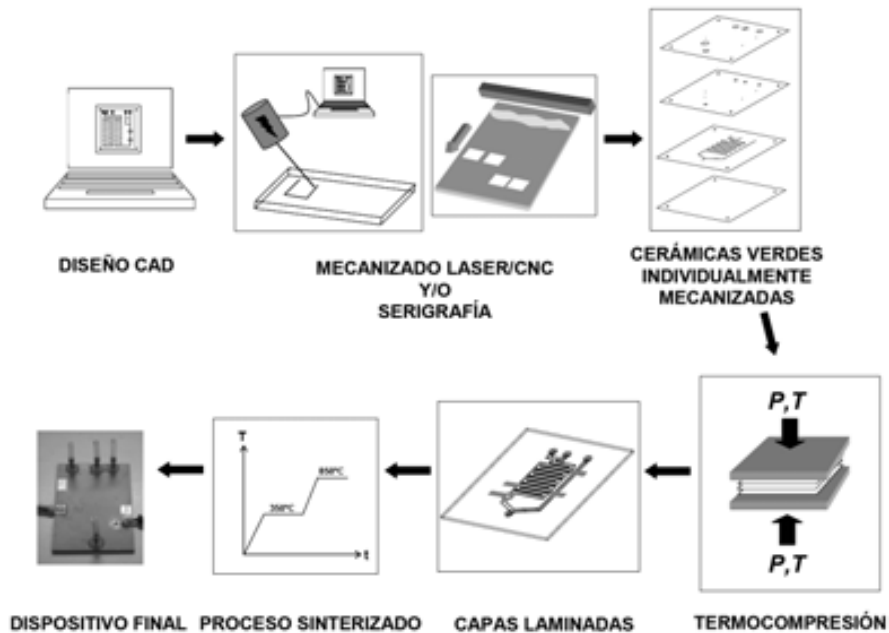


Figura 2.12: Esquema general del proceso de fabricación de un dispositivo mediante la tecnología en LTCC: se laminan y/o serigrafian unas láminas de cerámica verdes siguiendo un patrón previamente diseñado. La laminación por compresión se produce a una temperatura inferior a 1000°C. Después del proceso de sinterización se obtiene el dispositivo final [49].

Los dispositivos fabricados en LTCC son rígidos y no son transparentes al visible ni al ultravioleta. Estos son algunos de los motivos que han hecho evolucionar una serie de técnicas basadas en la fabricación de dispositivos utilizando polímeros. La fabricación en SU-8 es un proceso barato, biocompatible y compatible con procesos de litografía UV. No requiere técnicas complejas ni máscara caras y permite la fabricación en lotes. Además los procesos basados en SU-8 permiten la fabricación de microcanales profundos con paredes pocos rugosas, adecuado para aplicaciones ópticas [51].

Tanto la tecnología basada en SU-8, como la basada en silicio sirven para fabricar los masters de las técnicas conocidas como *soft-lithography*. Estas técnicas engloban un conjunto de técnicas basadas en la creación de micro/nanoestructuras basadas en el estampado, moldeado y grabado a partir de la fabricación de moldes con polímeros elastoméricos [52].

El grupo del Professor Whitesides de la Universidad de Harvard ha desarrollado una gran variedad de procesos *soft-lithography* para el polimetilsiloxano (PDMS) [53-56]. Este material está siendo ampliamente utilizado para aplicaciones biológicas por características como su flexibilidad, biocompatibilidad y transparencia.

La Figura 2.13 muestra el proceso de fabricación de un molde en PDMS. Sobre una oblea de silicio (Figura 2.13a) se realiza una etapa de fotolitografía para obtener un master (Figura 2.13b-d). Una vez obtenido el master se deposita el líquido precursor de PDMS mezclado con el agente curante. El PDMS se obtiene curando térmicamente la mezcla. Una vez obtenido el molde de PDMS se separa del master (Figura 2.13e) y se obtiene la capa estructurada de PDMS (Figura 2.13f). La ventaja que ofrece esta técnica se basa en la obtención de varias capas estructuradas de PDMS de un mismo master en poco tiempo repitiendo los pasos d y e de la Figura 2.13.

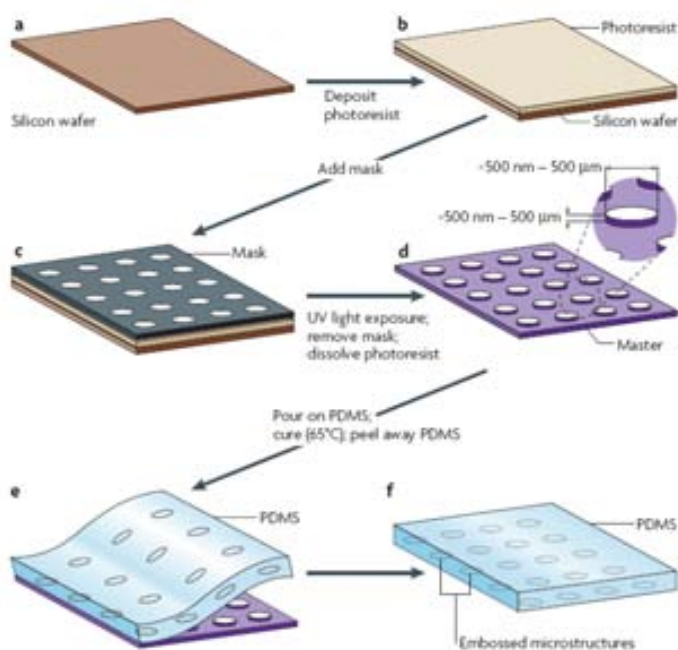


Figura 2.13: Esquema del proceso de fabricación en PDMS, (a) partiendo de una oblea de silicio (b) se deposita y se espina una fotoresina, (c) se coloca una máscara, (d) se ilumina con luz UV para transferir los motivos a la fotoresina y obtener un master, (e) el PDMS se deposita sobre el master, se cura térmicamente y se separa, (f) finalmente se obtiene la capa estructurada en PDMS [38].

La capa de PDMS obtenida puede ser utilizada directamente como dispositivo microfluidico si se sella con una superficie plana (vidrio u otra capa de PDMS), como sello para crear monocapas sobre superficies o como molde para replicar la estructura en otros materiales [57]. La Figura 2.14 muestra algunas de las técnicas de *soft-lithography* desarrolladas en PDMS. Una vez fabricado un master, se pueden realizar tantas replicas en PDMS como moldes sean necesarios, vertiendo el precursor del PDMS, curándolo térmicamente y separando la capa estructurada del master. Este proceso se repite las veces necesaria hasta obtener el número deseado de moldes (Figura 2.14a).

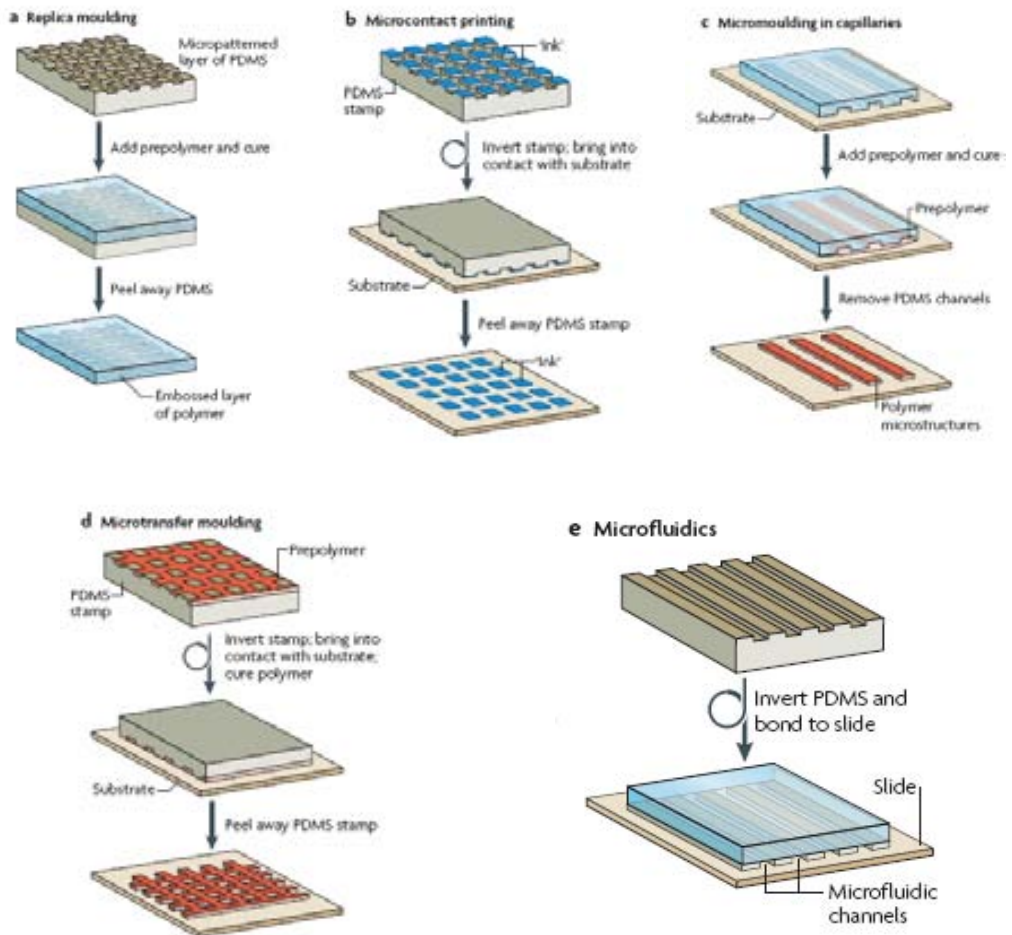


Figura 2.14: Diferentes técnicas desarrolladas en PDMS para *soft-lithography*, (a) replica del molde, (b) impresión por microcontacto, (c) micromoldeado por capilaridad, (d) microtransferencia del molde y (e) fabricación de canales de microfluidica [38].

En la impresión por microcontacto se crean monocapas sobre una superficie utilizando el molde de PDMS como sello (Figura 2.14b). En el micromoldeado por capilaridad (Figura 2.14c) se rellenan por capilaridad las cavidades abiertas que quedan al poner en contacto el molde de PDMS con otra superficie, normalmente vidrio. Después de curar el material utilizado para rellenar las cavidades, se crean estructuras sólidas. En la microtransferencia (Figura 2.14d) del molde se deposita un prepolímero líquido sobre el molde. El conjunto se pone en contacto con una superficie donde una vez curado el prepolímero líquido, se quedará fijada la estructura. Por último señalar que si la capa estructurada de PDMS contiene microcanales, se puede obtener un dispositivo microfluidico cubriendo estos canales con otra capa (Figura 2.14e)

Los dispositivos microfluídicos construidos por *soft-lithography* se obtienen de manera fácil y rápida. Además son de bajo coste, pero no ofrecen la variedad de construcción ni la posibilidad de implementar microelectrónica de control que se obtiene utilizando las técnicas de microsistemas para la fabricación de estos dispositivos microfluídicos.

2.3.2 Tecnologías de microfabricación en silicio

Las tecnologías microelectrónicas han sido indispensables para el desarrollo de la microfluídica [25] y son necesarias para el desarrollo de la nanofluídica [48]. Como se ha comentado con anterioridad, su implementación en la microfluídica hizo realidad la disminución del tamaño de los dispositivos fabricados. Además ofrecen la posibilidad de integrar en el dispositivo elementos de detección como sensores para realizar medidas electroquímicas de las muestras que circulan dentro del microcanal [58].

El micromecanizado en silicio puede dividirse en dos categorías: *Bulk micromachining* o micromecanizado en volumen donde las estructuras se definen directamente grabando la oblea de silicio mientras que en *surface micromachining* o micromecanizado en superficie se depositan, sobre la superficie de la oblea, capas de diferentes materiales que son grabadas selectivamente. Los grabados de la oblea se clasifican en ataques secos o ataques húmedos dependiendo de la fase en la que se encuentra el atacante o en isotrópicos y anisótropos, dependiendo de los planos cristalográficos del silicio.

En los ataques isotrópicos no hay una dirección preferencial de ataque, el silicio se ataca en todas las direcciones mientras que en los ataques anisotrópicos hay una dirección preferencial en la que la oblea se graba con mayor velocidad. La Figura 2.15 muestra un esquema explicativo de estos dos tipos de ataques.

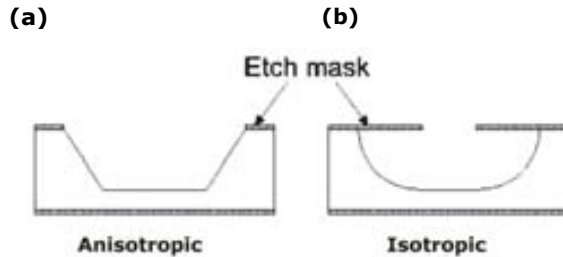


Figura 2.15: Sección transversal de una oblea después de (a) un grabado anisotrópico donde hay una dirección preferencial o (b) un grabado isotrópico donde se graban más o menos a la misma velocidad todas las direcciones.

Los ataques húmedos implican sumergir la oblea en un reactivo para realizar el grabado mientras que para los grabados secos (*Reactive-Ion Etching*, RIE), la oblea es colocada en un reactor donde se introducen diferentes gases. Con una fuente de radiofrecuencia se genera un plasma donde se forman iones y radicales libres que grabarán la oblea expuesta. Para conseguir grabados de elevada profundidad manteniendo las paredes verticales, se utiliza el grabado seco profundo (*Deep Reactive-Ion Etching*, DRIE). Pero para realizar el grabado, antes hay que transferir la forma que se quiere grabar a la oblea. Esto se consigue mediante una etapa de fotolitografía. En esta etapa se transfiere los motivos deseados a una capa de fotoresina depositada sobre la oblea. Después de irradiar la resina y eliminar la parte no deseada, la fotoresina endurecida ejercerá de máscara para transferir los motivos a la oblea.

Los microcanales fabricados en silicio para microfluidica se suelen sellar con una cobertura de vidrio utilizando soldadura anódica para sellar la unión y evitar fugas. Debido a la transparencia del vidrio, esta técnica de soldadura es adecuada para aplicaciones biomédicas y biológicas, donde en ocasiones se requiere disponer de una visión óptica para la manipulación y evaluación de los fluidos. En microelectrónica, la soldadura se suele realizar sobre una placa calefactora. Las temperaturas suelen estar alrededor de 400°C. La Figura 2.16a muestra una imagen del montaje realizado para una soldadura anódica. Se colocan en contacto directo las superficies pulidas del vidrio y de la oblea de silicio.

Sobre la oblea de vidrio se coloca el cátodo porque la placa calefactora hace a la vez función de ánodo. Al alcanzar la temperatura de 400°C se aplica un voltaje cuyo valor depende del tamaño de la oblea y de la posible existencia de material aislante como el óxido de silicio. Para obleas de vidrio Pyrex de 1 mm de grosor el voltaje aplicado suele estar entre 200-1000 V. Los iones de sodio Na^+ del vidrio se mueven hacia la superficie donde se ha aplicado un potencial negativo, creándose de esta manera un exceso de iones oxígeno en la interfase vidrio-silicio. Estos iones difunden hacia el silicio reaccionando con él y creando un enlace químico irreversible. El esquema de este proceso se muestra en la Figura 2.16b.

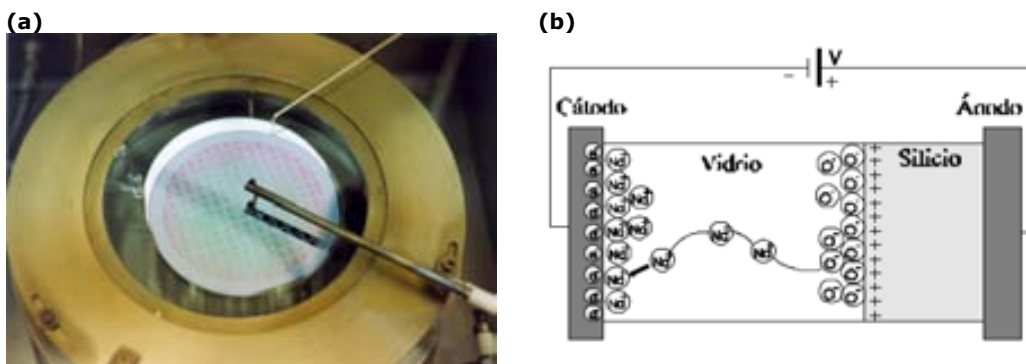


Figura 2.16: (a) Imagen del montaje para realizar una soldadura anódica y (b) esquema del proceso de soldadura anódica [59]

Las microtecnologías y los procesos de fabricación por lote intentan minimizar el montaje, empaquetado y conexión final de un dispositivo. En el caso de los sistemas microfluídicos sigue siendo necesario para cubrir los microcanales fabricados y realizar la conexión con equipos de bombeo o de medida. De hecho la comercialización de los dispositivos microfluídicos es difícil debido al cuello de botella que se encuentra en el proceso de fabricación en la etapa de montaje y empaquetado del dispositivo [11, 60].

Normalmente un dispositivo microfluídico necesita ser conectado a un sistema de para bombear líquido en su interior, para suministrar energía al dispositivo o para obtener información del sistema. Características como la obtención de bajos volúmenes muertos, amplio rango de presión o amplia resistividad a reactivos químicos son de difícil combinación con diseños simples y baratos. Fredrickson *et al.* ofrecen un recopilatorio de los sistemas de conexión utilizados [61].

En general, los sistemas de conexión pueden clasificarse dependiendo de la manera que tienen de acoplarse por presión o por el uso de adhesivos, es decir, en extraíbles o permanentes. Los primeros utilizan elementos como juntas o anillos (Figura 2.17a) para acoplar y sellar presionando los tubos a los accesos a los microcanales. Son adecuados para trabajar a bajas presiones debido a las pocas fuerzas adhesivas que presentan. Los segundos (Figura 2.17b) conectan los tubos sobre o en el interior de los orificios de entrada y después añaden adhesivo para sellar la unión. Este hecho limita por un lado la distancia entre conexiones cuando el tubo está sobre el orificio de entrada o puede producir que el adhesivo por capilaridad entre y obstruya el canal.

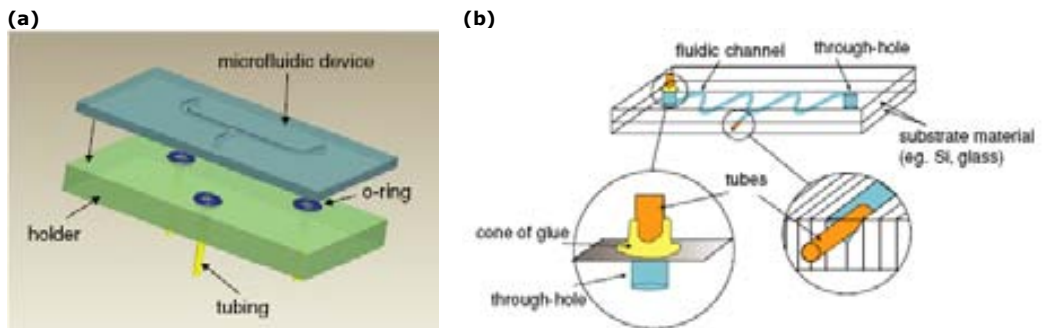


Figura 2.17: (a) Imagen de los elementos en forma de anillo utilizados para las conexiones por presión y (b) utilizando adhesivos para fijar el tubo sobre o dentro del orificio de entrada [62].

Snakenborg *et al.* [62] presentan una manera rápida de establecer conexiones evitando el uso de adhesivos, pero está dirigida a dispositivos con una superficie plana en la zona de unión entre los tubos y el dispositivo microfluídico. Gray *et al.* [63] y Pan *et al.* [64] utilizan unas estructuras intermedias fabricadas con DRIE donde se acoplan los capilares o tubos para realizar las conexiones. Estas conexiones son mostradas en la Figura 2.18. Ninguna de estas estructuras está integrada monolíticamente al sistema microfluídico.

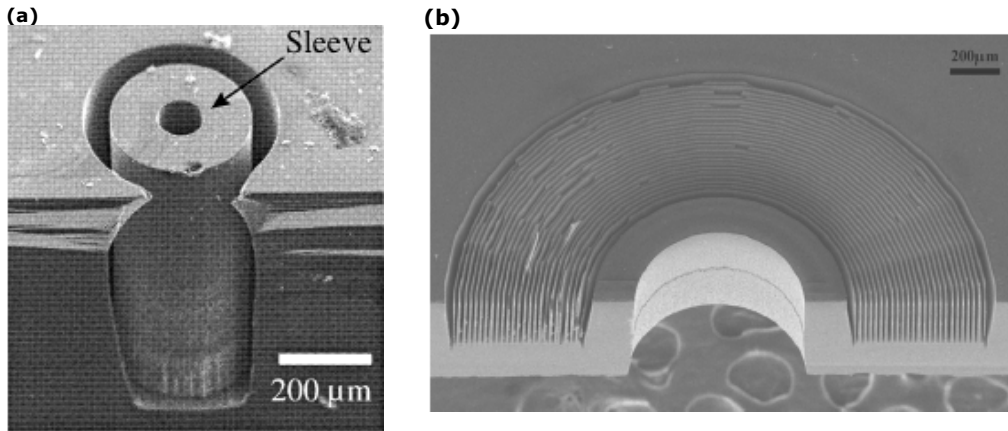


Figura 2.18: Conexiones fluídicas fabricadas por Gray *et al.* [63] y Pan *et al.* [64] con DRIE.

2.3.3 Tecnologías de nanomecanización: Focused Ion Beam

El Focused Ion Beam (FIB) es una técnica relativamente nueva utilizada en semiconductores y en ciencias de materiales para grabados, perforaciones y deposiciones [65-67] de diferentes materiales. Algunos autores también la han utilizado para micro/nanomecanizados de MEMS [68-70]. El FIB utiliza una fuente de iones de metal líquido para formar un haz energético fino (aproximadamente 10 nm de diámetro). Este haz es enfocado sobre la superficie de la muestra y es movido sobre un área seleccionada, es decir, las áreas pueden ser micromecanizadas selectivamente mediante los iones Ga^+ .

Para poder realizar los micro/nanomecanizados de la superficie seleccionada, existe la posibilidad de aumentar la apertura del haz o aumentar la intensidad de corriente para optimizar la relación entre la precisión requerida y el tiempo total necesario para obtener el micromecanizado de la superficie. Las profundidades del grabado pueden ser fácilmente controladas con una selección apropiada del tiempo y corriente utilizados. Una selección adecuada de estos parámetros evitará daños en la superficie debido a problemas de *backscattering* o efectos de calor.

La elevada selectividad del FIB permite utilizarlo para definir diferentes formas y medidas sin necesidad de máscaras adicionales porque el micro/nanomecanizado se define *in situ*. Esto lo convierte en una técnica adicional para la tecnología de microsistemas.

Además, los microscopios del FIB están equipados con plataformas 3D que permiten el micromecanizado del chip desde diferentes orientaciones. La elevada movilidad de estas plataformas permiten realizar incisiones en áreas pequeñas y de difícil acceso.

2.4 Estado del arte en el IMB-CNM

El interés existente en el IMB-CNM por trabajar en microfluídica lo encontramos en los proyectos en vigor o en los ya realizados por diferentes grupos. A continuación se comentará brevemente algunos ejemplos del trabajo previo realizado en el Instituto de Microelectrónica de Barcelona, IMB-CNM (CSIC).

Centrándonos en el trabajo previo realizado en el grupo de investigación, en un proyecto anterior denominado MICROMAG, se desarrollaron canales y se demostró la habilidad de un ferrofluido para bombear líquidos en el interior de este canal [5]. En el desarrollo de este estudio se grabaron canales sobre una oblea de silicio y se recubrieron con un vidrio. Se observó la necesidad de obtener canales cuyas cuatro paredes fueran del mismo material y esto condujo a la fabricación de la primera generación de micronanopipetas. En este mismo trabajo también se desarrollaron mezcladores pasivos donde al producir el movimiento de dos fases líquidas con ferrofluido se obtenía la mezcla de estas dos fases.

Dentro del Departamento de Micro/Nanosistemas existen diversas líneas de trabajo en microfluídica. A modo de ejemplo, se ha desarrollado un biosensor óptico modificando la superficie de una guía de onda hueca con un enzima [71] para detectar variaciones en la concentración de H_2O_2 de una solución que se encuentra en el interior de la guía de onda, se han conseguido realizar medidas electroquímicas colocando microelectrodos de oro dentro de microcanales fabricados en PDMS [72] donde el movimiento de la solución con especies electroactivas se producía en el interior del microcanal aplicando un campo eléctrico externo. En esta misma línea se están realizando estudios para implementar microelectrodos selectivos a iones dentro de canales fabricados en metacrilato.

2.5 Microdispositivos para las ciencias de la vida y la química. Biofuncionalización, manipulación y estudio de células vivas

La aplicación de la microfluídica en los campos de la biología, la química, la bioquímica o la medicina ha abierto la posibilidad de realizar análisis donde la miniaturización y los nuevos efectos hallados en la microescala han dado nuevas soluciones a los problemas existentes. Estudios en biología celular que requieren la manipulación, estimulación o detección de material dentro y/o cerca de pequeños clusters o incluso en una única célula son importantes en las ciencias de la vida. La posibilidad de colocar, fijar y/o manipular células se vuelve más accesible con los avances realizados al aplicar la tecnología de fabricación en MEMS o la de impresión por microcontacto a la biología.

Entre los dispositivos microfluídicos para aplicaciones en ciencias de la vida se han encontrado microagujas, micropipetas, microdispensadores, microfiltros, microseparadores, micromezcladores o microreactores. En este apartado se explicaran dispositivos utilizados para las ciencias de la vida y la química en general, así como algunos ejemplos de las aplicaciones encontradas. En particular, se detallaran las aplicaciones encontradas en la bibliografía relacionadas con el campo de la biología y la medicina para las micro/nanopipetas. Estas aplicaciones se pueden clasificar en suministro celular por un lado y de fármacos de manera local y sistemática por otro. Se han fabricado entre otros, agujas de silicio y vidrio para inyectar ADN en células [73, 74], agujas para inyectar sustancias químicas en tejidos neuronales [75], suministro intravascular de medicamentos [76] o microagujas hipodérmicas para inyectar fármacos [77]. Las puntas fabricadas hasta el momento se han utilizado para inyectar ADN o medicamentos, pero se están empezando a utilizar para inmovilizar células para realizar su estudio [78]. También se ha encontrado aplicación de micro/nanopipetas como herramientas en biofuncionalización [79].

Por otro lado, entre los BioMEMS fabricados se han encontrado tres clasificaciones diferentes dependiendo del modo de detección utilizado: mecánico, eléctrico u óptico.

2.5.1 BioMEMS

Los BioMEMS se utilizan para aplicaciones de diagnóstico, terapéuticas o ingeniería de tejidos [30]. El diagnóstico representa el mayor campo de aplicación para los BioMEMS fabricados. Los métodos utilizados para la detección se clasifican en mecánico, eléctrico u óptico. La Figura 2.19 muestra de manera esquemática estos sistemas de detección.

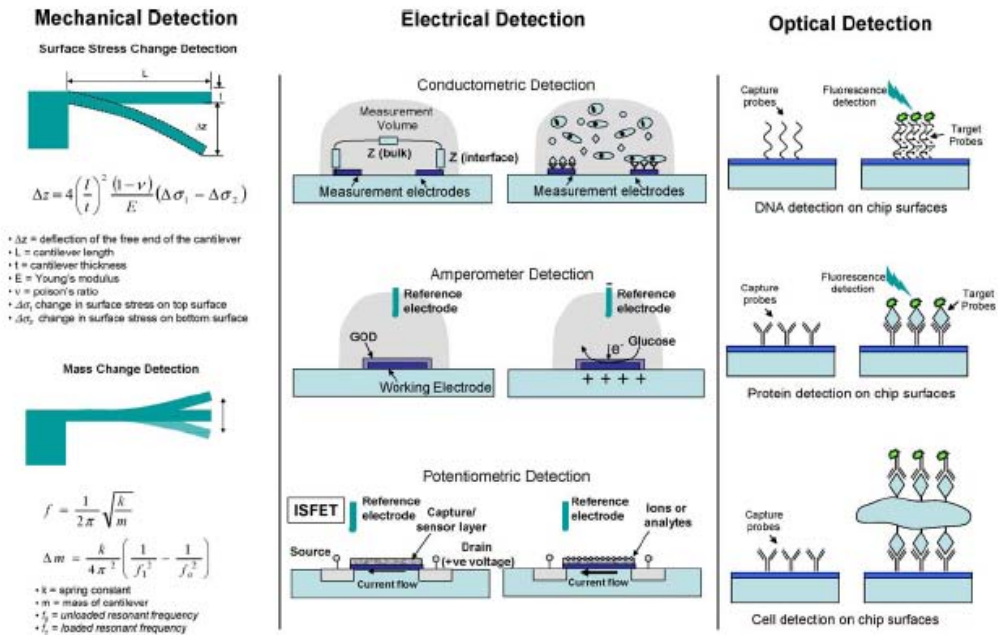


Figura 2.19: Modalidades de detección utilizadas en BioMEMS[23].

Para la detección mecánica se utilizan sensores tipo voladizo (cantilever) y realizan la detección de dos modos diferentes. Por esfuerzos mecánicos (*stress sensing*) o por masa (*mass sensing*). A modo de ejemplo, en el modo esfuerzos mecánicos, existe una reacción bioquímica que tiene lugar selectivamente en una cara del cantilever. El cambio producido en la energía libre de la superficie provoca un cambio en los esfuerzos mecánicos del cantilever, este cambio se traduce en un doblamiento diferente del cantilever que puede ser medido óptica o eléctricamente. Utilizando este tipo de detección se ha conseguido reconocer DNA y proteínas ancladas sobre cantilevers fabricados en silicio [35].

Dentro de la detección eléctrica o electroquímica existen tres modos de detección: biosensores amperométricos donde los electrones del proceso de

reducción-oxidación producido se asocian con una densidad de corriente; biosensores potenciométricos donde se mide un cambio de potencial debido a los iones (ISFETs) o las reacciones químicas producidas en los electrodos, y los conductométricos donde se miden los cambios de conductividad debidos al cambios producidos en el medio iónico entre los dos electrodos. Un ejemplo extensamente conocido son los sensores enzimáticos utilizados para la detección de glucosa [80].

La detección óptica se basa en la fluorescencia o en la quimiluminiscencia. En el caso de las técnicas para la detección por fluorescencia utilizan marcadores fluorescentes que emiten en una determinada longitud de onda y la presencia, ausencia o reducción de señal óptica indica una reacción de enlace. BioMEMS basados en la detección por fluorescencia han sido utilizados para la detección de células individuales [81].

2.5.2 Microagujas, micropipetas y microdispensadores

Las micropipetas son dispositivos microfluídicos importantes para los análisis químicos y médicos debido a la necesidad de saber con exactitud las cantidades a mezclar. Es preciso controlar tanto la manera de aspirar una muestra como la de dispensarla y los dispositivos existentes no cumplen del todo con los requisitos necesarios para trabajar en las dimensiones reducidas requeridas por un dispositivo microfluídico.

Las micropipetas pueden ser clasificadas dependiendo de su manera de funcionar, es decir, en la manera que inducen el movimiento del líquido en su interior: dispensadores tipo jeringa, bomba micromecanizada o las que se basan en la tecnología de inyección por tinta [82]. En el tipo jeringa, los sistemas convencionales basan su funcionamiento en el movimiento de un pistón. Éste se puede mover de manera manual o eléctrica dentro de un cilindro y desplazar el líquido que hay en el interior de una punta o aguja. Ejemplos de este tipo pueden ser adquiridos comercialmente de la casa Eppendorf [83] y Hamilton [84]. Pueden actuar bidireccionalmente, es decir, aspirar o dispensar muestra pero debido a sus dimensiones, son difíciles de acoplar a sistemas automáticos de manipulación de líquidos.

Los dispensadores que basan su funcionamiento en el movimiento de una bomba micromecanizada fueron propuestos por Wallmark *et al.* y Smits *et al.* [85, 86] y definían el movimiento producido con un piezoeléctrico.

Lintel *et al.* desarrollaron membranas para que realizasen la función de microbombas [87]. Este tipo de pipetas fueron construidas principalmente para conducir líquidos a través de un canal.

El tercer tipo de dispensador se basa en la tecnología de inyección de tinta donde el líquido es expulsado por una aguja con la ayuda de un transductor piezoeléctrico. Los primeros dispositivos fueron realizados en silicio por Bassou *et al.* [88]. Aunque pueden llegar a dispensar hasta 50 nl [89] para poder aspirar una muestra han de ser acoplados a una jeringa o a una microbomba externa.

En el caso de las micropipetas, no sólo es importante el sistema utilizado para conseguir el movimiento del líquido y de esta manera aspirar o dispensar la muestra, también hay que tener en cuenta una de las partes más importantes como es la punta en la que finalizan, su forma y tamaño definirá la gota generada [11]. El material utilizado para su fabricación, las medidas y las formas pueden ser diferentes dependiendo de su aplicación.

Las tecnologías de micromecanización ofrecen la posibilidad de fabricar agujas de diferentes formas y tamaños gracias a etapas como la fotolitografía donde pueden ser definidas con un gran número de formas y tamaños. Su uso final puede hacer que estos dispositivos puedan estar implementados en diferentes equipos con el sistema de bombeo requerido acoplado externamente. Entre las características que debe presentar una microaguja se encuentra tener una punta afilada para poder atravesar la piel, resistencia para evitar su doblamiento o su fractura al inyectar la muestra y la necesidad de utilizar materiales biocompatibles.

Los materiales utilizados para la fabricación de las micropipetas, así como su diseño y dimensiones, como se ha comentado, dependen de su aplicación final. Hay micropipetas fabricadas en silicio [90-92], en óxido de silicio [93], en nitruro de silicio [94, 95], en polisilicio [96], metal [97-100] o polímero [101]. Algunos de estos dispositivos se muestran en las imágenes SEM de la Figura 2.20. La aplicación para la que hayan sido fabricadas puede hacer que estén o no implementadas en otros equipos, esto significa que pueden estar acoplados a un sistema externo de bombeo.

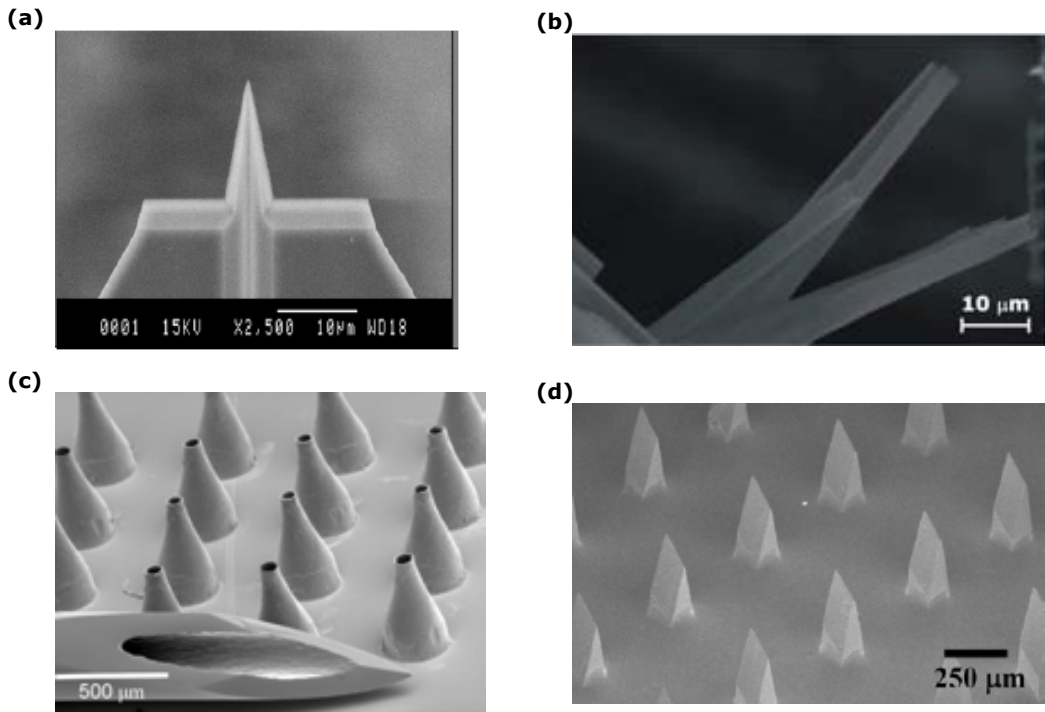


Figura 2.20: Imágenes SEM de agujas fabricadas en diferentes materiales, (a) silicio [91], (b) óxido de silicio [93], (c) Níquel [99] y (d) PDMS [101]

En la bibliografía, se ha detectado que hay ocasiones en las que se habla indistintamente de aguja o de micropipeta. Tradicionalmente se ha hablado de aguja cuando la aplicación final ha sido dispensar fármacos o extraer muestras de sangre insertando la aguja en la piel, pero al empezar a aparecer agujas de tamaño reducido han surgido nuevas aplicaciones como la posibilidad de reducir el dolor al atravesar la piel para inyectar fármacos, extraer muestra, estimular tejidos o manipular células. La utilización de técnicas desarrolladas en microelectrónica para su fabricación ha hecho posible la integración monolítica de sensores que han permitido realizar medidas después de estimular una célula [102-104]. También ha permitido la fabricación de voladizos ha hecho que se obtuvieran con diferentes formas y tamaños. En biología se ha usado tradicionalmente la técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM) para estudiar topografía [105] y propiedades nanomecánicas de muestras biológicas [40].

En la actualidad, el AFM se ha convertido en una potente técnica en farmacología [106], biotecnología [107], microbiología [108, 109], biología estructural [110] y genética [111] al ofrecer la posibilidad de manipular y medir moléculas individuales [112]. Por otro lado, los BioMEMS han servido como instrumentación científica para realizar estudios "in vivo" que abarcan desde el cultivo celular hasta el análisis bioquímico [113]. La aplicación de esta tecnología a la fabricación de microagujas o micropipetas ha permitido realizar la estimulación neuronal [114]. La fabricación en PDMS ha permitido obtener microcámaras donde se ha controlado durante su crecimiento la forma de una bacteria [115].

En el estudio de células, una técnica común es la fijación de células mediante aspiración, normalmente con pipetas de vidrio [116, 117]. Micropipetas de sujeción y de inyección han sido fabricadas utilizando micro/nanotecnologías [27]. Su reducido tamaño las ha hecho adecuadas para trabajar por ejemplo en la inyección intracitoplasmática de esperma (ICSI) [118], es decir, en la técnica de inseminación artificial. Recientemente se ha conseguido inyectar fluido en el interior de una célula utilizando nanotubos de carbono [119]

Otras de las aplicaciones encontradas, la funcionalización de superficies con componentes bioquímicos, tiene múltiples aplicaciones en la detección bioquímica y en la electrónica biomolecular. En particular, la funcionalización de superficies de oro con capas autoensambladas de grupos tioles ha despertado un gran interés. Las monocapas de tioles son altamente efectivas para inmovilizar biomoléculas como proteínas, anticuerpos o DNA. Estudios fundamentales en biología precisan de pequeños volúmenes de biomoléculas dispuestos en *arrays*. Estos *arrays* han de estar inmovilizados con una elevada precisión en un determinado punto. Con esta finalidad se han desarrollado técnicas de funcionalización directa como el Nanoplotter™ [120, 121] o la impresión por microcontacto [122]. Las técnicas en AFM como el Dip-Pen™ [123] pueden funcionalizar una superficie utilizando puntas de AFM con un extremado control de la posición, tiempo de contacto y condiciones ambientales. Sin embargo, todas estas técnicas presentan algunas limitaciones como la discontinuidad de flujo en la punta de AFM como es el caso del Dip-Pen™. Xu *et al.* [124] soluciona este problema presentando unos canales que dispensan un flujo continuo de líquido hacia la punta para realizar *arrays*, pero en este dispositivo estos canales están totalmente descubiertos. También se han fabricado *arrays* para inmovilizar bacterias sobre una superficie utilizando moldes fabricados en PDMS.

La combinación de la técnica de microcontacto con las SAMs ha permitido inmovilizar selectivamente células bacteriales [125]. Comentar también el interés generado en el desarrollo de pequeños voladizos para realizar labor de electrodos y realizar medidas eléctricas o electroquímicas. La ventaja reside en tener electrodos separados en distancias reducidas para detectar corrientes superficiales en diferentes materiales. Peterson *et al.* [126] presentan unos electrodos con separaciones del orden de las micras fabricados con tecnología MEMS. T. Lehnert *et al.* [78] han trabajado en el diseño de MEMS para la inmovilización y caracterización eléctrica de células individuales. Park *et al.* [127] han desarrollado unos nanohilos depositados sobre una microaguja para realizar medidas electroquímicas y obtener información del interior de una célula.

2.5.3 Micromezcladores y microreactores

Los micromezcladores se utilizan para mezclar dos soluciones y favorecer que se pueda producir una reacción. En los análisis biomédicos o químicos, una muestra se suele analizar mezclándola con un reactivo y por ello, es necesario que la mezcla se produzca rápidamente. Se pueden clasificar en activos o pasivos (Figura 2.21).

Los primeros utilizan alguna parte móvil o tipo de energía para crear una perturbación en el sistema para conseguir la mezcla. Los segundos consiguen mezclar las soluciones por difusión o diseñando canales con geometrías complicadas para aumentar el área de la interfase donde tiene lugar la difusión. Este fenómeno se conoce como advección caótica [128].

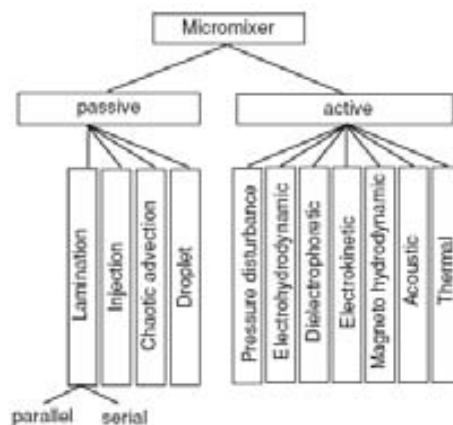


Figura 2.21: Clasificación de los micromezcladores [129]

Los micromezcladores activos se pueden clasificar según la perturbación externa que reciban para realizar la mezcla como presión, temperatura, dielectroforesis entre otros. Suelen ser estructuras complicadas y requieren de sistemas de fabricación complejos.

Además la necesidad de integrarlos en el sistema que provoque la perturbación para realizar el proceso, aumenta el precio de su producción. Por otro lado, los micromezcladores pasivos suelen ser estructuras robustas, estables y de fácil integración en un sistema más complejo [130]. Estos se pueden clasificar dependiendo de las características de las fases mezcladas como flujo laminar paralelo, laminar en serie, inyección, advección caótica o gota. La Figura 2.22 muestra dos micromezcladores de flujo laminar paralelo, en forma de T y en forma de Y.

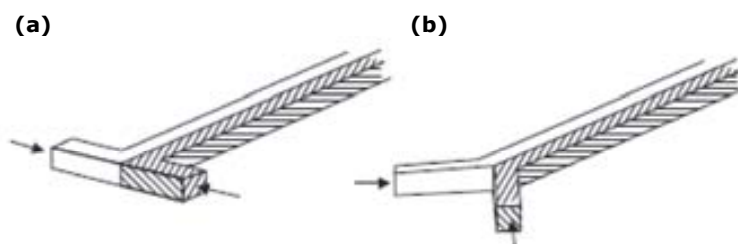


Figura 2.22: Micromezcladores con flujo laminar paralelo (a) en forma de T, (b) en forma de Y [129].

Como se ha comentado, el número de Re en sistemas de microfluídica son bajos, lo que indica que se trabaja con flujos laminares. Esto puede ser útil por ejemplo para controlar la mezcla de una reacción química o la separación de los productos de la reacción. Que dos moléculas se encuentren y reaccionen depende del coeficiente de difusión. Tiempos de difusión cortos, del orden de los milisegundos, indicarán una mezcla eficaz de dos soluciones en contacto en la escala micrométrica.

Debido a la ausencia de turbulencias en la escala micro, se están realizando muchos esfuerzos en diseñar dispositivos que favorezcan la mezcla de soluciones. Bessoth *et al.* desarrollaron un mezclador basado en flujo laminar [131]. Sin embargo, el proceso de mezclado puede ser mejorado utilizando advección caótica [132] o produciendo la mezcla en gotas con un flujo de dos fases [133]. Micromezcladores con forma de T han sido fabricados para conseguir una rápida difusión en la realización de un inmunoensayo y conseguir medir pequeñas moléculas en concentraciones subnanomolares en menos de 1 min [134].

Los microreactores son dispositivos con dimensiones laterales por debajo de 1 mm donde tiene lugar la reacción química [135]. Ofrecen más ventajas que los reactores de escala convencional porque incluyen una inmensa mejora en la eficiencia energética, velocidad de reacción y rendimiento, seguridad, producción en el sitio dependiendo de la demanda y un mejor control del proceso. Su reducido tamaño facilita el control de la temperatura, parámetro importante en numerosas reacciones, mayores velocidades de transferencia de masa y calor permitiendo alcanzar condiciones de reacción más agresivas. También se consiguen menores tiempos de reacción, lo que facilita que intermedios inestables pasen rápidamente al siguiente paso de la reacción. La seguridad la ofrecen por la posibilidad de realizar reacciones de productos inflamables en pequeñas cantidades, lo que permite un mejor control y evitar la formación de llamas o explosiones al disminuir la posibilidad de vertido accidental de los reactivos. Además se puede integrar un sensor para detectar fallos en el microreactor y de esta manera poder ser solucionados [11].

2.5.4 Microfiltros y microseparadores

En un dispositivo microfluídico es necesario el pretratamiento de la muestra. Por este motivo son necesarios los microfiltros. La muestra a analizar suele contener impurezas que pueden obturar el microcanal, un microfiltro no permite la entrada de estas partículas al microcanal, es decir, como su nombre indica, filtra la muestra y recoge únicamente la parte destinada a su estudio. A veces interesa separar partículas de un fluido para su posterior estudio, este proceso también se puede llevar a cabo utilizando un microfiltro.

Los microfiltros se clasifican en membrana o filtro hueco dependiendo de la tecnología de fabricación utilizada y por tanto en el tamaño de poro que define el filtro [11]. Los primeros son membranas delgadas que contienen los poros utilizados para filtrar. El tamaño y la forma de los poros se definen con un proceso fotolitográfico y se obtienen después de un proceso de grabado [136]. Los filtros huecos utilizan el espacio vacío dejado entre dos capas estructurales para filtrar. Pueden ser fabricados en *surface* o *bulk micromachining*. El tamaño del poro viene determinado en superficie por el grosor de la capa sacrificial y en volumen por el proceso de grabado. Se han fabricado microfiltros en forma de *U* que han sido utilizados para fijar y ordenar células individuales dentro de una matriz o *array* [137]. También se han fabricado microfiltros en silicio para separar células de una muestra sanguínea [138].

Los microfiltros pueden ser considerados como un tipo de microseparador. Mientras los microfiltros discriminan partículas dependiendo de su tamaño, existen otros microseparadores que las separan dependiendo de otras propiedades físicas como el coeficiente de difusión, la masa o la carga eléctrica [11]. Un ejemplo sería el microseparador fabricado por Han *et al.* [139] donde por dielectroforesis consiguen separar los glóbulos rojos de los blancos contenidos en un medio altamente conductivo.

2.6 Objetivos de la tesis

Los objetivos del trabajo presentado en esta memoria han venido emmarcados por los proyectos señalados en la introducción: MINAHE y MINAHE II. Proyectos de alto impacto centrados en temas donde se espera un mayor crecimiento en el mercado según la previsión presentada por Yole Développement [46, 47].

El objetivo principal se basa en conseguir diseñar, desarrollar procesos de fabricación y caracterizar los microdispositivos para su aplicación en las ciencias de la vida. En particular se ha trabajado en el diseño, proceso de fabricación y caracterización de micro/nanopipetas o microdispensadores, microfiltros, micromezcladores y microelectrodos.

Para conseguirlo se han marcado los siguientes objetivos concretos:

- Conseguir desarrollar una tecnología de fabricación versátil basada en la tecnología MEMS.
- Conseguir la integración monolítica de los dispositivos fabricados.
- Resolver problemas para la obtención de los chips individuales.
- Conseguir un buen encapsulado y conexionado de los dispositivos fabricados.
- Preparar de superficies creando monocapas autoensambladas de manera localizada para realizar fácilmente futuras biofuncionalizaciones.
- Conseguir micro/nanopipetas cuyas paredes sean transparentes para su aplicación en biología celular, es decir, para poder trabajar con células vivas.
- Compatibilizar técnicas de nanomecanización como el FIB para conseguir partes funcionales de los dispositivos, en concreto la parte en voladizo, del orden de los nanómetros.

2.7 Referencias

- [1] Whitesides GM, *The Origins and the Future of Microfluidics*, Nature, 442, 2006, 368-373.
- [2] Dittrich PS and Manz A, *Lab-on-a-Chip: Microfluidics in Drug Discovery*, Nature Reviews Drug Discovery, 5, 2006, 210-218.
- [3] Janasek D, Franzke J, and Manz A, *Scaling and the Design of Miniaturized Chemical-Analysis Systems*, Nature, 442, 2006, 374-380.
- [4] Bergadà JM, *Concepto Diámetro Hidráulico*, Documento interno, 2007.
- [5] Pérez-Castillejos R, *Study and Applications of Ferrofluids in Microfluidics*, PhD Thesis in Departament d'Enginyeria Electrònica. 2003, Universitat Politècnica de Catalunya: Barcelona.
- [6] Squires TM and Quake SR, *Microfluidics: Fluid Physics at the Nanoliter Scale*, Reviews of Modern Physics, 77, 2005, 977-1026.
- [7] Colin DB, *Motion of Liquids on Surfaces*, ChemPhysChem, 2, 2001, 580-582.
- [8] Jones TB, *On the Relationship of Dielectrophoresis and Electrowetting*, Langmuir, 18, 2002, 4437-4443.
- [9] Widmer H, *Trends in Industrial Analytical-Chemistry*, Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2, 1983, R8-R10.
- [10] Manz A, Graber N, and Widmer H, *Miniaturized Total Chemical-Analysis Systems - a Novel Concept for Chemical Sensing*, SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL, 1, 1990, 244-248.
- [11] Nguyen NT, *Fundamentals and Applications of Microfluidics* 2002, Norwood, MA: Artech house, Inc.
- [12] Manz A, *Planar Chips Technology for Miniaturization and Integration of Separation Techniques into Monitoring Systems-Capillary Electrophoresis on a Chip*, J. Cromatogr., 593, 1992, 253-258.
- [13] Jacobson S, Hergenroder R, Koutny L, and Ramsey J, *High-Speed Separations on a Microchip*, ANALYTICAL CHEMISTRY, 66, 1994, 1114-1118.
- [14] Harrison D, Fluri K, Seiler K, Fan Z, Effenhauser C, and Manz A, *Micromachining a Miniaturized Capillary Electrophoresis-Based Chemical-Analysis System on a Chip*, Science, 261, 1993, 895-897.
- [15] Jacobson S, Hergenroder R, Koutny L, and Ramsey J, *Open-Channel Electrochromatography on a Microchip*, Analytical Chemistry, 66, 1994, 2369-2373.
- [16] Mcenery M, Tan A, Alderman J, Patterson J, O'mathuna S, and Glennon J, *Liquid Chromatography on-Chip: Progression Towards a Micro-Total Analysis System*, Analyst, 125, 1999, 25-27.
- [17] Woias P, *Micropumps - Past, Progress and Future Prospects*, Sensors and Actuators B-Chemical, 105, 2005, 28-38.
- [18] Woias P, *Micropumps-Summarizing the First Two Decades*, in Proc. Microfluidics and BioMEMS SPIE Conference, 2001, San Francisco.

- [19] Rosensweig RE, *Ferrohydrodynamics*, ed. Cambridge Univ. Press., 1985, New York.
- [20] Andersson H and Berg A, *Microfluidic Devices for Cellomics*, Lab-on-Chips for Cellomics, 2004, p. 1-22.
- [21] Graham E, *Lab-on-a-Chip Technology*, Forensic Science, Medicine, and Pathology, 1, 2005, 221-223.
- [22] Mouradian S, *Lab-on-a-Chip: Applications in Proteomics*, Current Opinion in Chemical Biology, 6, 2002, 51-56.
- [23] Bashir R, *Biomems: State-of-the-Art in Detection*, Opportunities and Prospects, Advanced Drug Delivery Reviews, 56, 2004, 1565-1586.
- [24] Weigl BH, Bardell RL, and Cabrera CR, *Lab-on-a-Chip for Drug Development*, Advanced Drug Delivery Reviews, 55, 2003, 349-377.
- [25] Verpoorte E, De Rooij NF, *Microfluidics Meets MEMS*, in Proceedings of the IEEE, 2003.
- [26] Madou M, *Fundamentals of Microfabrication: The Science of Miniaturization*, 2002, Boca Raton (FL), USA: CRC Press.
- [27] Paul O, Gaspar J, and Ruther P, *Advanced Silicon Microstructures, Sensors, and Systems*, IEEJ Transactions on Electrical and Electronic Engineering, 2, 2007, 199-215.
- [28] *Biomedical Applications for Mems and Microfabrication*, Available from: http://www.memsinvestorjournal.com/2006/08/biomems_has_bee.html#more
- [29] Bhushan B, *Nanotribology and Nanomechanics of MEMS/NEMS and Biomems/Bionems Materials and Devices*, Microelectronic Engineering, 84, 2007, 387-412.
- [30] Bhattacharya S, Jang J, Yang L, Akin D, and Bashir R, *Biomems and Nanotechnology-Based Approaches for Rapid Detection of Biological Entities*, Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 15, 2007, 1-32.
- [31] Bashir R, *Biomems to Bionanotechnology: Interfacing Life Sciences and Engineering at the Micro and Nanoscale*, Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 225, 2003, U989-U989.
- [32] Plaza JA, Álvarez M, Tamayo J, Dominguez C, Lechuga L, *100% Yield Cantilever Array Fabrication*, 1st Workshop on Nanomechanical Sensors. 2004: Madrid.
- [33] Álvarez M., Plaza JA, Zinoviev K, Nordström M, Boisen A, Dominguez C, Lechuga LM and Tamayo J, *Fabrication and Characterization of High Sensitive Microcantilevers for Biosensor Applications*, SPM2004 - TEDA Scanning Probe Microscopy, Sensors and Nanostructures. 2004. Beijing, China.
- [34] Lang HP, Hegner M, Meyer E, and Gerber C, *Nanomechanics from Atomic Resolution to Molecular Recognition Based on Atomic Force Microscopy Technology*, Nanotechnology, 13, 2002, R29-R36.
- [35] Fritz J, Baller MK, Lang HP, Rothuizen H, Vettiger P, Meyer E, Guntherodt HJ, Gerber C, and Gimzewski JK, *Translating Biomolecular Recognition into Nanomechanics*, Science, 288, 2000, 316-318.

- [36] Chen GY, Thundat T, Wachter EA, and Warmack RJ, *Adsorption-Induced Surface Stress and Its Effects on Resonance Frequency of Microcantilevers*, Journal of Applied Physics, 77, 1995, 3618-3622.
- [37] Whitesides GM, *The 'Right' Size in Nanobiotechnology*, Nature Biotechnology, 21, 2003, 1161-1165.
- [38] Weibel DB, Diluzio WR, and Whitesides GM, *Microfabrication Meets Microbiology*, Nature Reviews Microbiology, 5, 2007, 209-218.
- [39] Bao G and Suresh S, *Cell and Molecular Mechanics of Biological Materials*, Nature Materials, 2, 2003, 715-725.
- [40] Cross SE, Jin YS, Rao J, and Gimzewski JK, *Nanomechanical Analysis of Cells from Cancer Patients*, Nature Nanotechnology, 2, 2007, 780-783.
- [41] Burg TP, Godin M, Knudsen SM, Shen W, Carlson G, Foster JS, Babcock K, and Manalis SR, *Weighing of Biomolecules, Single Cells and Single Nanoparticles in Fluid*, Nature, 446, 2007, 1066-1069.
- [42] Lee H, Liu Y, Ham D, and Westervelt RM, *Integrated Cell Manipulation System-CMOS/Microfluidic Hybrid*, Lab on a Chip, 7, 2007, 331-337.
- [43] Gray DS, Tan JL, Voldman J, and Chen CS, *Dielectrophoretic Registration of Living Cells to a Microelectrode Array*, Biosensors and Bioelectronics, 19, 2004, 771-780.
- [44] Shekhawat G, Tark S-H, and Dravid VP, *MOSFET-Embedded Microcantilevers for Measuring Deflection in Biomolecular Sensors*, Science, 2006, 1122588.
- [45] Striemer Cc, Gaborski TR, Mcgrath JL, and Fauchet PM, *Charge- and Size-Based Separation of Macromolecules Using Ultrathin Silicon Membranes*, Nature, 445, 2007, 749-753.
- [46] Gustin GA, *Emerging Markets for Microfluidics Applications*, Yole Développement, 2007
- [47] Mounier JM, *Mems for Consumers, the Next Big Hit?*, Yole Développement, 2008
- [48] Mijatovic D, Eijkel JCT, and Van Den Berg A, *Technologies for Nanofluidic Systems: Top-Down Vs. Bottom-up - a Review*, Lab on a Chip, 5, 2005, 492-500.
- [49] Ibáñez-García N, *Sistemas De Análisis Miniaturizados Mediante La Tecnología LTCC*, PhD Thesis in Unidad de Química Analítica, Departamento de Química, Facultat de Ciències. 2007, Universitat Autònoma de Barcelona: Bellaterra.
- [50] Gongora-Rubio MR, Espinoza-Vallejos P, Sola-Laguna L, and Santiago-Aviles JJ, *Overview of Low Temperature Co-Fired Ceramics Tape Technology for Meso-System Technology (MSST)*, Sensors and Actuators A-Physical, 89, 2001, 222-241.
- [51] Ribeiro JC, Minas G, Turmezei P, Wolffenbuttel RF, and Correia JH, *A Su-8 Fluidic Microsystem for Biological Fluids Analysis*, Sensors and Actuators A: Physical, 123-124, 2005, 77-81.
- [52] Younan Xia G, *Soft Lithography*, Angewandte Chemie International Edition, 37, 1998, 550-575.

- [53] Love JC, Anderson JR, and Whitesides GM, *Fabrication of Three-Dimensional Microfluidic Systems by Soft Lithography*, MRS Bulletin, 26, 2001, 523-528.
- [54] Anderson RR, Chiu DT, Jackman RJ, Cherniavskaya O, McDonald JC, Wu HK, Whitesides SH, and Whitesides GM, *Fabrication of Topologically Complex Three-Dimensional Microfluidic Systems in PDMS by Rapid Prototyping*, Analytical Chemistry, 72, 2000, 3158-3164.
- [55] McDonald JC, Chabinyc ML, Metallo SJ, Anderson JR, Stroock AD, and Whitesides GM, *Prototyping of Microfluidic Devices in Poly(Dimethylsiloxane) Using Solid-Object Printing*, Analytical Chemistry, 74, 2002, 1537-1545.
- [56] Deng T, Wu HK, Brittain ST, and Whitesides GM, *Prototyping of Masks, Masters, and Stamps/Molds for Soft Lithography Using an Office Printer and Photographic Reduction*, Analytical Chemistry, 72, 2000, 3176-3180.
- [57] Xia YN and Whitesides GM, *Soft Lithography*, Annual Review of Materials Science, 28, 1998, 153-184.
- [58] Schwarz MA and Hauser PC, *Recent Developments in Detection Methods for Microfabricated Analytical Devices*, Lab on a Chip, 1, 2001, 1-6.
- [59] Plaza JA, *Microacelerómetros de Silicio*, PhD Thesis in Universitat Autònoma de Barcelona. 1997
- [60] Szekely L and Guttman A, *Simple Approaches to Close the Open Structure of Microfluidic Chips and Connecting Them to the Macro-World*, Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 841, 2006, 123-128.
- [61] Fredrickson CK and Fan ZH, *Macro-to-Micro Interfaces for Microfluidic Devices*, Lab on a Chip, 4, 2004, 526-533.
- [62] Snakenborg D, Perozziello G, Geschke O, and Kutter J, *A Fast and Reliable Way to Establish Fluidic Connections to Planar Microchips*, Journal of Micromechanics and Microengineering, 17, 2007, 98-103.
- [63] Gray BL, Jaeggi D, Mourlas NJ, Van Driehhuizen BP, Williams KR, Maluf Ni, and Kovacs GTA, *Novel Interconnection Technologies for Integrated Microfluidic Systems*, Sensors and Actuators A-Physical, 77, 1999, 57-65.
- [64] Pan T, Baldi A, and Ziaie B, *A Reworkable Adhesive-Free Interconnection Technology for Microfluidic Systems*, Journal of Microelectromechanical Systems, 15, 2006, 267-272.
- [65] Melngailis J, *Focused Ion-Beam Technology and Applications*, Journal of Vacuum Science & Technology B, 5, 1987, 469-495.
- [66] Glanville J, *Focused Ion-Beam Technology for Integrated-Circuit Modification*, Solid State Technology, 32, 1989, 270-272.
- [67] Reyntjens S and Puers R, *A Review of Focused Ion Beam Applications in Microsystem Technology*, Journal of micromechanics and microengineering, 11, 2001, 287-300.
- [68] Brugger J, Beljakovic G, Despont M, Derooij N, and Vettiger P, *Silicon Micro/Nanomechanical Device Fabrication Based on Focused Ion Beam Surface Modification and Koh Etching*, Microelectronic Engineering, 35, 1997, 401-404.

- [69] Daniel JH and Moore DF, *A Microaccelerometer Structure Fabricated in Silicon-on-Insulator Using a Focused Ion Beam Process*, Sensors and Actuators A: Physical 73, 1999, 201- 209.
- [70] Reyntjens S and Puers R, *Focused Ion Beam Induced Deposition: Fabrication of Three-Dimensional Microstructures and Young's Modulus of the Deposited Material*, Journal of Micromechanics and Microengineering, 10, 2000, 181-188.
- [71] Cadarso VJ, Fernandez-Sanchez C, Llobera A, Darder M, and Dominguez C, *Optical Biosensor Based on Hollow Integrated Waveguides*, Analytical Chemistry, 80, 2008, 3498-3501.
- [72] Ordeig O, Godino N, Del Campo J, Muñoz FX, Nikolajeff F, and Nyholm L, *On-Chip Electric Field Driven Electrochemical Detection Using a Poly(Dimethylsiloxane) Microchannel with Gold Microband Electrodes*, Anal. Chem., 80, 2008, 3622-3632.
- [73] Trimmer W, Ling P, Chee-Kok C, Orton P, Gaugler R, Hashmi S, Hashmi G, Brunett B, and Reed M, *Injection of DNA into Plant and Animal Tissues with Micromechanical Piercing Structures*, in Micro Electro Mechanical Systems, 1995, MEMS '95, Proceedings. IEEE. 1995.
- [74] Chun K, Hashiguchi G, Toshiyoshi H, Fujita H, Kikuchi Y, Ishikawa J, Murakami Y, and Tamiya E, *an Array of Hollow Microcapillaries for the Controlled Injection Ofgenetic Materials into Animal/Plant Cells*, in MEMS '99. Twelfth IEEE International Conference. 1999. Orlando, FL, USA.
- [75] Jingkuang C, Wise Kd, Hetke JF, and Bledsoe SC, *a Multichannel Neural Probe for Selective Chemical Delivery*, IEEE TRANSACTIONS ON BIOMEDICAL ENGINEERING, 44, 1997, 760 - 769.
- [76] Reed ML, *et al.*, *Micromechanical Devices for Intravascular Drug Delivery*, Journal of Pharmaceutical Sciences, 87, 1998, 1387-1394.
- [77] Liwei L and Pisano AP, *Silicon-Processed Microneedles*, Journal of Microelectromechanical Systems, 8, 1999, 78 - 84.
- [78] Lehnert T, Gijs M, Netzer R, and Bischoff U, *Realization of Hollow SiO₂ Micronozzles for Electrical Measurements on Living Cells*, Applied Physics Letters, 81, 2002, 5063-5065.
- [79] Xu JT, Lynch M, Huff JL, Mosher C, Vengasandra S, Ding GF, and Henderson E, *Microfabricated Quill-Type Surface Patterning Tools for the Creation of Biological Micro/Nano Arrays*, Biomedical Microdevices, 6, 2004, 117-123.
- [80] Gonzalo-Ruiz J, Alonso-Lomillo MA, and Munoz FJ, *Screen-Printed Biosensors for Glucose Determination in Grape Juice*, Biosensors & Bioelectronics, 22, 2007, 1517-1521.
- [81] Vo-Dinh T, Cullum B, and Griffin GD, *Optical Nanosensors for Single-Cell Analysis*, Radiation Research, 156, 2001, 437-438.
- [82] Szita N, *A Micromachined Pipetting Device with Integrated Sensors*, in Technical Sciences. 2000, Swiss Federal Institute of technology zurich: Zürich.
- [83] Eppendorf, Available from: <http://www.eppendorf.com/es/>.

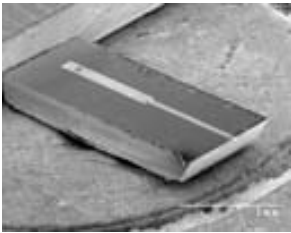
- [84] Hamilton Bonaduz Ag, Available from: <http://www.hamiltoncomp.com/newdev/pipettes/pipettesindex.asp>.
- [85] Smits J, *Piezoelectric Micropump for Peristaltic Fluid Displacements*, N L Patent No. 8,302,860 1985.
- [86] Smits J, *Piezoelectric Micropump with 3 Valves Working Peristaltically*, Sensors and Actuators A-Physical, 21, 1990, 203-206.
- [87] Htgvlv AL, *A Piezoelectric Micropump Based on Micromachining of Silicon*, Sensors and Actuators, 15, 1988, 153-157.
- [88] Bassous E, Taub H, and Kuhn L, *Ink Jet Printing Nozzle Arrays Etched in Silicon*, Applied Physics Letters, 31, 1977, 135-137.
- [89] Microdrop Technologies Gmbh, Available from: <http://www.microdrop.de/>.
- [90] Chun K, Hashiguchi G, Toshiyoshi H, and Fujita H, *Fabrication of Array of Hollow Microcapillaries Used for Injection of Genetic Materials into Animal/Plant Cells*, Japanese Journal of Applied Physics Part 2-Letters, 38, 1999, L279-L281.
- [91] Saya D, Leichle T, Pourciel J, Bergaud C, and Nicu L, *Collective Fabrication of an in-Plane Silicon Nanotip for Parallel Femtoliter Droplet Deposition*, Journal of micromechanics and microengineering, 17, 2007, N1-N5.
- [92] Izumi H and Aoyagi S, *Novel Fabrication Method for Long Silicon Microneedles with Three-Dimensional Sharp Tips and Complicated Shank Shapes by Isotropic Dry Etching*, IEEJ Transactions on Electrical and Electronic Engineering, 2, 2007, 328-334.
- [93] Rodriguez A, Molinero D, Valera E, Trifonov T, Marsal L, Pallares J, and Alcubilla R, *Fabrication of Silicon Oxide Microneedles from Macroporous Silicon*, Sensors and Actuators B-Chemical, 109, 2005, 135-140.
- [94] Guenat O, Generelli S, Dadras M, Berdondini L, De Rooij N, and Koudelka-Hep M, *Generic Technological Platform for Microfabricating Silicon Nitride Micro- and Nanopipette Arrays*, Journal of Micromechanics and Microengineering, 15, 2005, 2372-2378.
- [95] Moldovan N, Keun-Ho K, and Espinosa HD, *Design and Fabrication of a Novel Microfluidic Nanoprobe*, Microelectromechanical Systems, Journal of, 15, 2006, 204-213.
- [96] Zahn JD, Talbot NH, Liepmann D, and Pisano AP, *Microfabricated Polysilicon Microneedles for Minimally Invasive Biomedical Devices*, Biomedical Microdevices, 2, 2000, 295-303.
- [97] Stoeber B and Liepmann D, *Arrays of Hollow out-of-Plane Microneedles for Drug Delivery*, Journal of Microelectromechanical Systems, 14, 2005, 472-479.
- [98] Papautsky I, Brazzle J, Swerdlow H, Weiss R, and Frazier AB, *Micromachined Pipette Arrays*, IEEE Transactions On Biomedical Engineering, 47, 2000, 812-819.
- [99] Davis SP, Martanto W, Allen MG, and Prausnitz MR, *Hollow Metal Microneedles for Insulin Delivery to Diabetic Rats*, IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 52, 2005, 909-915.

- [100] Kim K and Lee J, *High Aspect Ratio Tapered Hollow Metallic Microneedle Arrays with Microfluidic Interconnector*, *Microsystem Technologies-Micro- and NanoSystems-Information Storage and Processing Systems*, 13, 2007, 231-235.
- [101] Han M, Hyun D, Park H, Lee S, Kim C, and Kim C, *A Novel Fabrication Process for out-of-Plane Microneedle Sheets of Biocompatible Polymer*, *Journal of micromechanics and microengineering*, 17, 2007, 1184-1191.
- [102] Chen JK, Wise KD, Hetke JF, and Bledsoe SC, *A Multichannel Neural Probe for Selective Chemical Delivery at the Cellular Level*, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 44, 1997, 760-769.
- [103] Takeuchi S, Ziegler D, Yoshida Y, Mabuchi K, and Suzuki T, *Parylene Flexible Neural Probes Integrated with Microfluidic Channels*, *Lab on a Chip*, 5, 2005, 519-523.
- [104] Johnson MD, Franklin RK, Scott KA, Brown RB, and Kipke DR, *Neural Probes for Concurrent Detection of Neurochemical and Electrophysiological Signals in Vivo*, in *Engineering in Medicine and Biology Society*, 2005. *IEEE-EMBS 2005. 27th Annual International Conference of the*. 2005.
- [105] Dunlap D, Cattelino A, Decurtis I, and Valtorta F, *Cytoplasmic Topography of Focal Contacts*, *Febs Letters*, 382, 1996, 65-72.
- [106] Pereira RD, *Atomic Force Microscopy as a Novel Pharmacological Tool*, *Biochemical Pharmacology*, 62, 2001, 975-983.
- [107] Allen S, Davies MC, Roberts CJ, Tendler SJB, and Williams PM, *Atomic Force Microscopy in Analytical Biotechnology*, *Trends in Biotechnology*, 15, 1997, 101-105.
- [108] Dufrene YF, *Atomic Force Microscopy, a Powerful Tool in Microbiology*, *Journal of Bacteriology*, 184, 2002, 5205-5213.
- [109] Dufrene YF, *AFM for Nanoscale Microbe Analysis*, *Analyst*, 133, 2008, 297-301.
- [110] Thalhammer S, Stark RW, Muller S, Wienberg J, and Heckl WM, *The Atomic Force Microscope as a New Microdissecting Tool for the Generation of Genetic Probes*, *Journal of Structural Biology*, 119, 1997, 232-237.
- [111] Czajkowsky DM, Iwamoto H, and Shao ZF, *Atomic Force Microscopy in Structural Biology: From the Subcellular to the Submolecular*, *Journal of Electron Microscopy*, 49, 2000, 395-406.
- [112] Craighead H, *Future Lab-on-a-Chip Technologies for Interrogating Individual Molecules*, *Nature*, 442, 2006, 387-393.
- [113] El-Ali J, Sorger Pk, and Jensen KF, *Cells on Chips*, *Nature*, 442, 2006, 403-411.
- [114] Grayson ACR, Shawgo RS, Johnson AM, Flynn NT, Li YW, Cima MJ, and Langer R, *A Biomems Review: Mems Technology for Physiologically Integrated Devices*, *Proceedings of the IEEE*, 92, 2004, 6-21.
- [115] Takeuchi S, Diluzio Wr, Weibel DB, and Whitesides GM, *Controlling the Shape of Filamentous Cells of Escherichia Coli*, *Nano Letters*, 5, 2005, 1819-1823.

- [116] Hochmuth Rm, *Micropipette Aspiration of Living Cells*, Journal of Biomechanics, 33, 2000, 15-22.
- [117] Feinerman O and Moses E, *A Picoliter 'Fountain-Pen' Using Co-Axial Dual Pipettes*, Journal of Neuroscience Methods, 127, 2003, 75-84.
- [118] Devroey P and Van Steirteghem A, *A Review of Ten Years Experience of ICSI*, Human Reproduction Update, 10, 2004, 19-28.
- [119] Michael GS, Erica MF, Barry LZ, and Haim HB, *Carbon Nanopipettes for Cell Probes and Intracellular Injection*, Nanotechnology, 2008, 015101.
- [120] Stoevesandt O, Elbs M, Kohler K, Lellouch AC, Fischer R, Andre T, and Brock R, *Peptide Microarrays for the Detection of Molecular Interactions in Cellular Signal Transduction*, Proteomics, 5, 2005, 2010-2017.
- [121] Angenendt P, Kreutzberger J, Glokler J, and Hoheisel JD, *Generation of High Density Protein Microarrays by Cell-Free in Situ Expression of Unpurified PCR Products*, Molecular & Cellular Proteomics, 5, 2006, 1658-1666.
- [122] Kumar A and Whitesides GM, *Features of Gold Having Micrometer to Centimeter Dimensions Can Be Formed through a Combination of Stamping with an Elastomeric Stamp and an Alkanethiol Ink Followed by Chemical Etching*, Applied Physics Letters, 63, 1993, 2002-2004.
- [123] Piner RD, Zhu J, Xu F, Hong SH, and Mirkin CA, *"Dip-Pen" Nanolithography*, Science, 283, 1999, 661-663.
- [124] Xu JT, Lynch M, Nettikadan S, Mosher C, Vegasandra S, and Henderson E, *Microfabricated "Biomolecular Ink Cartridges" - Surface Patterning Tools (SPTs) for the Printing of Multiplexed Biomolecular Arrays*, Sensors and Actuators B-Chemical, 113, 2006, 1034-1041.
- [125] Rowan B, Wheeler MA, and Crooks RM, *Patterning Bacteria within Hyperbranched Polymer Film Templates*, Langmuir, 18, 2002, 9914-9917.
- [126] Petersen CL, Grey F, Shiraki I, and Hasegawa S, *Microfour-Point Probe for Studying Electronic Transport through Surface States*, Applied Physics Letters, 77, 2000, 3782-3784.
- [127] Park IY, Li ZY, Li XM, Pisano AP, and Williams RS, *Towards the Silicon Nanowire-Based Sensor for Intracellular Biochemical Detection*, Biosensors & Bioelectronics, 22, 2007, 2065-2070.
- [128] Liu RH, Stremmer MA, Sharp KV, Olsen MG, Santiago JG, Adrian RJ, Aref H, and Beebe DJ, *Passive Mixing in a Three-Dimensional Serpentine Microchannel*, Microelectromechanical Systems, Journal of, 9, 2000, 190-197.
- [129] Nguyen N and Wu Z, *Micromixers - a Review*, Journal of micromechanics and microengineering, 15, 2005, R1-R16.
- [130] Hardt S, Drese KS, Hessel V, and Schönfeld F, *Passive Micromixers for Applications in the Microreactor And µtas Fields*, Microfluidics and Nanofluidics, 1, 2005, 108-118.
- [131] Bessoth FG, Demello AJ, and Manz A, *Microstructure for Efficient Continuous Flow Mixing*, Analytical Communications, 36, 1999, 213-215.

- [132] Stroock AD, Dertinger SKW, Ajdari A, Mezic I, Stone HA, and Whitesides GM, *Chaotic Mixer for Microchannels*, *Science*, 295, 2002, 647-651.
- [133] Bringer MR, Gerds CJ, Song H, Tice JD, and Ismagilov RF, *Microfluidic Systems for Chemical Kinetics That Rely on Chaotic Mixing in Droplets*, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series a-Mathematical Physical and Engineering Sciences*, 362, 2004, 1087-1104.
- [134] Hatch A, *A Rapid Diffusion Immunoassay in a T-Sensor*, *Nature Biotechnology*, 19, 2001, 461-465.
- [135] Watts P and Wiles C, *Recent Advances in Synthetic Micro Reaction Technology*, *Chemical Communication*, 2007, 443-467.
- [136] Yang X, Yang JM, Wang XQ, Meng E, Tai YC, and Ho CM, *Micromachined Membrane Particle Filters*, in *Micro Electro Mechanical Systems*, 1998. MEMS 98. Proceedings., The Eleventh Annual International Workshop on. 1998.
- [137] Dicarlo D, Aghdam N, and Lee LP, *Single-Cell Enzyme Concentrations, Kinetics, and Inhibition Analysis Using High-Density Hydrodynamic Cell Isolation Arrays*, *Analytical Chemistry*, 78, 2006, 4925-4930.
- [138] Ji H, Samper V, Chen Y, Heng C, Lim T, and Yobas L, *Silicon-Based Microfilters for Whole Blood Cell Separation*, *Biomedical Microdevices*, 10, 2008, 251-257.
- [139] Han K-H and Frazier AB, *Lateral-Driven Continuous Dielectrophoretic Microseparators for Blood Cells Suspended in a Highly Conductive Medium*, *Lab on a Chip*, 8, 2008, 1079-1086.

3 Micro/nanopipetas: Primera generación



En este capítulo se discutirá la primera tecnología desarrollada para la fabricación de las micro/nanopipetas, así como su utilización como herramientas para funcionalizar superficies acoplando el dispositivo fabricado a un cabezal de AFM.

3.1 Introducción

La aplicación de la tecnología de fabricación en MEMS en la microfluídica hace aparecer nuevas posibilidades y funcionalidades que hasta el momento no se habían producido. La aplicación de la microfluídica en los análisis químicos y biomédicos, hace posible la disminución de las cantidades de reactivos, del tiempo de análisis y por lo tanto, de los costes. El desarrollo de tecnología para la fabricación de micro/nanopipetas se ha basado en las necesidades que han ido saliendo de la tendencia en disminuir las dimensiones de los dispositivos de análisis. Aunque en el mercado existen micropipetas que pueden dispensar hasta 0.1 μl , no es posible encontrar de comerciales [1, 2] que puedan aspirar y dispensar por debajo de este rango porque es difícil acoplar sistemas que bombeen el líquido sin perder la ventaja de sus dimensiones reducidas

Por otro lado, la funcionalización de superficies tiene múltiples aplicaciones como por ejemplo en detección bioquímica y en la electrónica biomolecular. Concretamente, se podrían realizar funcionalizaciones de superficies de oro creando monocapas autoensambladas con moléculas de tioles. Estas monocapas son altamente eficaces inmovilizando biomoléculas como proteínas, anticuerpos o ADN. Estudios fundamentales en biología requieren *arrays* de biomoléculas con pequeñas cantidades de volumen. Estos arrays generan inmovilizaciones específicas en una zona determinada con una elevada precisión. Para conseguirlo se han desarrollado técnicas directas de funcionalización como un inyector Nanoplotter™ [3, 4] o de impresión por microcontacto[5].

Otras técnicas basadas en el uso de un AFM como el Dip-Pen™ [6] pueden funcionalizar una superficie utilizando puntas estándar de AFM. Las ventajas que ofrecen las técnicas basadas en el uso de un microscopio AFM son la elevada precisión en el control de la posición, los tiempos de contacto y las condiciones ambientales para el experimento. Por el contrario, una limitación de estas técnicas sería la imposibilidad de disponer de un flujo continuo de tinta hacia la punta, limitación que podría solucionarse con el uso de micro/nanopipetas o microdispensadores.

Para poder desarrollar esta tecnología se enumeraron, primero de todo, los elementos necesarios para definir el dispositivo a fabricar, en nuestro caso las micro/nanopipetas. A continuación se diseñó el proceso tecnológico, es decir, se

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

consideraron los procesos necesarios para obtener el dispositivo formado por los elementos definidos. Una vez realizados estos pasos, comenzó el proceso de fabricación, vigilando con atención determinadas etapas del proceso, como por ejemplo el serrado o las conexiones de los dispositivos. Una vez fabricados, se realizó una caracterización previa para comprobar que los canales habían quedado abiertos y no se habían colapsado ni se habían fracturado. Una vez demostrado que los canales habían quedado definidos y que no estaban obturados, se realizaron las primeras pruebas para funcionalizar una superficie de oro de manera controlada y localizada.

3.2 Diseño de las micro/nanopipetas

El primer paso consistió en numerar todas las partes que componían las micro/nanopipetas. Conociendo los elementos que definían el dispositivo, se podían diseñar y enumerar las máscaras necesarias para el proceso de fabricación. Estas máscaras fijarían la geometría y las medidas de los dispositivos. En la Figura 3.1 se muestra un esquema de una micro/nanopipeta con los elementos que la componen señalados. Se puede observar en la figura un soporte, encima del cual se puede fabricar un canal estrecho por donde circulará el líquido. Este canal debe tener una cavidad de entrada por donde se introducirán líquidos y una punta muy fina como orificio de salida para poder aspirar, dispensar o depositar pequeñas cantidades de líquidos.

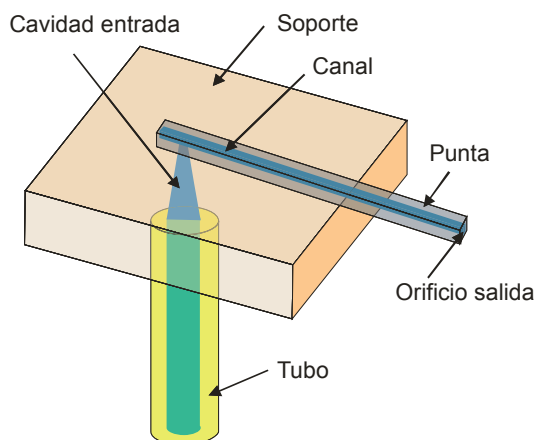


Figura 3.1 : Esquema de los componentes de una micro/nanopipeta de la primera generación.

Las máscaras utilizadas en el proceso de fabricación de las micro/nanopipetas de la 1ª generación habían sido diseñadas durante la realización de un proyecto anterior (MICROMAG). Durante este proyecto se había utilizado ferrofluido para conseguir el movimiento de tintas dentro de canales fabricados en silicio. Estos canales estaban abiertos por la parte superior y para cubrirlos se habían utilizado portaobjetos de vidrio. La diferencia de hidrofobicidad entre el vidrio y el silicio había mostrado la necesidad de obtener un canal cuyas cuatro paredes estuvieran fabricadas del mismo material. Con el diseño de estas nuevas máscaras se buscaba reducir las dimensiones de los canales utilizados en las pruebas realizadas durante el MICROMAG y comprobar si el ferrofluido podía mover las tintas en el interior de las micronanopipetas.

3.3 Proceso tecnológico y fabricación de las micro/nanopipetas

Una vez definidos los componentes del dispositivo a fabricar, en nuestro caso las micro/nanopipetas, había que elaborar un proceso tecnológico con los procesos o etapas de fabricación necesarios para poder integrar los elementos que componían el dispositivo. Una vez definidas las etapas, se conocieron el número de máscaras necesarias para la fabricación y se procedió a su diseño. Estas máscaras contienen la información necesaria sobre las medidas y las formas de las micro/nanopipetas.

El proceso de fabricación empezó dentro de la Sala Blanca, pero no acabó cuando los dispositivos salieron de ésta, si no que continuó con el serrado de las obleas para la obtención de los chips individuales. El siguiente paso consistió en abrir unas ventanas en la cavidad de entrada y el orificio de salida en la punta (Figura 3.1). Estas aperturas permitieron llegar a la capa sacrificial que definía el canal a obtener. Para abrirlo se procedió al grabado de la misma. Finalmente se realizaron las conexiones necesarias para poder caracterizar los dispositivos fabricados.

3.3.1 Descripción del proceso tecnológico

Una vez definidos los elementos que componían las micro/nanopipetas, se fijó como objetivo obtener un canal estrecho y recubierto de un único material por lo que se debía pensar en la tecnología a utilizar. Aprovechando la existencia de una Sala Blanca en el IMB-CNM, CSIC y las ventajas que ofrecen las tecnologías basadas en silicio, se escogió una oblea de silicio como elemento soporte de la micro/nanopipeta. Sobre esta oblea habría que depositar por la cara componentes una capa que definiría, tras ser estructurada, la geometría y las dimensiones del canal. Como sería una capa sacrificial se pensó en el material que más se utiliza para este fin en microelectrónica y éste es el óxido de silicio.

A continuación se abrirían dos cavidades por la cara dorso de la oblea hasta llegar a la capa sacrificial, una de estas cavidades definiría el orificio de entrada al canal y la otra haría que la punta del dispositivo quedara liberada, en forma de voladizo, del soporte de silicio. El siguiente paso consistiría en depositar el material que haría la función de capa estructural, es decir, que lo recubriría todo y que junto con el sustrato de silicio formaría las paredes del canal de la micro/nanopipeta. Se pensó en utilizar polisilicio como capa estructural.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

La combinación de óxido de silicio y polisilicio como capa sacrificial y estructural respectivamente es común en la tecnología de microsistemas. En este punto acabaría el proceso dentro de Sala Blanca pero faltaría obtener los chips individuales con los dispositivos definidos en la oblea. Para realizarlo se optó por la técnica habitual utilizada en microelectrónica y que consiste en el serrado de las obleas. Una vez separados los chips, habría que abrir unas ventanas en la capa estructural, que recordemos lo recubriría todo, para llegar hasta la capa sacrificial. Cuando ésta última estuviera accesible, tendría que ser atacada para vaciar el canal y obtener de esta manera un microcanal hueco. Finalmente se realizarían las conexiones oportunas entre los dispositivos fabricados y los equipos de medida. En la Figura 3.2 se muestra un esquema del proceso de fabricación con los procesos a seguir, la oblea de silicio inicial (a), la deposición de la capa sacrificial (b), la estructuración de la misma (c), la abertura de las cavidades (d), el recubrimiento de todo con la capa estructural (e), la obtura de las ventanas en esta capa (f), el grabado de la capa sacrificial (g) y las conexiones (h).

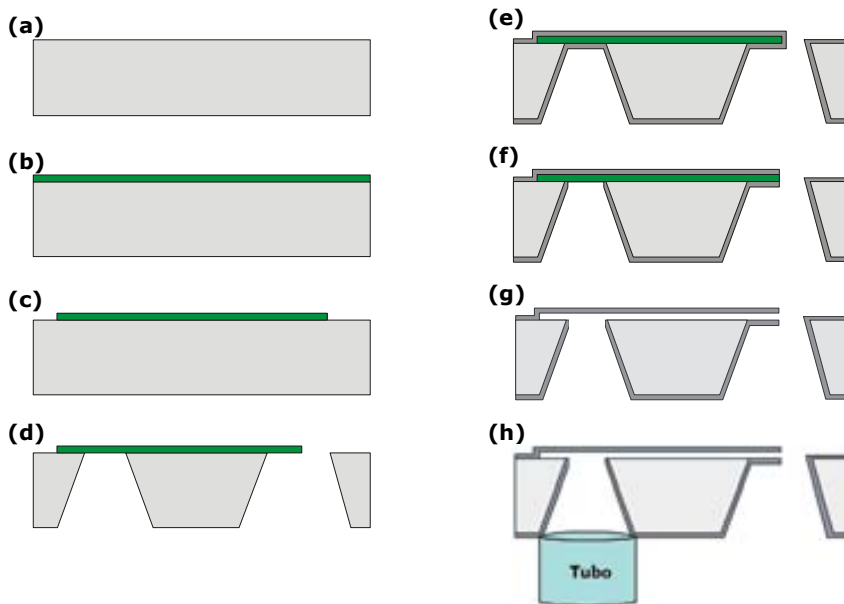


Figura 3.2: Proceso de fabricación micro/nanopipetas primera generación, (a) oblea de silicio, (b) deposición capa sacrificial, (c) estructuración de esta capa, (d) abertura de cavidades, (e) recubrimiento con capa estructural, (f) abertura de orificios en esta capa, (g) grabado de la capa sacrificial y (h) las conexiones.

3.3.2 Diseño de las máscaras

A continuación se describirán brevemente las máscaras utilizadas durante el proceso de fabricación de las micro/nanopipetas. Esta descripción nos dará una idea de las geometrías dibujadas en las máscaras. En la Tabla 3.I se describe el juego de máscaras CNM178 utilizado para la fabricación de las micro/nanopipetas de la primera generación y la finalidad que tiene cada máscara en dicho proceso.

En el IMB-CNM se utiliza una nomenclatura para identificar cada una de las máscaras. Este nombre empieza con la identificación del juego de máscaras al que pertenecen, en este caso CNM178, seguido de unas letras o palabras que identifican una máscara dentro del juego. En nuestro caso particular el juego de máscaras que corresponde a la nomenclatura CNM178 está formado por dos máscaras. En la Tabla 3.I se indica en que orden se utilizaron estas dos máscaras (nivel), así como el nombre que tenían dentro del juego CNM178 (Nombre), en que etapa específica del proceso de fabricación se utilizaron (Descripción) y el campo que tienen (Campo).

Tabla 3.I: Máscaras del juego CNM178 para la fabricación de les micro/nanopipetas.

Nivel	Nombre	Descripción	Campo
1	OXIDE	Definición geometría pipeta	Claro
2	MEMBS	Definición cavidades	Oscuro

De este modo el nombre para la primera máscara será CNM178-OXIDE y sería utilizada en primer lugar porque transfiere la geometría que queremos dar al microcanal, es decir, transfiere esta geometría a la capa sacrificial que define el canal de la micro/nanopipeta. La máscara CNM178-MEMBS se utilizará en segundo lugar porque dará las medidas de las cavidades que se quieren abrir en la oblea de silicio por la cara dorso para llegar a la capa sacrificial por este lado. Recordemos que una de estas cavidades definirá la zona del depósito mientras que la segunda será la punta de la micro/nanopipeta.

La Figura 3.3 muestra una sección transversal de uno de los chips de la máscara CNM178-OXIDE diseñada donde se han señalado los elementos definidos inicialmente. Se puede distinguir como se han implementado la cavidad de entrada, el canal formado por el depósito y el brazo y la punta en voladizo.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

Los diseños de las micro/nanopipetas diferían en la restricción que une el depósito al brazo, en la forma que tenían las puntas y/o en el número de puntas finales.

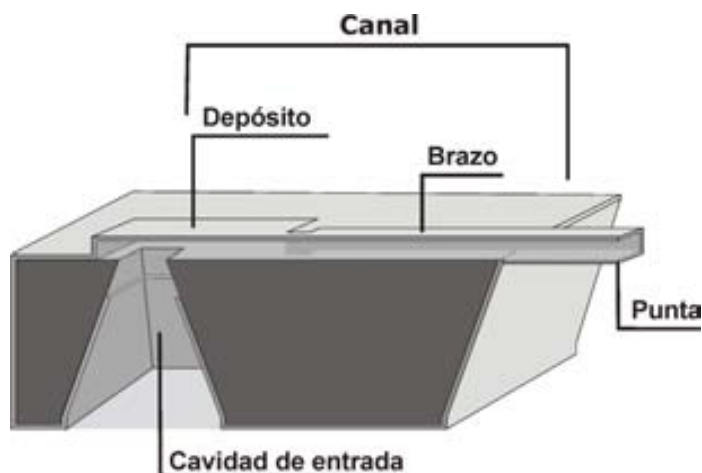


Figura 3.3: Dibujo esquemático de la sección de un chip de la máscara CNM178-OXIDE con los componentes que definen el cuerpo de la micro/nanopipeta de la primera generación.

Las dimensiones de los diferentes elementos que definían la micro/nanopipeta se muestran en la Tabla 3.II. La altura viene dada por la capa sacrificial de óxido y es 1.5 μm . Como se han diseñado diferentes puntas, en la tabla se muestra el rango de dimensiones donde se encuentran todas.

Tabla 3.II: Dimensiones de las micro/nanopipetas de la primera generación.

		Anchura (μm)	Largo (μm)
Canal	Depósito	120	1200
	Brazo	50	1140
Punta		2-50	50-75

A modo de ejemplo la Figura 3.4 muestra los dibujos de uno de los chips de las micro/nanopipetas incluidos en el juego de máscaras utilizado en el proceso de fabricación de los dispositivos.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

La columna de la izquierda muestra la máscara CNM178-OXIDE para un chip y la de la derecha representa la máscara CNM178-MEMBS para el mismo chip. En el dibujo de la máscara OXIDE se diferencian las partes que componen la micro/nanopipeta: el depósito, la restricción, el brazo y la punta.

En la máscara MEMBS se han señalado las dos cavidades que quedarán definidas en cada chip por la cara dorso de la oblea, una definirá la cavidad de entrada mientras que la segunda servirá para liberar la punta. Estos chips tienen unas dimensiones de $925 \times 3290 \mu\text{m}^2$.

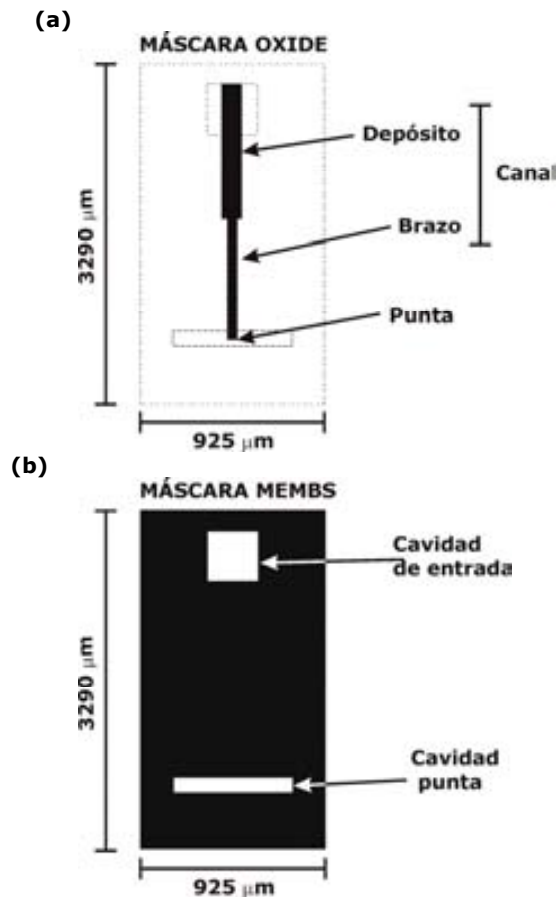


Figura 3.4: Motivos de las diferentes máscaras de cuarzo del juego CNM178 para el diseño de un chip (a) máscara oxide y (b) máscara MEMBS. Como dibujado en negro

Los motivos de alineamiento doble cara que se utilizaron para alinear las máscaras fueron los alineamientos doble cara estándares utilizados en el CNM. Se dibujaron dos chips de alineamiento doble cara en cada una de las máscaras.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

Estos estaban equidistantes respecto al centro de la oblea y estaban centrados verticalmente. En la Figura 3.5 se muestra la distribución de estos motivos de alineamiento doble cara en la oblea y la secuencia de alineamiento utilizada. La máscara MEMBS se alinea con los motivos de alineamiento de la máscara OXIDE. La distribución cuadrículada del motivo CNM178-MEMBS es para evitar la rotura de la oblea en la etapa del grabado anisotrópico en TMAH para abrir las cavidades de la oblea.

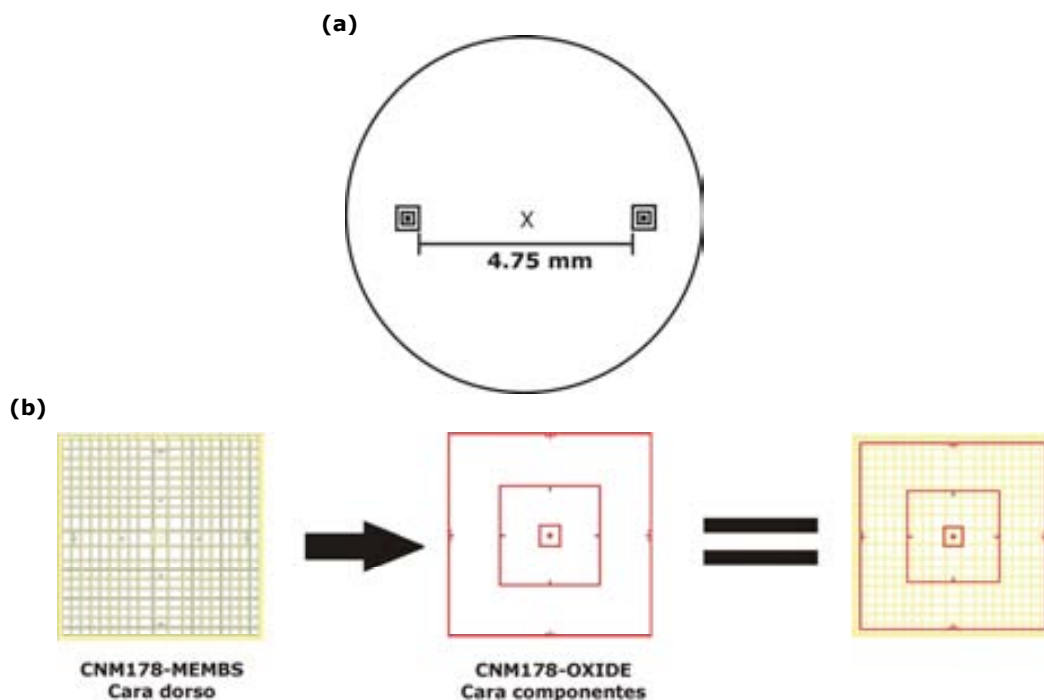








Figura 3.5: (a) Distribución de los motivos de alineamiento doble cara en una oblea, (b) dibujo y secuencia de alineamiento entre los motivos de alineamiento doble cara de las dos máscaras del juego CNM178.

Se diseñaron diferentes modelos de micro/nanopipetas. Se les designó un nombre en función de la forma diseñada que tenía cada una. En la tabla Tabla 3.III se explica el significado que cada letra tiene dentro del nombre que nos indica la forma y el ancho de la punta en voladizo que tiene la micro/nanopipeta. La primera columna con la letra p hace referencia a la punta, la segunda indica el significado de la letra que sigue a la p y que marca la diferencia en la forma que tiene la punta y la tercera muestra un dibujo de su geometría, de la forma en cómo acaba la punta. El nombre se completaba con un número que hace referencia a la anchura de la punta.

Tabla 3.III: Código de letras utilizado para nombrar los diferentes diseños de las micro/nanopipetas.

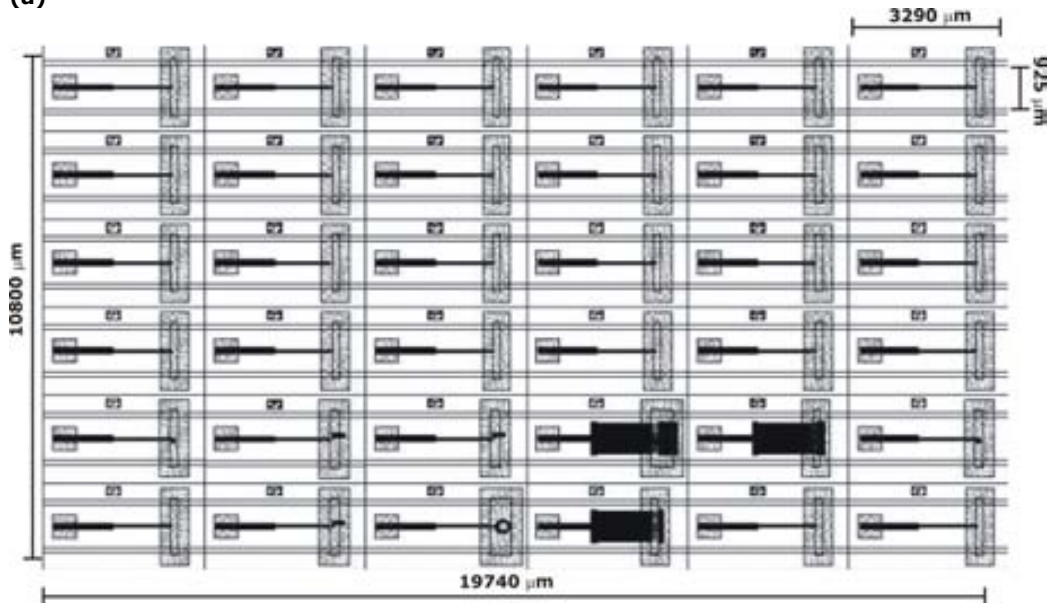
p = punta forma de	r = recta	
	t = triangulo	
	m = múltiple	
	e = espiral	
	1,2,3...diseñadas para la ruptura controlada	
	normal	

Para poder llenar toda la oblea con los chips diseñados, se creó un bloque o unidad donde se incluyeron todos los chips y se repitió por toda la oblea hasta completarla. Para formar esta unidad se dispusieron los chips en 6 filas por 6 columnas, las medidas finales de este bloque fueron 10800 x 19740 μm^2 . En la Figura 3.6a se muestra el dibujo del bloque final con los dispositivos que se utilizaron para rellenar la oblea. En esta figura también se han señalado las dimensiones finales que tendrá un chip individual después de serrar la oblea. Este bloque se repitió hasta completar una oblea. Para poder encajar este diseño dentro de las dimensiones de la oblea, esta unidad fue dividida en los límites exteriores de la oblea. En el Apéndice A se muestra como quedó la distribución de este bloque hasta completar la oblea.

La Figura 3.6b muestra la misma distribución en bloque pero con los nombres asignados a cada uno de los chips siguiendo la nomenclatura mostrada en la Tabla 3.III. Las que sólo tienen la palabra normal son las que tienen el diseño más simple, no tienen una punta estrecha, el voladizo es la prolongación del brazo del microcanal y las denominadas test eran estructuras de test.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

(a)



(b)


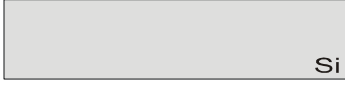
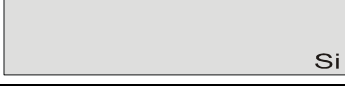
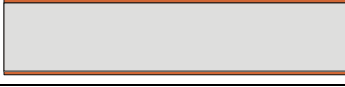
pmw01	prw01	ptw01	pmw01	prw01	ptw01
pmw02	prw02	ptw02	pmw02	prw02	ptw02
pmw05	prw05	ptw05	pmw05	prw03	ptw05
pmw10	prw10	ptw10	pmw10	prw10	ptw10
pew05	p1w10	p3w10	p5w10	p7w10	pew05
normal	p2w10	p4w10	p6w10	test	normal

Figura 3.6: Disposición de los chips en el bloque unidad que se ha utilizado para rellenar toda la oblea de micro/nanopipetas y (b) distribución de los nombres de los chips en el mismo bloque.

3.3.3 Proceso de fabricación

Una vez explicado el proceso tecnológico definido para la fabricación de las micro/nanopipetas de la 1ª generación, se continuará en este apartado con la explicación en detalle de los pasos seguidos durante la fabricación de los chips dentro de Sala Blanca del IMB-CNM, la obtención de los chips individuales, la apertura de la cavidad de entrada y la punta para tener acceso a la capa sacrificial y poder definir el microcanal. Se dará detalle de los problemas que fueron surgiendo así como las soluciones encontradas. Para poder tener una imagen de cada paso seguido, a lo largo de este apartado se podrán ver unas tablas donde se mostrarán unos dibujos con la sección transversal de una micro/nanopipeta. La primera columna de las citadas tablas indicará el número de la etapa y tratará de dar una breve explicación de la etapa seguida del código con el que es nombrada en BACO*, la segunda corresponderá al dibujo de la sección transversal y la tercera indicará el número de la oblea utilizada.

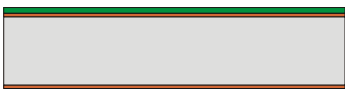
3.3.3.1 Proceso de fabricación en Sala Blanca

Run 2219		
1. INICIO		1 - 4
2. Marcar las obleas (300µm) (MARC-PXA)		1 - 4
3. Limpieza piraña + dip HF (NETG-GEN)		1 - 4
4. Oxidación térmica de 300 Å a 1000°C (OSC-0300)		1 - 4

* **BACO** programa informático utilizado por los investigadores del CNM-IMB para definir las etapas necesarias en un run para fabricar dispositivos. Forma parte de las herramientas de comunicación existentes entre los investigadores y el personal que trabaja dentro de Sala Blanca. El personal ingeniero y operario de Sala son los que realizan estas etapas.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

El proceso de fabricación de las micro/nanopipetas se inició utilizando 4 obleas de silicio de 300 μm pulidas por las dos caras. Se escogieron de este tipo porque habría que mecanizarlas por las dos caras y se necesitan superficies pulidas para poder realizar los procesos fotolitográficos. Después de marcar las obleas (**MARCPXA**) para poder tenerlas identificadas durante todo el proceso y de limpiarlas (**NETG-GEN**), se crecieron 300 \AA de óxido de silicio térmico a 1000 $^{\circ}\text{C}$ (OSC-0300). Este óxido de silicio se utiliza para aumentar la adhesión de la capa de nitruro de silicio que se depositará en una etapa posterior.

Deposición capa sacrificial		
5. Deposición cara componentes capa PSG (Phospho-Silicate Glass) (DPYR-XXX): óxido de silicio dopado PSG (1.5 μm)		1 - 4

A continuación se depositó por la cara componentes una capa de óxido de silicio dopado PSG (*Phospho-Silicate Glass*) con un grosor aproximado de 1.5 μm (**DPYR-XXX**). El grosor de la capa de óxido de silicio viene dado por la oblea de test y su medida dio 1.542 \pm 0.081 μm . El espesor de esta capa fija la altura del canal. Esta era una de las etapas importantes del proceso porque con la estructuración de esta capa se obtendría el cuerpo de la micro/nanopipeta. Una vez se grabara la capa de óxido estructurada recubierta por la capa estructural, quedaría definido el canal de la micro/nanopipeta, por lo tanto fijaría las dimensiones interiores del canal y su geometría final.

Para escoger el tipo de óxido de silicio a utilizar, se tubo en cuenta los valores de velocidad de ataque de los diferentes óxidos de silicio en diferentes reactivos, la tabla con estos valores se puede consultar en el apartado 3.3.3.5 *Grabado de la capa sacrificial de óxido de silicio para la obtención del microcanal*. Como es una capa sacrificial, entre los óxidos de silicio disponibles en el CNM-IMB, se seleccionó el que tenía una velocidad de ataque más elevada. El óxido que cumplía con esta condición y que por lo tanto se escogió, fue el óxido de silicio dopado PSG al 7.5%. Otra ventaja de los óxidos depositados frente a los óxido de silicio crecidos térmicamente es que tienen un nivel de esfuerzos mecánicos residuales (residual stress) más bajo.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

Cuando la capa de óxido de silicio está sometida a esfuerzos mecánicos, empiezan a aparecer fisuras en la superficie de este punto y probablemente se acabe produciendo su rotura, por este motivo es importante que el nivel de esfuerzos mecánicos residuales sea bajo. Por otro lado también hay que tener en cuenta que los gradientes de esfuerzos mecánicos pueden producir el doblamiento cuando esta capa se encuentra en voladizo.

Estructuración de la capa sacrificial		
6. Fitolitografía Standard Obleas 2 Caras (FOTO-FCD) por cara componentes Máscara: CNM178-OXIDE	Máscara - OXIDE 	1 - 4
		
7. Etapa no Standard por SB (ESPECIAL) Recocido de la resina a 200°C durante 30min		1 - 4
8. Grabado de las capas de óxido de silicio (PGIOXGUI)		1 - 4

Para definir la forma de las micro/nanopipetas, se realizó una fotolitografía **(FOTO-FCD)** por la cara componentes de las obleas. El grosor de la resina depositada en esta etapa fue de 2 μm y era necesario para cubrir el grosor de las capas de óxido de silicio (1.5 μm PSG + 0.03 μm térmico). Se debe recocer esta resina a 200°C durante 30 min **(ESPECIAL)** para endurecerla y que aguante bien el grabado seco de la capa de óxido de silicio de la siguiente etapa. El traspaso del dibujo de la resina a la capa de óxido de silicio se realizó con un grabado seco (RIE, *Reactive Ion Etching*) del óxido de silicio. El proceso de grabado **(PGIOXGUI)** se hizo con un caudal de CHF_3 de 50 cm^3/min , una presión de 0.05 mbar y una potencia de 500 W. Estas condiciones fueron optimizadas por el Grupo de Transductores Químicos del CNM para fabricar guías de onda, de este modo podían grabar una capa de óxido de silicio más gruesa que la atacada en el proceso estándar. Con estas condiciones se ha conseguido atacar capas con un grosor de 8 μm . También permite

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

obtener unas paredes más verticales, controlando más las dimensiones. Durante el proceso de grabado de la oblea 1, después de 5 min de ataque, se observó que la resina se ondulaba (Figura 3.7), pero a pesar de tener este aspecto, la resina aguantó todo el ataque de la capa de óxido de silicio. El único problema que se observó fue que el cuerpo de las micro/nanopipetas perdía dimensiones. Se decidió probar con la oblea 2, también se atacó durante 5 min y se observó que la resina tenía el mismo aspecto que la oblea 1. Finalmente se supo que había un problema con una lámpara del equipo de fotolitografía que no irradiaba bien y por este motivo la resina quedaba dañada.

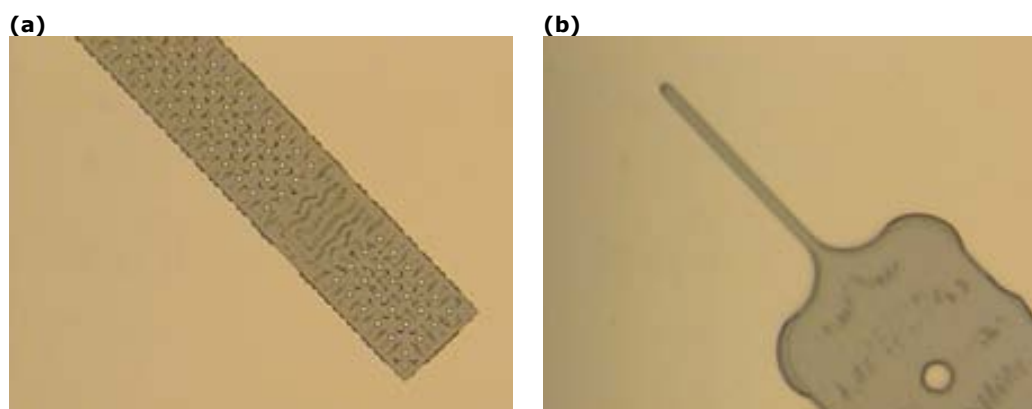


Figura 3.7: Aspecto de la resina ondulada de la oblea 1, imagen de la zona del (a) depósito y (b) de una punta debido a la mala irradiación de la lámpara.

Como no se sabía si lo que había pasado con la resina en la oblea 1 y 2 podía influir en etapas posteriores, se decidió introducir dos obleas nuevas en el proceso para que sustituyeran las primeras. Estas obleas se procesaron hasta llegar al grabado del óxido de silicio. En la etapa de deposición del óxido de silicio dopado PSG, el grosor de la capa de óxido de la oblea test fue de $1.472 \pm 0.074 \mu\text{m}$ para estas dos nuevas obleas. Se realizó un nuevo proceso fotolitográfico para las obleas 1-4 con el equipo de fotolitografía reparado. El aspecto final de la resina fue normal, no se observaron grietas, ni ondulaciones ni pérdida de dimensiones, como se puede observar en la Figura 3.8 donde se muestra un detalle de la zona del depósito (a) y de una punta (b) con la resina después del grabado del óxido de silicio.

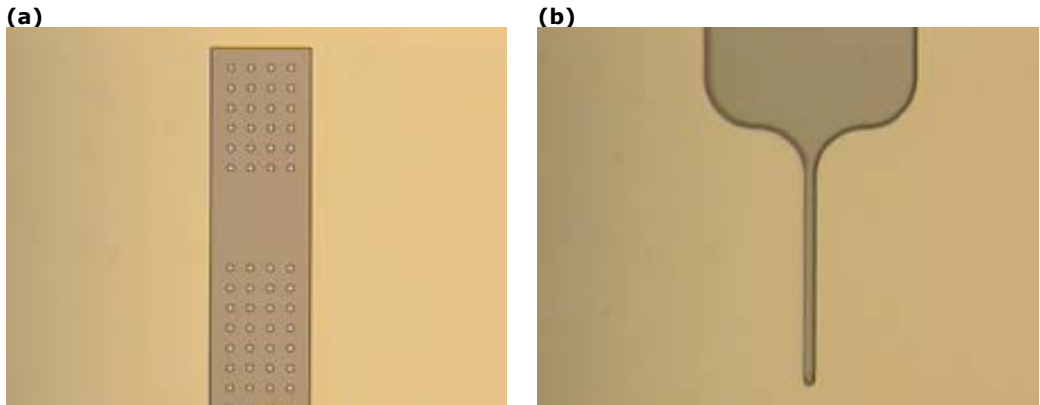

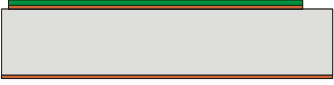



Figura 3.8: Aspecto de la resina después del grabado de la capa de óxido, imagen de la zona (a) del depósito y (b) de una punta.

Deposición de la capa de nitruro		
9. Decapado de resina (DEC-RESI)		1 - 4
10. Limpieza general simple (NETG-SIM)		1 - 4
11. Deposición LPCVD Si ₃ N ₄ (DNITAAA): 1800Å Si ₃ N ₄		1 - 4

Una vez definido el cuerpo de la micro/nanopipeta se decapó la resina (**DEC-RESI**) utilizando el plasma de O₂ y se realizó otra limpieza de oblea, pero en este caso se trató de una limpieza tipo simple (**NETG-SIM**), sólo se realizó la limpieza en piraña. Se evitó realizar una limpieza general porque está puede atacar ligeramente el óxido. El paso de dip en HF se obvió porque había óxido de silicio a la vista que no se quería atacar. Después se depositó una capa de nitruro de silicio (Si₃N₄) LPCVD (Low Pressure Chemical Vapor Deposition) (**DNITAAA**) por las dos caras de la oblea. Esta capa sirvió para proteger la capa de óxido por la cara componentes e hizo la función de máscara en el posterior ataque anisotrópico por la cara dorso para la obtención de las cavidades. En la Figura 3.9 se pueden observar tres imágenes de la capa de nitruro de silicio por la cara componentes de la oblea.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

La imagen de la izquierda muestra una visión general de dos micro/nanopipetas, las otras dos imágenes que se encuentran en la derecha corresponden a un detalle de dos puntas con diferente geometría.

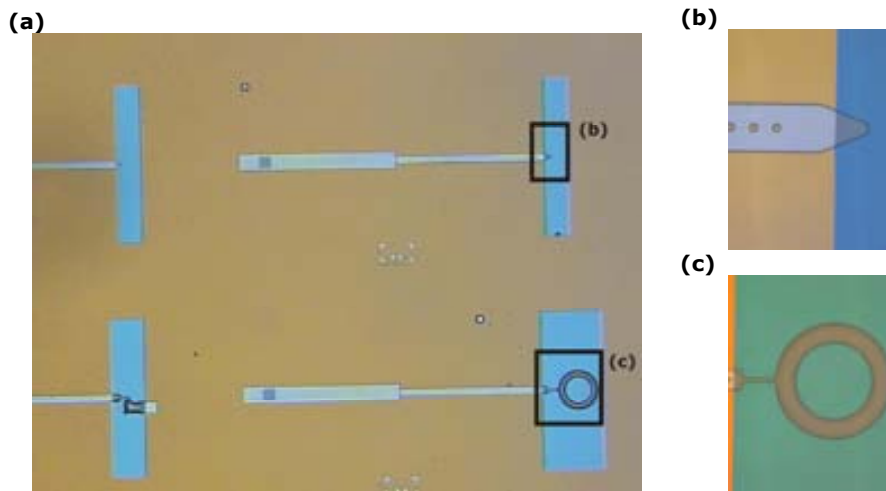




Figura 3.9: Imágenes ópticas de (a) la cara componentes de la oblea con una capa de Si_3N_4 depositado sobre la capa de SiO_2 estructurada dos puntas, (b) en forma de triángulo y (c) forma de anillo.

Definición de las cavidades		
<p>12. Etapa Fotolitografía con alineamiento doble cara (FOTO-FKD): cara dorso Mascara: CNM178- MEMBS</p>	<p>Máscara - MEMBS</p>	1 - 4
<p>13. Grabado seco del Si_3N_4 (NIT-QUAD): cara dorso</p>		1 - 4
<p>14. Grabado del óxido de silicio térmico (OXI-QUAD): cara dorso</p>		1 - 4
<p>15. Decapado de la resina (DEC-RESI)</p>		1 - 4

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

Las cavidades en la cara dorso fueron definidas con una etapa fotolitográfica de doble cara (**FOTO-FKD**). Esta fotolitografía se denomina de doble cara porque estas cavidades debían estar alineadas con el cuerpo de las micro/nanopipetas estructurado por la cara componentes. La capa de nitruro y de óxido de silicio de la cara dorso se grabaron en un equipo de ataques secos RIE (**NIT-QUAD, OXI-QUAD**). Se utilizó como máscara la capa de resina depositada en la etapa anterior. De este modo se obtuvieron las aberturas para empezar el grabado anisótropo del silicio en húmedo. Antes de realizarlo, se decapó la resina (**DEC-RESI**).

Grabado de las cavidades		
16a. FEIN-ESP (1): ataque anisotrópico TMAH		1 - 4
16b. FEIN-ESP (2): decapado del Si ₃ N ₄ en húmedo		

A partir de esta etapa, las obleas continuaron el proceso de fabricación fuera de SB, concretamente en el Laboratorio de Microsistemas donde se realizan procesos específicos para la fabricación de microsistemas que no se pueden realizar dentro de SB. El ataque anisotrópico del silicio por la cara dorso (**FEIN-ESP (1)**) se realizó con hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) 25% a una temperatura de 80°C. Se escogió este reactivo por su selectividad, ataca el silicio pero no al óxido ni al nitruro de silicio. El ataque acabaría cuando el reactivo llegara a la capa de óxido de silicio y la de nitruro de silicio depositadas sobre la cara componentes. El tiempo de ataque osciló entre 17-18 horas, dependiendo de la oblea atacada.

Con el grabado anisotrópico en TMAH se consiguieron abrir las cavidades. Parte de estas cavidades harían la función de entrada al canal y el resto liberaría el óxido de silicio que definirá la punta de la micro/nanopipeta. Una vez abiertas las cavidades, se decapó el nitruro de silicio. Esta etapa se puede realizar en húmedo con ácido ortofosfórico al 85% durante 1h a 165°C (**FEIN-ESP (2)**), o en seco. Se optó por un ataque húmedo porque había que quitar la capa de nitruro de silicio de las dos caras de la oblea, además, como ya se ha comentado anteriormente, el ácido ortofosfórico no ataca ni la capa de óxido de silicio ni el silicio de la oblea.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

Por el contrario, si se hubiera optado por un ataque en seco, se debería haber hecho dos veces, una por la cara componentes y otra por la cara dorso. La Figura 3.10 muestra en detalle el aspecto de dos puntas después del grabado húmedo, se puede observar que las puntas de óxido de silicio estaban en voladizo completamente liberadas de la oblea.

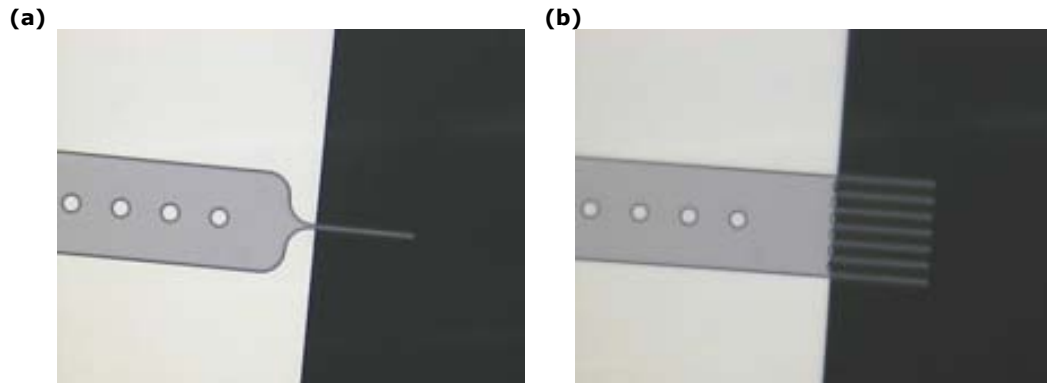


Figura 3.10: Imagen de dos puntas de micro/nanopipetas completamente liberadas después del decapado de la capa de nitruro de silicio (a) recta y (b) múltiple.

Deposición de la capa estructural		
17. Decapado del óxido de silicio nativo (QPRMEC25)		1 - 2
18a. Deposición de 1 μm de poliSi LPCVD (DPOLSENA)		1
18b. Deposición de 0.5 μm de poliSi LPCVD (DPOL-ING)		2
19. Decapado del óxido de silicio nativo (QPRMEC25)		3 - 4
20. Deposición de 0.5 μm de poliSi (DPOL-ING)		3 - 4
21. Final (FINAL)		1-4

A continuación se tenía que depositar el polisilicio para recubrir todo el cuerpo de la micro/nanopipeta de manera hermética dejando el óxido de silicio enterrado debajo. La capa de polisilicio es la capa estructural de la micro/nanopipeta y se escogió porque este material es conformal y mecánicamente estable, es decir adopta la forma de la capa que recubre y tiene esfuerzos mecánicos y gradientes de estrés bajos [7]. Además resiste los grabados en ácido fluorhídrico que es el reactivo que se utilizaría para el ataque de la capa de óxido de silicio que definirá el canal de la pipeta.

Antes de depositar el polisilicio, se decapó el óxido de silicio nativo que pudiera haber. Esta etapa se realizó porque si quedaba óxido de silicio nativo el polisilicio no se depositaría directamente sobre el silicio, si no que lo haría sobre el óxido de silicio nativo. En la etapa de grabado del óxido de silicio de la capa sacrificial, el reactivo utilizado (ácido fluorhídrico) también atacaría el óxido de silicio nativo que hubiera podido crecer y esto haría saltar la capa de polisilicio depositada. Para realizar este decapado se optó por un grabado húmedo con velocidad de ataque lenta porque había óxido PSG a la vista que no se quería atacar. Para saber que grosor de polisilicio era el mejor, primero se procesaron sólo dos obleas depositando dos grosores diferentes. Se depositó una capa de polisilicio de 1 μm (**DPOLSENA**) a la primera oblea y de 0.5 μm (**DPOL-ING**) a la segunda. Se depositó el polisilicio por LPCVD (*Low Pressure Chemical Vapor Deposition*) a 630°C y 100 mTorr. De esta manera el polisilicio recubre y envuelve todas las caras de la micro/nanopipeta, consiguiendo además que el recubrimiento sea más uniforme y conformal. Las condiciones de este proceso se habían optimizado previamente en el IMB-CNM para obtener niveles bajos de esfuerzos mecánicos y gradiente de estrés [8].

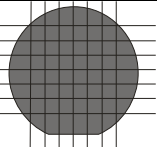
En este punto, el cuerpo de las micro/nanopipetas estaba totalmente envuelto por polisilicio. Para poder acceder al óxido de silicio y grabar el canal, había que abrir unas ventanas en el polisilicio. Para conseguir este objetivo se trabajó en dos aproximaciones para obtener la apertura de las cavidades y en otras dos para conseguir los orificios de salida en las puntas. Debido a su importancia, se trataran en detalle en el *apartado 3.3.3.3 Apertura del depósito de las micro/nanopipetas* y en el *3.3.3.4 Apertura de la punta de las micro/nanopipetas*. La primera aproximación utilizada para abrir las cavidades de entrada se basó en un ataque húmedo anisotrópico en Hidróxido de Tetrametilamonio (TMAH) para grabar el polisilicio en esa zona, la segunda se centró en la abertura de la capa de polisilicio mediante micromecanización con Focus Ion Beam (FIB).

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

En el caso de las puntas se realizaron algunos diseños para que se rompiesen de manera controlada y obtener de esta manera el orificio de entrada. También se utilizó el FIB para la apertura de las puntas

Para escoger el grosor de polisilicio a depositar en las dos obleas que quedaban por procesar, se esperó a obtener los primeros resultados. Finalmente, una vez realizados los experimentos que se detallarán más adelante, se optó por depositar 0.5 μm de polisilicio.

3.3.3.2 Obtención de los chips individuales: Serrado obleas

Obtención de los chips		
22. Serrado de las obleas		1-2

El proceso de fabricación continuó con la separación de los dispositivos que se habían fabricado. Para obtener los chips con las micro/nanopipetas individuales hubo que serrar la oblea. Éste es uno de los pasos delicados en micro sistemas en general y especialmente si hay partes delicadas, como en nuestro caso donde había que tener en cuenta que había puntas muy frágiles en voladizo. Para poder contabilizar el número de micro/nanopipetas rotas en este proceso, se inspeccionaron las obleas en un microscopio óptico antes y después del serrado de la oblea. De esta manera se pudo contabilizar las puntas de las micro/nanopipetas que se perdían en este paso. Esta inspección sirvió para controlar el estado de las puntas de las micro/nanopipetas diseñadas para romperse de manera controlada después del serrado (este proceso se explicará con detalle en el punto 3.3.3.4.1 *Ruptura controlada*).

Normalmente, para el proceso de serrado, como se muestra en la Figura 3.11, la oblea es fijada sobre un *blue-tape*, es decir, es adherida sobre un plástico azul con una cara adhesiva (Figura 3.11a). Por otro lado, hay que tener en cuenta que la oblea se calienta durante el serrado porque se corta con un disco de níquel recubierto con una pasta de diamante que va girando. Para refrigerarla se utiliza un chorro de agua a presión, pero la presión de este chorro podía hacer que se rompieran las puntas de las micro/nanopipetas fabricadas.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

Para evitar que se rompan los dispositivos más delicados durante el proceso del serrado, un proceso habitual en el IMB-CNM consiste en cubrirlos con una resina de protección, HIPR 6512, Fujifilm Electronic Materials, Bélgica (Figura 3.11b), y posteriormente recocerla en un horno para endurecerla (Figura 3.11c). De esta manera las partes más frágiles quedan fijas, recubiertas de resina y no se rompen. Esta resina es utilizada comúnmente para realizar las fotolitografías. Finalmente se procede a serrar la oblea en los chips o dados deseados (Figura 3.11d). Una vez serrada la oblea, se estira el blue-tape con un expansor. El expansor es un aparato que se utiliza para estirar el blue-tape aplicando un poco de calor mientras estira el plástico, de esta manera se consigue que los chips queden un poco separados y se puedan sacar con más facilidad.

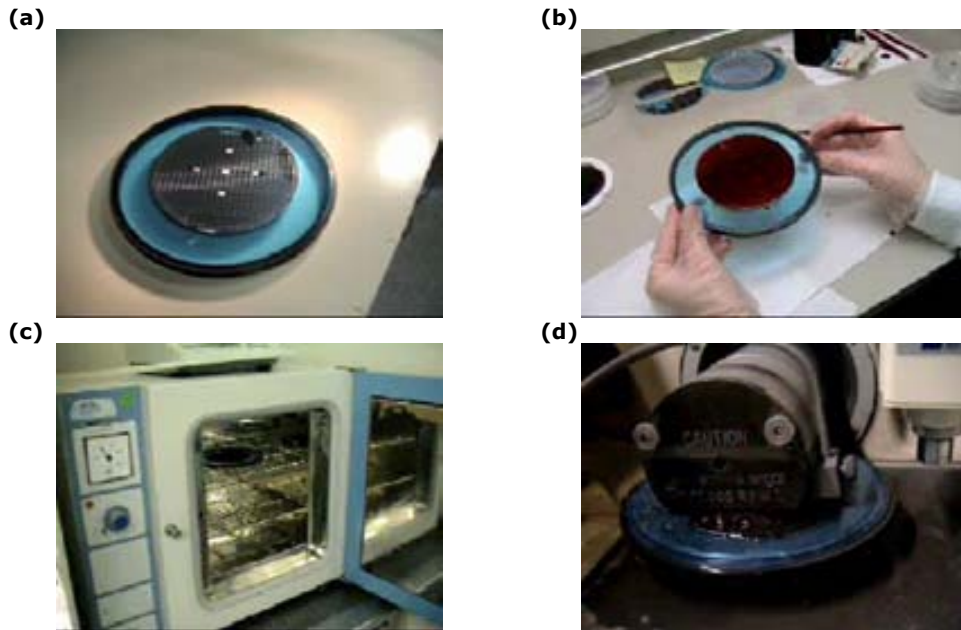


Figura 3.11: Imágenes del proceso de serrado: (a) oblea fijada sobre *blue-tape*, (b) recubrimiento partes delicadas con cera de protección, (c) curado resina de protección y (d) serrado de la oblea.

Para obtener los chips presentados en esta memoria, se enganchó la oblea por la cara dorso sobre un blue-tape. Al poner el plástico por la cara dorso se evitó que las puntas quedaran enganchadas a él. Con el fin de evaluar y optimizar el proceso de serrado para la fabricación de las micro/nanopipetas, se serró una oblea en dos partes. Sobre una mitad se depositó resina de protección antes de continuar con su serrado, la otra mitad se serró directamente sobre el blue-tape y sin resina de protección.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

3.3.3.2.1 Serrado de la oblea con resina de protección

Se depositó resina de protección (HIPR 6512, Fujifilm Electronic Materials, Bélgica) sobre la cara componentes de una de las mitades de la oblea serrada en dos partes. Esta resina debía proteger las puntas de las micro/nanopipetas durante esta etapa de obtención de los chips. Había que curar esta resina a 100°C en la estufa para endurecerla y evitar que se dispersara al pasar la sierra para cortar la oblea.

Una vez cortada la oblea, se colocó encima del expansor para estirar el *blue-tape* y poder de esta manera separar los chips. Se observó durante el proceso que era mejor empezar por los cortes horizontales, es decir, paralelos a las micro/nanopipetas. De esta manera se evitaba la ruptura de algunas puntas y la pérdida de muestras que podían desprenderse del *blue-tape* durante el proceso de serrado. Esta pérdida era debida a las dimensiones que tenía el chip. Su reducido tamaño (3290x952 μm^2), mostrado en la Figura 3.12, hacía que la superficie enganchada sobre el plástico azul fuera reducida.



Figura 3.12: Imagen comparando las dimensiones de un chip que contiene una micro/nanopipeta con una moneda a de 2 céntimos de €.

Una vez separados los chips había que eliminar la resina de protección con acetona. Los chips eran introducidos de uno en uno en el disolvente. Había que ir con cuidado porque eran chips muy pequeños y frágiles. Debido a su pequeño tamaño, se debían introducir verticalmente, sin dejar que cayeran al fondo del recipiente y con cuidado porque se podía producir la rotura de las puntas. Por el hecho de ser tan frágiles, no se podía acelerar ni mejorar el proceso de limpieza utilizando ultrasonidos. Los chips se sumergieron verticalmente en acetona. Después de una primera inmersión, se cambiaban de recipiente para volverlos a sumergir en acetona limpia y finalmente se aclaraban con agua.

El resultado dependía de cómo la acetona disolvía la resina y de la suciedad que había quedado adherida sobre la resina mientras ésta se secaba. En algunos casos, la resina se disolvía pero la suciedad que había depositada encima no, quedaba entonces adherida sobre la punta de la micro/nanopipeta. En otros, la resina no se disolvía lo suficiente, quedaban restos sobre el dispositivo y cuando se secaba, se quedaba enganchada tal y como puede observarse en la Figura 3.13. Estos restos de suciedad o de resina mal disuelta deformaban la punta, lo que demostraba que éste no era un buen método para serrar la oblea.

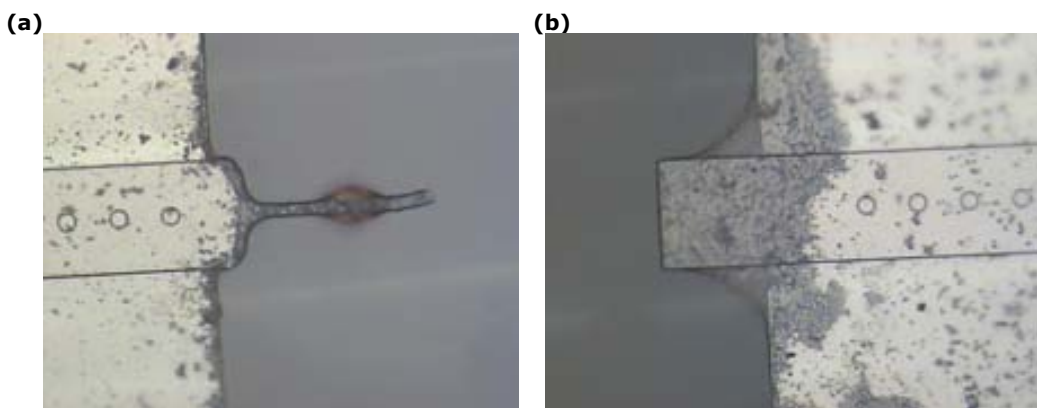


Figura 3.13: Muestra de dos puntas, con suciedad enganchada o con restos de resina no disuelta por la acetona.

3.3.3.2 Serrado de la oblea sin resina de protección

Con el resultado obtenido utilizando resina de protección para serrar la oblea, se pensó en cortar la mitad de la oblea que quedaba sin resina para evitar el paso de limpieza, pero teniendo en cuenta que algunas puntas se podían romper durante el proceso. Se empezó serrando la oblea horizontalmente y una vez hechos estos cortes, se hicieron los verticales. Los chips se separaron de la misma manera que el caso anterior, se estiró el *blue-tape* con el expansor.

Se inspeccionaron los chips en un microscopio óptico, se vio que habían quedado muy sucios. Se observaron unos puntos de color negro que se pueden ver en la imagen de la Figura 3.14. Estos puntos podían ser restos de polvo de silicio producidos al serrar la oblea, por este motivo se intento limpiar los chips haciendo un dip en acetona seguido de otro en Isopropanol (IPA), pero la superficie del chip no quedaba limpia.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

A pesar de lo comentado en el punto anterior sobre que no se podía mejorar la limpieza de la resina en acetona con ultrasonidos, en este caso se utilizó, pero las muestras se movían mucho y se podían romper las puntas. Finalmente, se intentó con un pincel mojado en acetona, se paso con cuidado sobre la superficie de la cara componentes del chip para intentar no romper ninguna punta pero no se consiguió mejorar su aspecto.



Figura 3.14: Aspecto de una punta de una micro/nanopipeta después del serrado de la oblea sin resina de protección.

3.3.3.2.3 Serrado en dados de 2 x 2 chips

No se consiguió limpiar totalmente la superficie de los chips serrados sin resina de protección, por lo que se dedujo que probablemente serian residuos de silicio producidos cuando se serraba la oblea. Si hubieran sido restos orgánicos, se hubieran eliminado con acetona. Para intentar evitar que esta etapa dejara la superficie de los chips tan sucios, se hizo una prueba cortando unos dados con mayores dimensiones ($3600 \times 6580 \mu\text{m}^2$). Estos dados contenían 4 micro/nanopipetas distribuidas en 2 filas por 2 columnas, como muestra la Figura 3.15. Estas nuevas medidas también facilitaban la manipulación del dado. Las micro/nanopipetas diseñadas para romperse durante este proceso no podía ser cortadas utilizando estas nuevas dimensiones porque si formaban parte de un dado, la punta no se abriría al estirar el *blue-tape*.

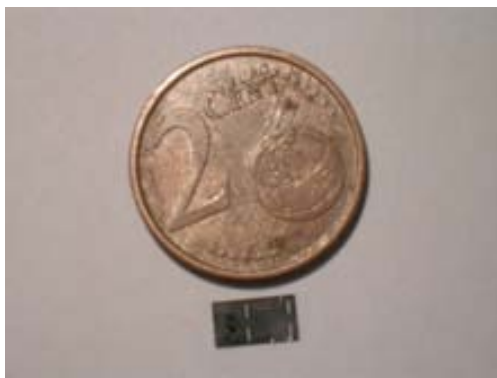

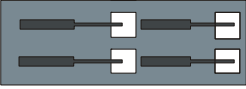


Figura 3.15: Imagen de un chip que contiene cuatro micro/nanopipetas comparando sus dimensiones con las de una moneda de 2 céntimos de €.

Para poder saber cuantas micro/nanopipetas se habían roto en esta etapa de serrado, se inspeccionaron las obleas con un microscopio óptico antes y después del serrado. El porcentaje de pipetas rotas en este paso se calculó para el serrado de la oblea en chips formados por una sola micro/nanopipeta o en dados formados por cuatro. En el caso de los chips con una sola micro/nanopipeta, el cálculo se realizó durante el proceso de serrado sin resina de protección. La Tabla 3.IV muestra el rendimiento calculado durante la etapa del serrado. El rendimiento obtenido para los dados con cuatro micro/nanopipetas es más elevado que el obtenido para los chips que sólo contenían una. Esto es debido a que en la configuración de dado, las puntas estaban más protegidas. De los resultados obtenidos se puede extraer también que, el hecho de aumentar el área del dado hizo que se perdiesen menos dispositivos durante el serrado de la oblea debido al hecho de haber aumentado la superficie enganchada sobre el *blue-tape*.

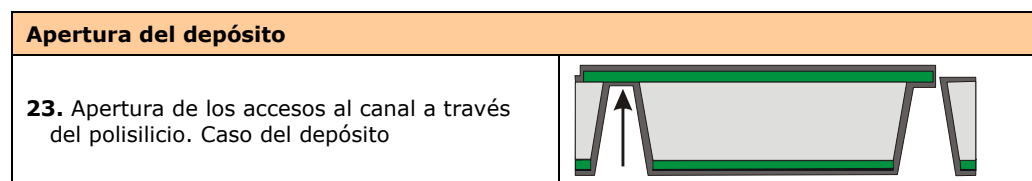
Tabla 3.IV: La columna de la izquierda muestra el rendimiento de las puntas de las micro/nanopipetas y la de la derecha muestra los chips o dados despegados del blue-tape durante el serrado de la oblea. Los cálculos mostrados para los chips con las micro/nanopipetas individuales corresponden al proceso de serrado sin resina de protección.

	Rendimiento puntas	Chips despegados
	83,49%	4,32%
	98,37%	0,59%

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

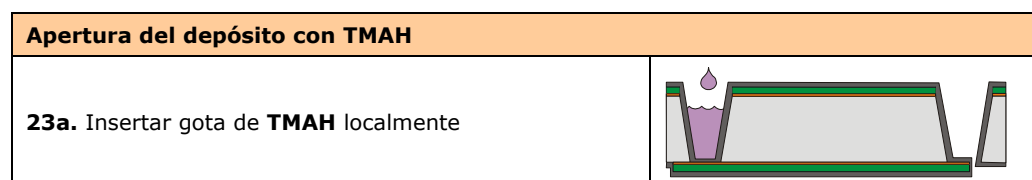
A pesar de haber obtenido un elevado rendimiento en esta etapa, se observó que durante el proceso de fabricación la capa de óxido se estresaba, lo que provocaba la aparición de grietas. Este hecho hizo que algunas puntas no llegaran enteras a la etapa del serrado. También había que tener en cuenta el aspecto final de los chips, algunas de las puntas, a pesar de haber llegado enteras al final de esta etapa, habían quedado sucias debido a restos de resina de protección que no se habían disuelto con la acetona o a residuos de silicio cuando no se utilizó esta resina. Por todos estos motivos se creyó conveniente optimizar esta etapa de separación de los dispositivos en diseños futuros de las micro/nanopipetas.

3.3.3.3 Apertura del depósito de las micro/nanopipetas



Una vez obtenidos los chips, había que grabar el canal de la micro/nanopipeta. Para ello, había que acceder a la capa sacrificial que estaba recubierta por una capa de polisilicio. Esto significaba que había que abrir una ventana de acceso en la membrana y/o en la punta de la micro/nanopipeta. En este apartado en concreto se tratará la apertura de la cavidad de entrada. Se explicarán las dos aproximaciones utilizadas. La primera consistió en introducir una gota de TMAH en la cavidad de entrada del canal que se encontraba situada en la cara dorso, justo en la parte opuesta a la membrana. La segunda aproximación fue utilizar la posibilidad de micromecanizar con FIB.

3.3.3.3.1 Grabado con TMAH



Una de las aproximaciones para abrir el polisilicio en el depósito consistió en poner una gota de TMAH al 25% en la cavidad de entrada de la cara dorso de la micro/nanopipeta. El TMAH es un reactivo utilizado habitualmente en microelectrónica para atacar el silicio y aunque el ataque que realiza es anisotrópico, en el caso concreto del polisilicio se puede considerar de manera aproximada que el ataque es isotrópico porque el polisilicio no tiene direcciones de ataque preferentes. Como el TMAH ataca el polisilicio, el chip no podía ser sumergido totalmente en el reactivo porque atacaría, por un lado, todo el polisilicio que recubría la capa de óxido que definía el cuerpo y la punta de la micro/nanopipeta y, por otro, el silicio de la cara componentes.

Normalmente los ataques en TMAH se realizan sumergiendo la muestra en un baño caliente a 80°C. En nuestro caso, el TMAH se calentó hasta alcanzar esta temperatura, pero no se podía introducir el dispositivo en el baño porque, como se ha comentado con anterioridad, había zonas que no queríamos que fueran atacadas. Existía la posibilidad de poner cera de protección por la cara que no se quería atacar. Solución no aplicable en estas muestras debido a los problemas encontrados en la etapa del serrado, donde ya se ha explicado la dificultad que hubo para eliminar la resina de protección. A pesar de no ser exactamente la misma resina, para eliminar también se utilizan disolventes y la experiencia previa adquirida en el CNM para eliminar este tipo de cera aconsejaban no ponerla.

Todos estos motivos hicieron adoptar otro tipo de estrategias. La primera consistió en depositar una gota del reactivo en el agujero de la cavidad de entrada. Para intentar controlar la temperatura del ataque, se depositó una gota en la cavidad de entrada y se colocó el chip sobre una placa calefactora a 80°C. Pasados unos minutos, se quitó la muestra y se inspeccionó con el microscopio óptico. Se observó que la cantidad de reactivo en la cavidad era tan pequeña que se había evaporado el agua, aumentando la concentración de TMAH.

Se había formado una sustancia que impedía ver si se había producido el ataque, como se muestra en la Figura 3.16. Se intentó limpiar la cavidad sumergiendo el chip en agua, pero no quedaba bien limpia. Esta sustancia que se había formado impedía el paso de líquidos dentro del canal. La segunda consistió en depositar una gota de TMAH calentado a 80°C dentro de la cavidad de entrada, pero sin colocar el chip sobre una placa calefactora. El inconveniente de hacerlo de esta manera es que no se podía controlar la temperatura de ataque del TMAH.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

Se inspeccionó la muestra en un microscopio óptico durante el proceso, pero la gota se enfriaba y no atacaba. Se comprobó que este método no era adecuado y por lo tanto no podía ser utilizado. No se podían controlar las condiciones del ataque ni se podía ver si se había alcanzado el óxido.

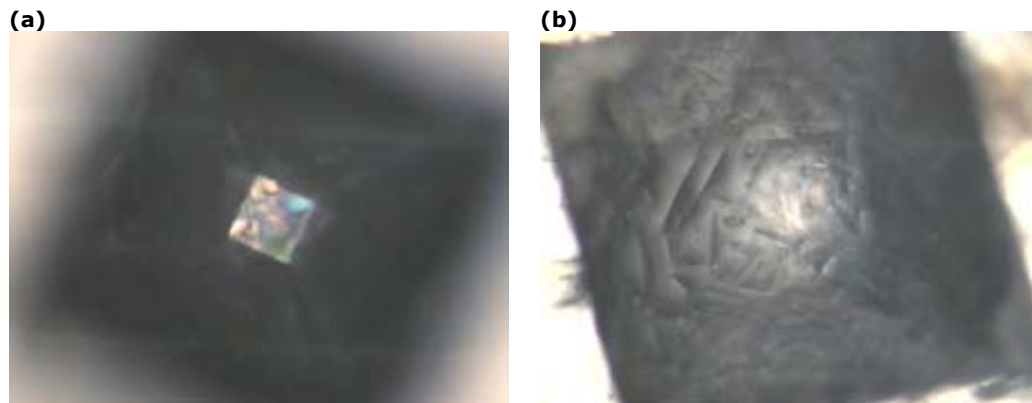


Figura 3.16: Imágenes tomadas con un microscopio óptico de la sustancia formada en la cavidad de entrada con un objetivo (a) 10x y (b) 20x aumentos.

3.3.3.3.2 Micro/nanomecanización con FIB

Apertura del depósito con FIB	
23b. Focused Ion Beam (FIB)	

Como con los ataques en TMAH no se habían podido abrir ventanas en la capa de polisilicio, se propuso hacer la apertura con la ayuda de un *Focused Ion Beam* (FIB). El FIB es una técnica relativamente nueva utilizada en el campo de las ciencias de los materiales y semiconductores para realizar ataques, mecanizaciones y deposiciones focalizadas y controladas [9-11].

Últimamente muchos autores se han servido de esta técnica para micromecanizar superficies en MEMS [12-14]. El FIB utiliza un haz de iones de Galio (aproximadamente de unos 10 nm de diámetro) que se puede enfocar sobre la superficie de la muestra y se puede mover sobre un área seleccionada.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

Se puede escoger entre una apertura más grande del haz o aumentar la intensidad para poder optimizar la relación entre la precisión necesaria para el ataque y la duración del mismo en el momento de realizar la micromecanización. Estos equipos incorporan también plataformas 3D que permiten mecanizar el chip desde diferentes orientaciones. La elevada movilidad de la plataforma facilita el acceso del haz a zonas prácticamente inaccesibles como las cavidades de entrada. Además no se requiere del uso de máscara de protección, ni ninguna máscara adicional porque se pueden definir al momento las configuraciones a grabar. Añadir que la posibilidad de combinar el haz de iones con la obtención de imágenes de elevada resolución gracias al haz de electrones. (*Scanning Electrón Microscope*, SEM). Estas características presentaban el FIB como una buena alternativa al grabado en TMAH para abrir las cavidades de entrada.

La elevada versatilidad del FIB permitió obtener ventanas extremadamente pequeñas y muy bien definidas. Las perforaciones en la capa de polisilicio de las micro/nanopipetas se realizaron en dos equipos diferentes. En un trabajo previo, las muestras habían sido llevadas al *Centre Pluridisciplinaire de Microscopie Électronique et de Microanalyse* (CP2M) en Marsella donde se utilizó un FIB 200TEM (FEI Company, The Netherlands). Los iones de Galio fueron acelerados a una energía de 30 keV. Se consiguieron ventanas con dimensiones de $30 \times 20 \mu\text{m}^2$, ver Figura 3.17.

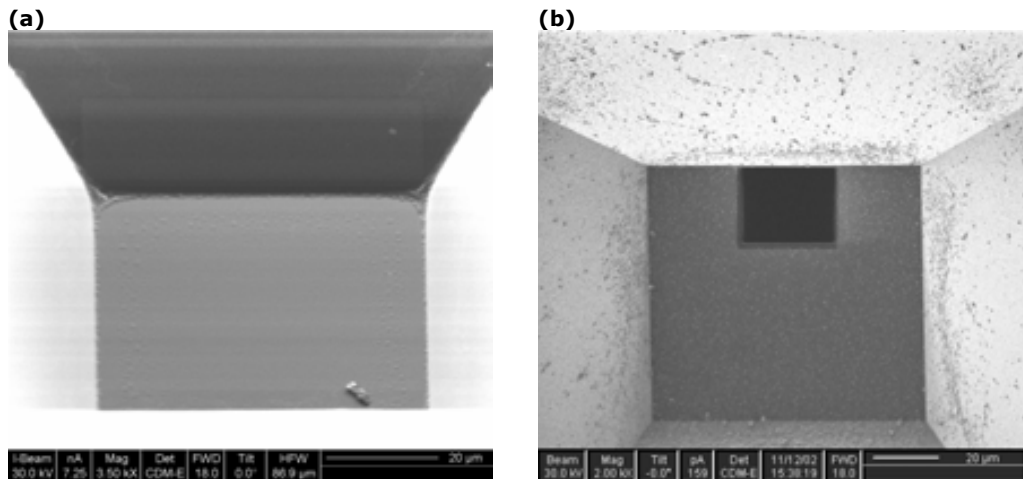


Figura 3.17: Imágenes de una membrana (a) antes y (b) después de la apertura de la cavidad de entrada realizada con el FIB 200TEM.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

Por el contrario, para el trabajo presentado en esta memoria, las muestras se llevaron al Parque Científico de Barcelona donde se utilizó un equipo de haz dual Strata 235 FIB (FEI Company, The Netherlands). Para el mecanizado, los iones de Galio se aceleraron a una energía de 30 keV. El haz de electrones se utilizó para caracterizar la muestra antes y después del ataque. La intensidad del haz utilizado para perforar la cavidad de entrada hasta llegar a la capa de óxido de silicio fue de 7000 pA, de esta manera se consiguió disminuir el tiempo de mecanización.

Para evitar la perforación del canal cuya consecuencia sería la obtención de canales no sellados, se debía poner especial cuidado en no perforar el cuerpo de la micro/nanopipeta definido por la capa de óxido sacrificial. Para detectar el punto final del ataque, se utilizó el sistema de detección instalado en la cámara del FIB que monitorizaba los electrones secundarios emitidos durante el fresado de la muestra. La señal osciloscópica emitida por los electrones secundarios es indicativa de la conductividad de la muestra, por lo tanto podría ser utilizada para detectar el punto final de la perforación al producirse un cambio al pasar de material conductor (polisilicio) a menos conductor (óxido de silicio).

Para acceder a la cavidad de entrada había que poner la superficie de las micro/nanopipetas en contacto con el portamuestras porque la cavidad de entrada estaba en la cara dorso. Como las puntas de las muestras eran frágiles, para evitar que tocaran el portamuestras, los dispositivos se colocaron de lado, de esta manera se evitaba que se rompieran.

Se obtuvieron ventanas con dimensiones mínimas de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$. También se intentaron hacer diferentes diseños, como por ejemplo agujeros pequeños pensando en utilizar-los como filtros o en forma de marco en lugar de agujeros, ver Figura 3.18.

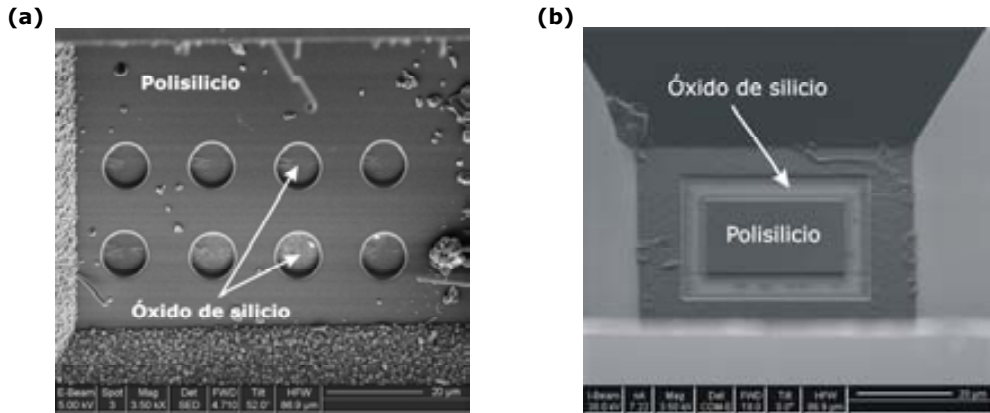


Figura 3.18: Imágenes de la apertura del depósito con el equipo Strata 235 FIB en forma de agujeros tipo filtro (a) y marco (b).

La utilización del FIB para abrir las ventanas en el polisilicio permitió obtener ventanas en la cavidad de entrada del orden de las 10 μm muy bien definidas. Además se consiguieron abrir algunas cavidades con filtro incorporado. Esta resultó ser una buena alternativa al ataque en TMAH porque se podía controlar perfectamente la abertura en la capa de polisilicio. Además era posible jugar con las formas y las medidas de las entradas realizadas en la cavidad de entrada, obteniendo aperturas con uno o más agujeros.

Los inconvenientes de esta técnica fueron su elevado precio y el tiempo del proceso debido a que las muestras eran procesadas de una en una. Existen equipos comerciales que ofrecen la posibilidad de introducir varias obleas enteras y aunque el ataque de los dispositivos se realizaría de manera individual porque sólo hay un haz de iones que puede ser dirigido a cualquier punto de la oblea, aparece la posibilidad de programar los mecanizados a realizar en FIB.

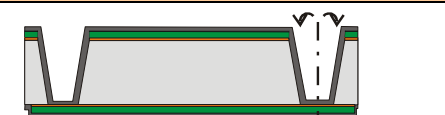
El trabajo realizado para la obtención de la apertura de la cavidad de entrada mostró que podía ser una etapa prescindible en futuros diseños evitando la deposición de polisilicio en la cavidad de entrada al canal de la micro/nanopipeta.

3.3.3.4 Apertura de la punta de las micro/nanopipetas

Apertura de la punta	
24. Apertura de los accesos al canal a través del polisilicio. Caso de la punta.	

Como se ha comentado en el apartado anterior, para acceder a la capa de óxido de silicio sacrificial, había que abrir una ventana en la membrana y/o en la punta de la micro/nanopipeta. En este punto se explicará la obertura de la punta. Esta ventana no sólo servirá de entrada para poder atacar la capa de óxido de silicio, si no que también será el orificio de entrada o salida cuando se utilice la pipeta para aspirar o dispensar líquidos respectivamente.

3.3.3.4.1 Ruptura controlada

Ruptura controlada de la punta	
24a. Ruptura Controlada	

Se buscaba un método barato, rápido, sin pasos tecnológicos adicionales para conseguir la apertura de la punta, definir el orificio de salida y tener acceso a la capa sacrificial de óxido de silicio. Esta aproximación consistió en diseñar algunas micro/nanopipetas con unas puntas especiales para que se produjera su ruptura de manera controlada. Durante la etapa del serrado las obleas, se colocaron sobre el blue-tape en una pandereta. Una vez serrada la oblea, el *blue-tape* se estiró con la ayuda del expansor para separar los chips serrados y poder de esta manera extraerlos uno a uno con facilidad. Estas puntas de las micro/nanopipetas fueron diseñadas para romperse de manera controlada en esta etapa del proceso, en el momento en el que se producía el estirado del *blue-tape*.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

Estas micro/nanopipetas solamente diferían en la geometría, se había añadido una base para que al estirar el *blue-tape* después del serrado se produjera la apertura de la punta. Se realizaron dos diseños diferentes, el diseño A (Figura 3.19a) corresponde a las micro/nanopipetas pw10 y el diseño B (Figura 3.19b) que corresponde a las micro/nanopipetas p2w10. Las puntas en voladizo se encontraban unidas a unas estructuras o bases. La parte de la base unida a la punta se encontraba en voladizo, mientras que el otro extremo de la misma se encontraba anclado sobre la superficie de silicio que quedaba justo delante del chip. Las imágenes de la Figura 3.19 muestran unas flechas que indican el movimiento producido al estirar el *blue-tape* en el expansor que inducirá la ruptura de manera controlada de la punta al estirar la base y la punta en sentidos opuestos. Este proceso no necesitó el empleo de ninguna máscara adicional, tampoco necesitó un proceso tecnológico diferente porque estas bases quedaban definidas al estructurar la capa sacrificial de óxido de silicio y se recubrían de polisilicio al depositar la capa estructural.

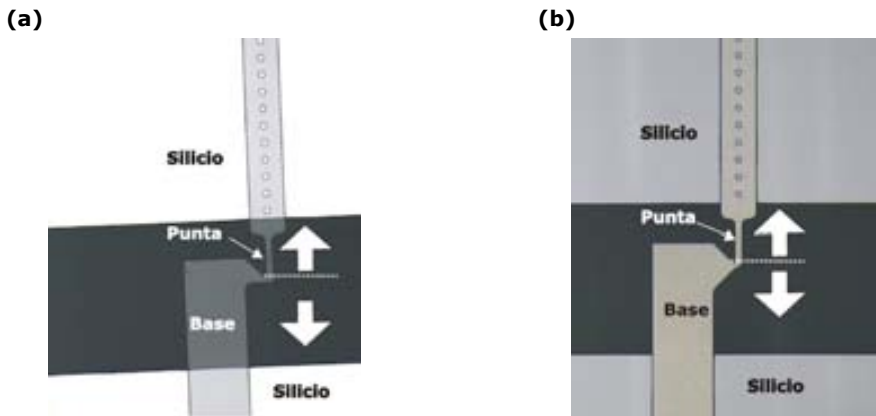


Figura 3.19: Ejemplos de puntas diseñadas para abrirse al estirar el *blue-tape* después del serrado de la oblea, (a) diseño A y (b) diseño B. Las flechas indican el movimiento producido al estirar el *blue-tape* que induciría la ruptura de la punta.

Se realizaron simulaciones FEM (Finite Element Modelling) para poder conocer el punto máximo de concentración de esfuerzos mecánicos en las estructura de ruptura controlada. La proyección de todos los esfuerzos mecánicos a lo largo de los ejes x, y, z se conoce con el nombre de esfuerzos de Von Misses. En el caso de las micro/nanopipetas, el punto de máxima concentración de estreses indicaría la posición por donde empezaría la fractura de la punta.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

Estas simulaciones fueron mecánicas y estáticas. Debido al poco espesor que presentaban las micro/nanopipetas ($1.5 \mu\text{m}$), las simulaciones podían ser simplificadas aproximando a elementos casi 2D. Las condiciones de contorno consistieron en considerar el extremo de la parte anclada de la base como fija y aplicar una fuerza en el otro extremo de la micro/nanopipeta. Fijando esta zona, se simularon desplazamientos en el plano de la oblea simulando el movimiento que realizarían los chips de las micro/nanopipetas durante el proceso de estirar el *blue-tape* con el expansor después de serrar la oblea. La representación de estrés de Von Mises señaló el punto donde se produciría el máximo de la concentración de esfuerzos mecánicos al que se someten las diferentes partes de una estructura. Para los dispositivos presentados en esta memoria, el máximo de esta magnitud se producía en el punto marcado y ampliado en la Figura 3.20 y Figura 3.21.

La Figura 3.20 muestra la representación de estrés de Von Mises para las micro/nanopipetas del diseño A. Se muestran los resultados obtenidos para desplazamientos de referencia de $\pm 1 \text{ nm}$ simulados en el eje x (Figura 3.20a y c) y en el eje y (Figura 3.20e y g). Se ha ampliado el punto donde se producía la máxima concentración de estrés para cada movimiento y se muestra en las Figura 3.20b, d, f y h. de donde se podía concluir que la fractura de las estructuras empezaría en ese punto.

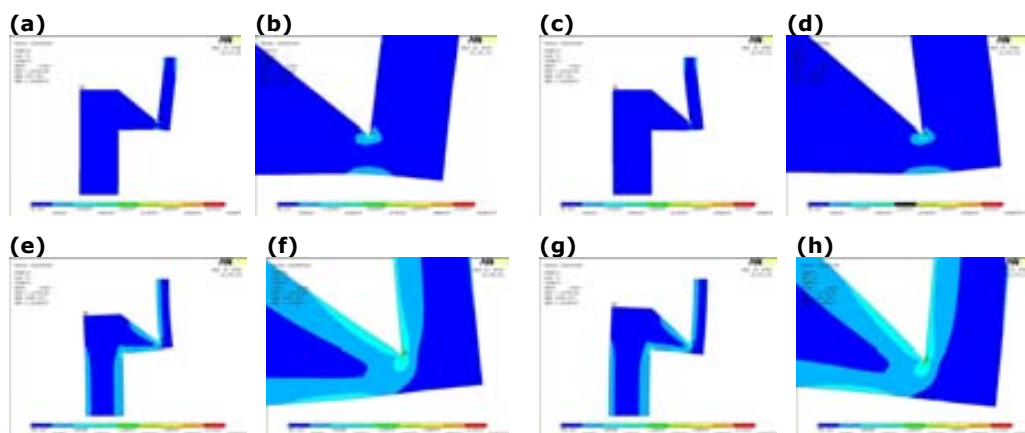


Figura 3.20: Distribución de la concentración de esfuerzos mecánicos de von Mises para el diseño A, (a-d) movimiento en el eje x, (e-h) movimiento en el eje y. En las ampliaciones se puede observar el punto donde se encuentra el valor máximo que corresponde al punto por donde iniciará la ruptura las estructuras al producir dicho movimiento.

La Figura 3.21 muestra en este caso la representación de estrés de Von Mises para el diseño B. Se muestran, al igual que en el caso anterior, los resultados obtenidos para desplazamientos de referencia de ± 1 nm simulados en el eje x (Figura 3.21a/c) y en el eje y (Figura 3.21e/g). También se ha ampliado la zona donde se encontró el punto de máxima concentración de esfuerzos mecánicos para cada movimiento y se muestra en las Figura 3.21b, d, f y h. de donde se podía concluir que la fractura de las estructuras empezaría en ese punto.

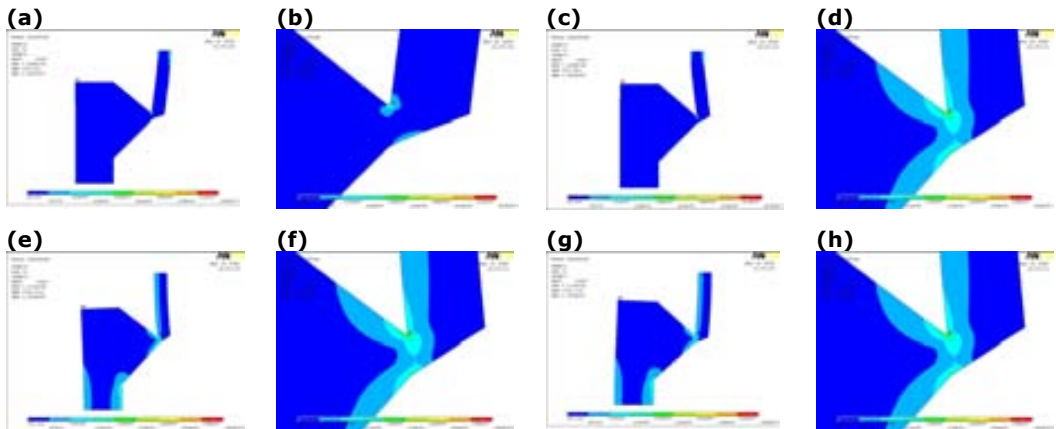


Figura 3.21: Distribución de la concentración de esfuerzos mecánicos de von Mises para el diseño B, (a-d) movimiento en el eje x, (e-h) movimiento en el eje y. En las ampliaciones se puede observar el punto donde se encuentra el valor de máxima concentración.

Tras serrar la oblea y estirar la oblea en el *blue-tape* con el expansor, los resultados experimentales coincidieron con los resultados de estas simulaciones. Las micro/nanopipetas se rompían en el punto donde se había producido el máximo de la concentración de esfuerzos mecánicos como se puede observar en las imágenes ópticas de la Figura 3.22.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

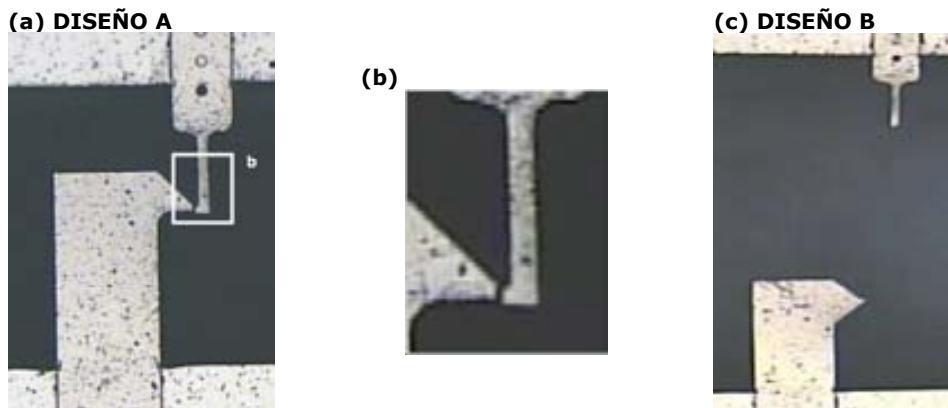


Figura 3.22: Imágenes de las micro/nanopipetas con puntas definidas para ruptura controlada en un punto después del proceso del serrado y estirado del *blue-tape* para (a-b) diseño A y (c) diseño B.

Para poder calcular el porcentaje de puntas que se rompían por el punto predeterminado al estirar el *blue-tape* después de la etapa del serrado, se inspeccionó la oblea antes y después de serrarla y estirlarla. Algunas puntas se rompían durante el proceso de fabricación dentro de Sala Blanca debido a la aparición de esfuerzos mecánicos en la zona de la capa de óxido de silicio donde empezaba la punta en voladizo. La Figura 3.23 intenta mostrar en un dibujo esquemático donde se produce la concentración de esfuerzos mecánicos sobre una capa de óxido de silicio estructurada en voladizo. Se puede observar como aparece en el punto de unión con la base en silicio y que esta concentración es mayor a mayor anchura de la capa en voladizo.

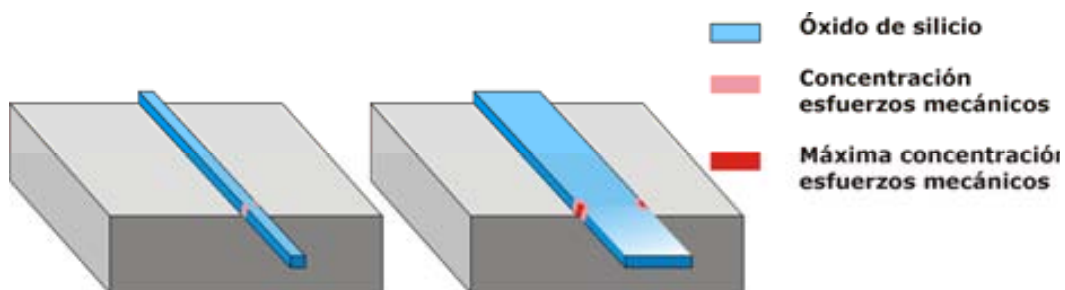


Figura 3.23: Dibujo esquemático donde se han señalado la concentración de esfuerzos mecánicos en una capa de óxido de silicio en voladizo.

El porcentaje de puntas abiertas con éxito obtenido con las micro/nanopipetas diseñadas para la ruptura de la punta de manera controlada se muestra en las siguientes tablas.

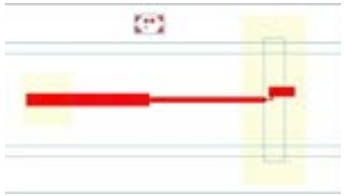
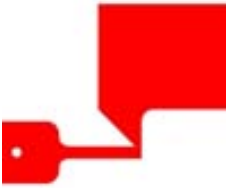

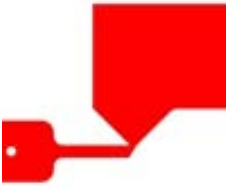


3. Micro/nanopipetas: Primera generación

La presentación de los resultados se ha dividido según el modelo diseñado. El rendimiento obtenido de chips al finalizar el proceso de fabricación dentro de la Sala Blanca fue del 93,22%. Por este motivo, el porcentaje mostrado en la Tabla 3.V está calculado respecto al número de micro/nanopipetas con la punta entera antes de la etapa del serrado de la oblea, es decir, no se contabilizaron las micro/nanopipetas que no llegaban enteras a la etapa de serrado.

Se puede observar en los resultados mostrados en la Tabla 3.V que el porcentaje de rendimiento obtenido para la ruptura de las micro/nanopipetas tipo p1w10, p2w10 y p3w10, las que pertenecen al grupo de puntas individuales, es elevado. El diseño A simulado corresponde con las micro/nanopipetas tipo p1w10 y el diseño B a las tipo p2w10. Se comprobó que la rotura de la punta se producía en el mismo punto donde había salido el máximo de la concentración de esfuerzos de von Misses.

El diseño de las micro/nanopipetas tipo p3w10 tenían el punto de unión de la punta con la base diferente a las del tipo p2w10, este hecho hizo aumentar el rendimiento, se obtuvieron más puntas abiertas correctamente.

Tabla 3.V: Porcentaje de las micro/nanopipetas con puntas rectas individuales definidas para ruptura controlada después del proceso de serrar y estirar la oblea.

Nombre	Dibujo	Punta	Rendimiento
p1w10			100%
p2w10			73,33%
p3w10			100%

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

De las del tipo p1w10 comentar también que se observó que eran las de diseño individual que más se rompían antes de acabar el proceso dentro de la Sala Blanca. Esto era debido a que una parte del brazo de la micro/nanopipeta estaba en voladizo y como se ha mostrado en la Figura 3.23 se produce una mayor concentración de esfuerzos mecánicos haciendo que la capa de óxido de silicio se estresara, apareciesen grietas en el punto de anclaje de la capa de óxido al silicio, es decir, en el punto donde empezaba el voladizo, y que, finalmente, se produjera la ruptura, tal y como se muestra en la Figura 3.24 (a). En esta figura se puede observar también como aparecen grietas en la base debido a los esfuerzos mecánicos que sufre la capa de óxido de silicio, pero el dispositivo se rompía antes por el brazo. Se puede comprobar como las fisuras de la base son mayores debida a la mayor concentración de esfuerzos mecánicos, pero se produce la fractura del brazo porque es una estructura menos robusta que la base.

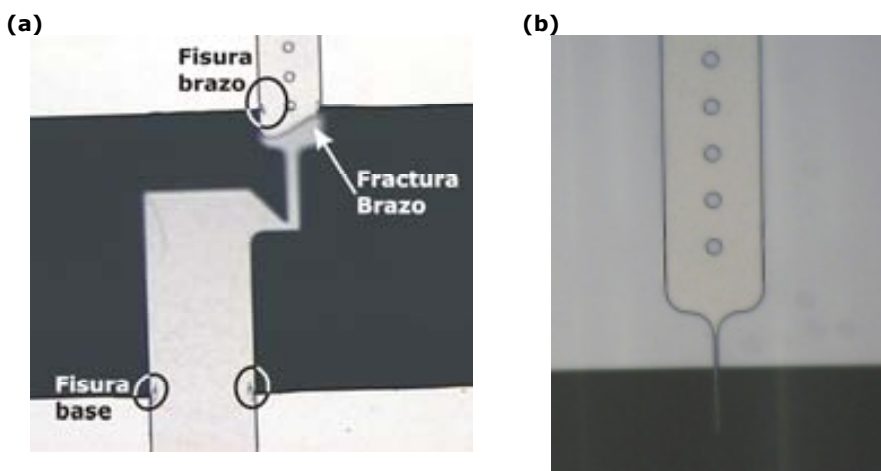




Figura 3.24: Imagen de (a) una base y una punta de una micro/nanopipeta del tipo p1w10 donde empiezan a aparecer grietas y (b) ejemplo de una micro/nanopipeta con todo el brazo sobre la superficie de silicio

Para evitar la aparición de grietas en el brazo de la micro/nanopipeta se comprobó que era mejor que todo el brazo estuviera sobre la superficie de silicio y que sólo la punta estrecha de la micro/nanopipeta estuviera en el aire, como se puede comprobar en la Figura 3.24 (b). De esta manera los esfuerzos mecánicos eran muy pequeños y no se producen grietas.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

Para las micro/nanopipetas en forma de anilla (p4w10) no se pudo hacer el recuento como muestra la Tabla 3.VI. La anilla diseñada para estirar de ella y de esta manera abrir la punta, había desaparecido antes de finalizar el proceso de fabricación dentro de Sala Blanca. Esto fue debido al tipo de diseño que tenía la punta en voladizo y su longitud era mucho más larga que la del resto de diseños con punta en voladizo. Otros diseños que también tenían puntas de gran longitud las tenían ancladas al silicio por dos puntos, el primero situado debajo del brazo y el segundo situado en la base, pero la anilla no estaba anclada sobre superficie de silicio. Igualmente, la mayoría de las micro/nanopipetas de este tipo conservaron el voladizo que quedó recubierto de polisilicio porque la anilla se había perdido antes de la etapa de deposición de la capa estructural.

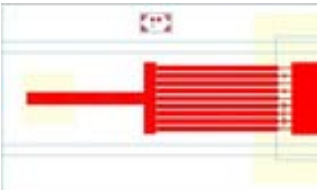
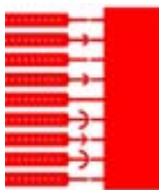


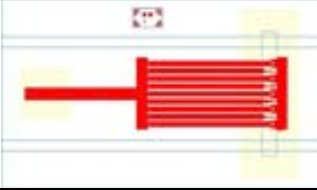

Tabla 3.VI: Porcentaje de las micro/nanopipetas con puntas tipo anilla definidas, la ausencia de datos en el diseño se explica en el texto.

Nombre	Dibujo	Punta	Rendimiento
p4w10			-

Los resultados obtenidos para las micro/nanopipetas multipuntas del tipo p5w10 y p6w10, aunque el diseño de rotura se basaba en la de ruptura controlada simple, se comprobó que el porcentaje de apertura correcta de la punta era más elevado para las del tipo p6w10. Esto fue debido a la única diferencia que había en el diseño que era la base. Las micro/nanopipetas del tipo p5w10 tenían la base más amplia y la parte en voladizo de la base era mucho mayor que la parte anclada sobre superficie de silicio. Esto hecho hacía que aparecieran grietas en el trozo de base que se encontraba en voladizo y que finalmente se produjera la ruptura por este punto.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

Tabla 3.VII: Porcentaje de las micro/nanopipetas con multipuntas definidas para ruptura controlada después del proceso de serrar y estirar la oblea.

Nombre	Dibujo	Punta	Rendimiento
p5w10			21,43%
p6w10			100%
p7w10			0,0%*

*Porcentaje calculado contabilizando el chip entero. Las puntas estrechas estaban abiertas correctamente, el resto de puntas del chip estaban rotas.

Este caso se muestra en la Figura 3.25a, donde una micro/nanopipeta tipo p5w10 se ha roto por la base, al contrario de lo que pasaba con las del tipo p6w10 que se abrían correctamente (Figura 3.25b) porque tenían la base más estrecha y con más superficie anclada sobre el silicio, esto hacía que sufriera menos estrés.

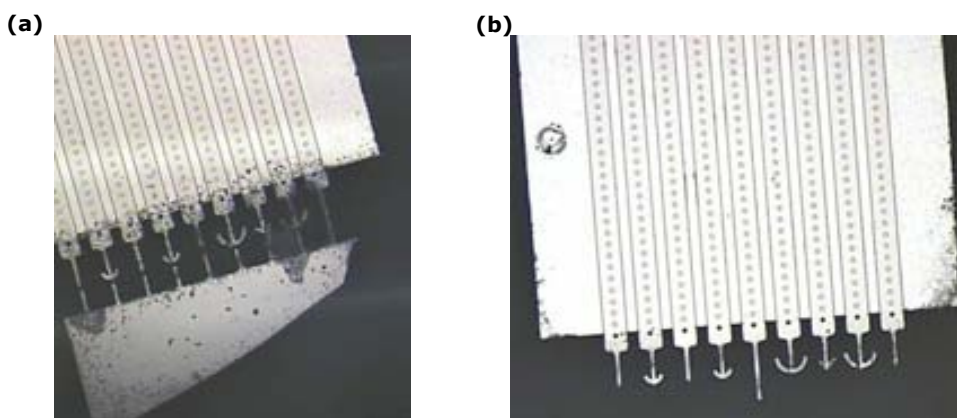


Figura 3.25: Imágenes de las micro/nanopipetas con multipuntas (a) tipo p5w10 que al tener la base más grande se rompía y (b) tipo p6w10 que al tener la base más pequeña se producía la apertura correcta en la punta de las micro/nanopipetas.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

En el caso de las micro/nanopipetas multipuntas tipo p7w10 aunque se consideró un porcentaje del 0,0% porque no se encontró ningún chip donde todas las puntas se abrieran correctamente. Inspeccionando estos chips con el microscopio óptico, se observó que sí se habían abierto correctamente las puntas estrechas. Las puntas que no tenían estructura y por lo tanto eran más anchas, se rompían por la parte del brazo donde empezaba el voladizo, como se muestra en la Figura 3.26. Éste era un diseño bastante diferente y la concentración de esfuerzos se producía en la parte anclada del brazo de la micro/nanopipeta, en la unión con el silicio, y se rompían todas por este punto.

Esta aparición de esfuerzos mecánicos se había empezado a detectar en la capa de óxido de silicio de los diseños de puntas individuales de las micro/nanopipetas que tenían una parte del brazo fuera de la estructura del chip. Al principio se había observado la aparición de grietas que daban como resultado la ruptura del voladizo por la zona donde se había agrietado.

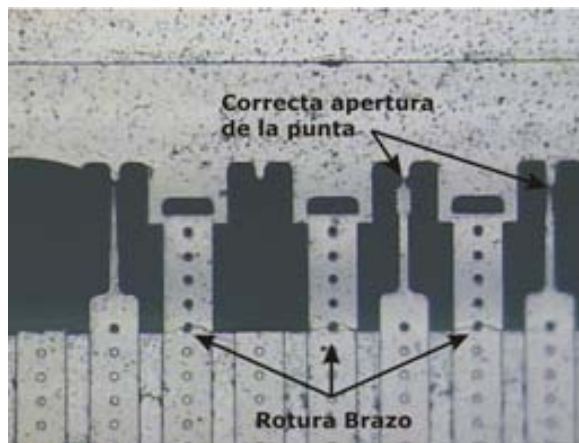
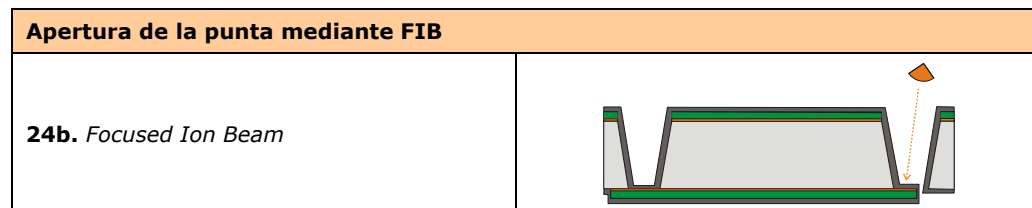


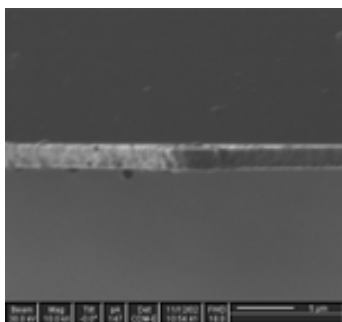
Figura 3.26: Imagen de la micro/nanopipeta multipuntas tipo p7w10 donde las puntas más estrechas se han roto correctamente.

3.3.3.4.2 Micro/nanomecanización con FIB



Como se ha explicado con anterioridad en el apartado 3.3.3.2 *Micro/nanomecanización con FIB* la utilización de este equipo permitió abrir ventanas de pequeñas dimensiones y muy bien definidas en la capa polisilicio de la cavidad entrada. En el caso de las puntas además de conseguir la apertura de la capa de polisilicio, también se podrían definir geometrías difíciles. Para realizar las aperturas en las punta se utilizaron los mismos equipos usados para atacar el polisilicio del depósito, el FIB 200TEM (FEI Company, The Netherlands) del CP2M y el de haz dual Strata 235 FIB (FEI Company, The Netherlands) del PCB. Como en el caso de la apertura de la cavidad de entrada, en el FIB 200TEM se obtuvieron los resultados preliminares de un trabajo anterior que demostraban la posibilidad de abrir ventanas en la capa de polisilicio de la punta de la micro/nanopipeta con esta técnica. La intensidad del haz utilizado fue de 30 kV, la misma que se utilizó para abrir las ventanas en la cavidad de entrada. Se obtuvieron ventanas con unas dimensiones por debajo de $1 \times 1 \mu\text{m}^2$, a la imagen (a) de la Figura 3.27 se puede observar una vista frontal de una punta antes de ser abierta con el FIB. En la imagen (b) de la misma figura se observa esta misma punta después de abrir una ventana de $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ (enmarcada en un recuadro blanco) con el FIB.

(a)



(b)

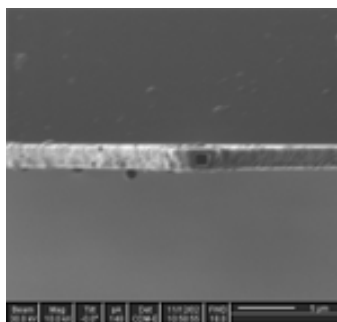


Figura 3.27: Vista frontal de una punta de micro/nanopipeta, (a) antes y (b) después de la apertura de la punta mediante nanomecanización con un FIB 200TEM

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

En el caso del equipo Strata 235 FIB, la intensidad del haz fue menos elevada que la utilizada para la apertura de la cavidad de entrada, sólo se llegó a 3000 pA. Se disminuyó la intensidad para que el micromecanizado del polisilicio fuera más lento y se obtuvieran puntas pulidas. Al disminuir la intensidad del haz, el tiempo del proceso de mecanizado aumentó a 2-3 minutos por muestra. De esta manera se logró tener un mayor control del ataque. Las muestras se colocaron en dos posiciones diferentes, las primeras en horizontal (cara dorso en contacto con el portamuestras) y las otras de lado (como en la apertura de la cavidad de entrada). Como el cuerpo de la micro/nanopipeta estaba en la cara componentes se pudo poner la muestra en posición horizontal para realizar el ataque. Esta tecnología permitió cortar puntas con diferentes diseños dependiendo de la aplicación posterior para la que fueran utilizadas. Se realizaron diferentes tipos de corte, desde incisiones simples para conseguir el acceso a la capa de óxido sacrificial (Figura 3.28b) hasta puntas biseladas en diferentes ángulos (Figura 3.28c y d) que podrían ser utilizadas para inyectar fármacos.

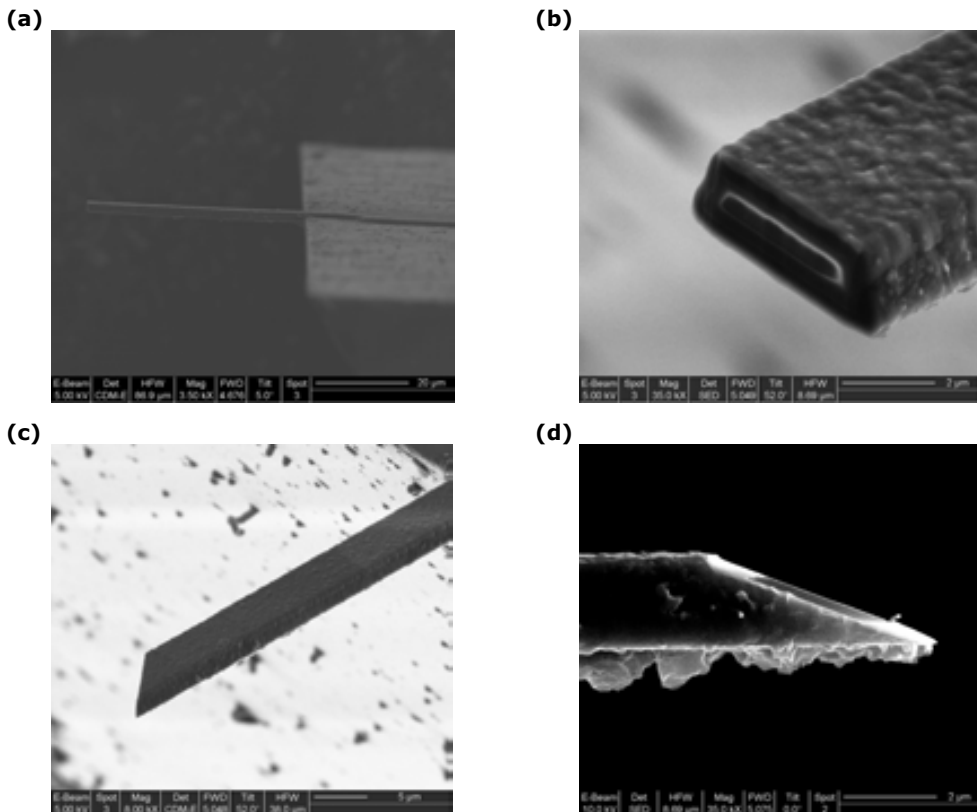


Figura 3.28: Imágenes SEM de (a) una punta recta antes y después de micromecanizarla como (b) corte simple, (c)-(d) biseladas en diferente ángulo.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

Para las puntas múltiples también se realizaron diferentes diseños. La Figura 3.29 muestra imágenes FIB de una punta múltiple en 4 puntas biselada, la figura (a) muestra cuatro puntas rectangulares antes de la apertura con el FIB y la (b) nos enseña la forma biselada obtenida con el FIB. La imagen SEM mostrada en la Figura 3.29c muestra el corte realizado en esta punta múltiple para acceder a la capa sacrificial de óxido de silicio.

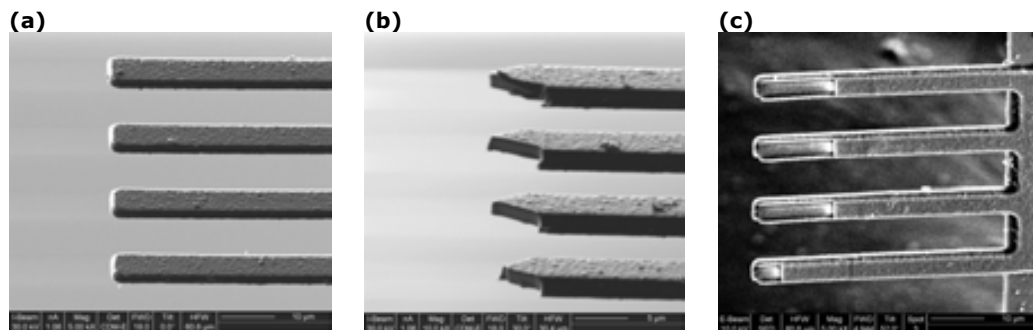


Figura 3.29: Imágenes FIB de una punta múltiple-4 (a) antes de la micromecanización en FIB y (b) una vez biseladas con el Strata 235 FIB. (c) Imagen SEM de una punta múltiple-4 abierta para tener acceso a la capa sacrificial.

La Figura 3.30 muestra las micromecanizaciones realizadas en FIB de una punta múltiple en 3 puntas, en este caso se realizó un doble biselado a cada punta para obtener de esta manera una punta más afilada. La imagen de la Figura 3.30a muestra la punta antes de la micromecanización y en la Figura 3.30b se muestra el aspecto de la punta después del trabajo en el FIB. Se realizó un doble biselado para obtener una punta más afilada.

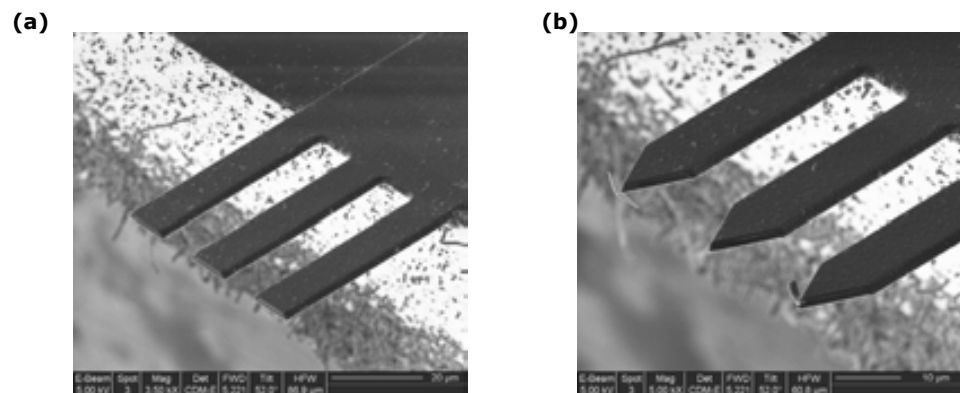


Figura 3.30: Imagen de la parte final de una micro/nanopipeta acabada en 4 puntas antes (a) y después (b) de la apertura con el equipo Strata 235 FIB en doble bisel.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

Otros diseños diferentes realizados se muestran en las imágenes SEM de la Figura 3.31. Partiendo de una punta triangular (Figura 3.31a) se micromecanizaron varias formas, desde el corte más sencillo, plano, realizado únicamente para tener acceso a la capa sacrificial de óxido (Figura 3.31b) hasta las más complicadas, como puntas cóncavas (Figura 3.31c) que podrían ser utilizadas con esta forma para manipular células en suspensión o puntas peine (Figura 3.31d) para dispensar en diferentes puntos un fluido en una única inyección.

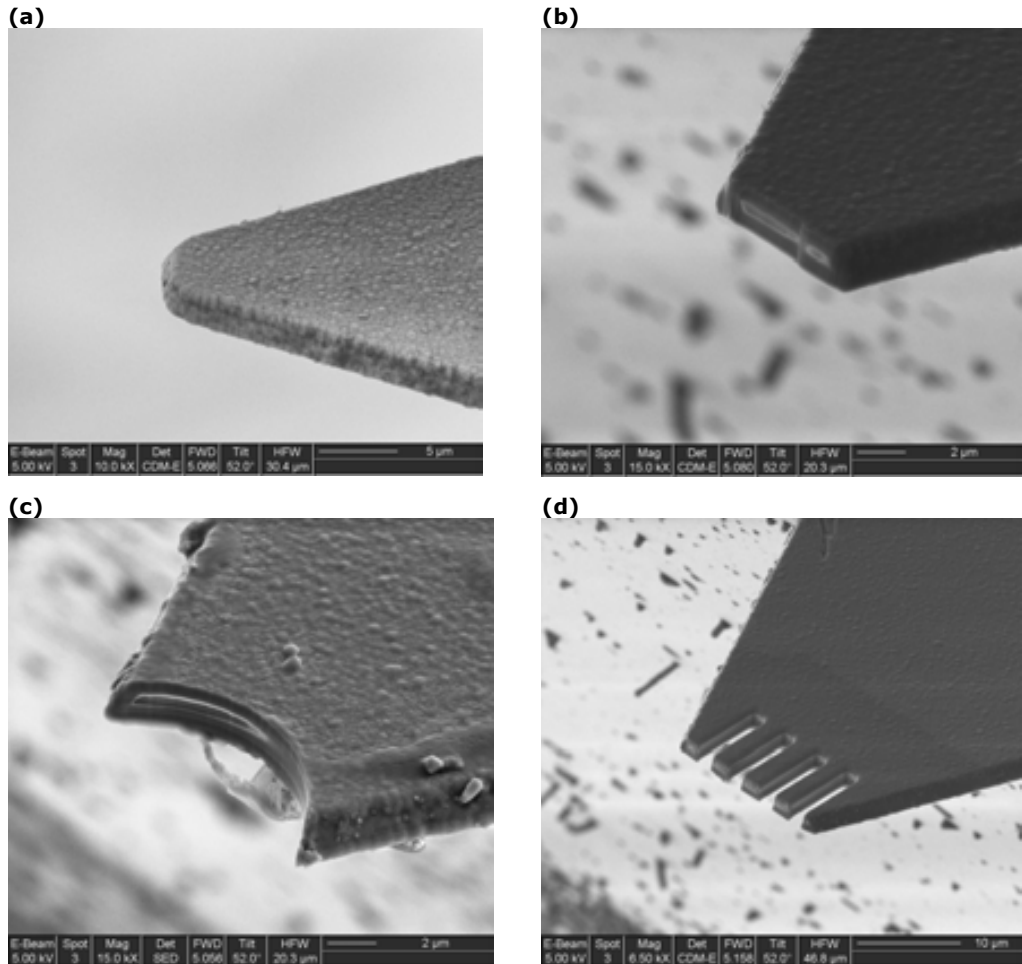
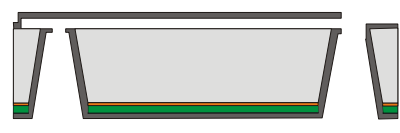


Figura 3.31: Imágenes de una punta en forma de triángulo (a) antes y después de la apertura con el equipo Strata 235 FIB con forma (b) plana, (c) cóncava y (d) peine.

3.3.3.5 Grabado de la capa sacrificial de óxido de silicio para la obtención del microcanal

Definición del microcanal	
25. Grabado de la capa estructural de óxido PSG en HF (49%)	

Una vez abiertas las ventanas en la capa de polisilicio de la cavidad de entrada y de la punta, la capa sacrificial de óxido de silicio era accesible y se podía atacar para definir el canal de la micro/nanopipeta. Al realizar el ataque en húmedo, en el momento en el que se seca la muestra después del grabado, podría producirse el fenómeno conocido como *sticking*.

Este problema se da en tecnologías de mecanización superficial entre superficies a corta distancia y flexibles. Estas superficies se pueden doblar, entrar en contacto y quedar pegadas entre si mientras se secan. En nuestro caso, al vaciar el cuerpo de la micro/nanopipeta, este fenómeno podía producirse entre la parte superior del polisilicio y el sustrato de silicio. Algunos autores utilizan la formación de monocapas autoensambladas para evitar el *sticking* de las capas durante un proceso húmedo [15, 16]. Estos reactivos podrían contaminar las soluciones utilizadas dentro de un sistema de microfluídica, interacción no deseada para algunas aplicaciones. Para evitar el *sticking* y el uso de reactivos químicos, se construyeron puntos de anclaje a lo largo de todo el canal. Se diseñaron en los dispositivos a fabricar unas columnas de polisilicio dentro del canal que actuaron como puntos de anclaje para evitar que este fenómeno se produjera. La máscara descrita en el apartado 3.3.2 *Diseño de las máscaras* incluía los motivos de estos puntos de anclaje.

Estos puntos fueron transferidos a la capa sacrificial de óxido de silicio en la etapa de fotolito **FOTO-FCD** (Etapa 6 del proceso de fabricación explicado en el apartado 3.3.3 *Proceso de fabricación*). Con el posterior grabado **PGIOXGUI** (Etapa 8) se fabricaron unos pozos en la zona de la capa sacrificial donde se habían definido los puntos de anclaje. Estos pozos fueron recubiertos por una capa de 1.5 μm de polisilicio durante la etapa **DPOL-ING** (Etapa 20). Estas estructuras se muestran en el microcanal descubierto de la imagen SEM de la Figura 3.32.

El óxido de silicio PSG se grabó posteriormente con ácido fluorhídrico dejando el canal hueco por dentro y con forma de bóveda debido a las estructuras fabricadas. Se construyeron 226 puntos de anclaje con un diámetro de $8\ \mu\text{m}$ y separados entre ellos una distancia de $16\ \mu\text{m}$. Las medidas de estas columnas y la separación entre ellas se calcularon en base a la experiencia en micromecanización superficial adquirida en trabajos previos en el CNM [17-19]. Aunque este proceso se había probado para grabar capas sacrificiales, para las micro/nanopipetas evitaría el *sticking* dentro de un microcanal por un lado durante el proceso de grabado de la capa sacrificial y por otro cada vez que los microcanales se llenen y se vacíen de líquido.

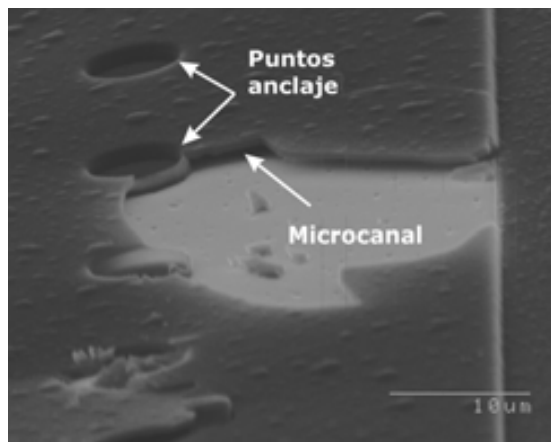


Figura 3.32: Imagen SEM del microcanal de una micro/nanopipeta con la capa de polisilicio abierta por el brazo.

El ácido fluorhídrico al 49% fue escogido como reactivo para atacar la capa de óxido de silicio debido a su elevada velocidad de ataque (indicada para ataques laterales largos). El control de la distancia atacada no es tan uniforme si se compara con otros reactivos, utilizados en microelectrónica, para atacar capas de óxido de silicio como el SiOEtch (compuesto por una mezcla de fluoruro de amonio y ácido fluorhídrico), pero en nuestro caso no era importante porque se podían sobreatacar los dispositivos, este ácido no ataca al silicio ni al polisilicio. Interesaba más un ataque rápido que uno homogéneo. En la Tabla 3.VIII se muestran diferentes valores de velocidad de ataque de dos tipos de grabadores (SiOEtch y HF 49%) determinados en nuestro instituto para diferentes tipos de óxido. Dado que los ataques laterales que habían de hacerse eran muy largos, $>1\ \text{mm}$, se escogió el

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

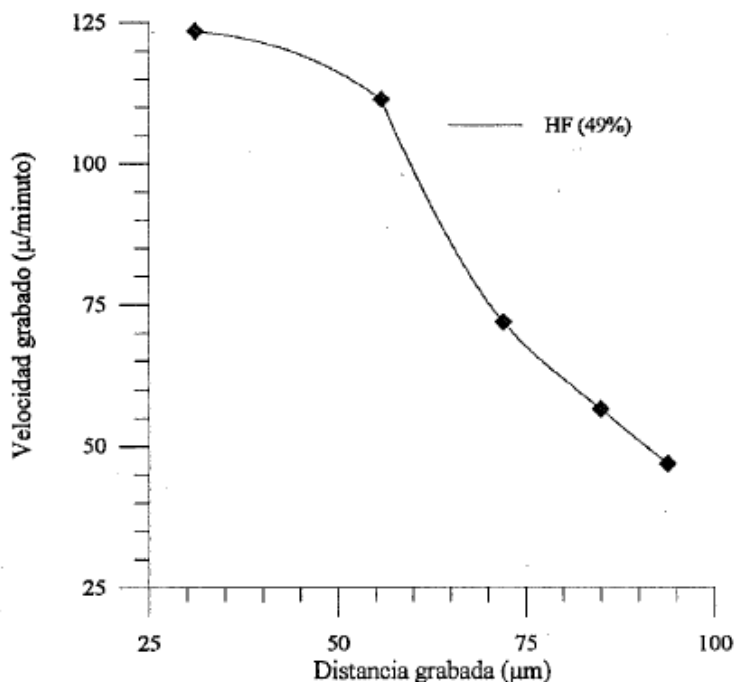
óxido de silicio PSG más dopado como capa sacrificial, por lo tanto, con mayor velocidad de ataque y como grabador el HF 49%.

Tabla 3.VIII: Velocidades de ataque de diferentes grabadores determinadas en el IMB para diferentes tipos de óxidos [8].

Tipo de óxido de silicio	Velocidad de ataque ($\mu\text{m}/\text{min}$)	
	SiOEtch	HF 49%
Térmico	0.07	1.35
Pyrox	0.12	2.50
PSG (3.75%)	0.24	>25*
PSG (7.5%)	0.45	>90*

*Debido a la elevada velocidad del grabador es difícil cuantificarla con precisión.

Los valores mostrados en la Tabla 3.VIII son para ataques de una superficie de óxido de silicio totalmente expuesta al grabador. En cambio, en el caso de las micro/nanopipetas, la superficie de óxido de silicio sería de difícil acceso porque estaba totalmente envuelta por el polisilicio. Es sabido que la deposición de polisilicio produce una densificación de la capa de óxido de silicio que hace disminuir las velocidades de ataque [8]. La Gráfica 3.1 muestra el resultado de un estudio previo realizado en el IMB-CNM para sobreataques laterales de óxido de silicio PSG [8]. Se puede observar como la velocidad media del grabado realizado a una capa de óxido de silicio PSG, situada debajo de una capa de polisilicio, disminuye drásticamente cuando se alcanzan las 50 μm de sobreataque lateral. Por todos estos motivos el comportamiento del reactivo dentro del microcanal resultaba poco predecible y había que realizar un estudio para intentar comprenderlo.



Gráfica 3.1: Velocidad media del grabado del óxido de silicio PSG 7.5% en función del sobreaque lateral para ataques con HF 49%. Velocidades determinadas con estructuras de test en el IMB-CNM [8].

Como se ha comentado con anterioridad, las velocidades de ataque lateral dependen de las dimensiones de los canales a grabar. Por este motivo, se caracterizó el ataque en nuestras estructuras.

Para realizar este estudio, las muestras fueron sumergidas en una solución de ácido fluorhídrico 49% y después se aclararon en agua. El tiempo de ataque dependía de la muestra, de su forma, del grosor de la punta y de las aberturas realizadas en la capa de polisilicio (en la cavidad de entrada, en la punta o en ambos). Para una muestra con abertura en la cavidad de entrada del depósito y en la punta, el tiempo de ataque era aproximadamente de dos horas y media. En cambio, si la muestra estaba abierta solamente por la cavidad o por la punta, el tiempo de ataque podía aumentar hasta llegar a las 7h. El tiempo de grabado era más del doble porque la velocidad de ataque disminuía debido a la falta de renovación de reactivo nuevo en el frente de grabado. El intercambio entre reactivo nuevo y los subproductos de la reacción era cada vez más lenta por problemas de difusión, aumentaba la distancia entre el frente de reacción y los orificios abiertos en la capa de polisilicio.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

Uno de los problemas fue intentar seguir la evolución del grabado, si se atacaba la capa de óxido de silicio o si se había llegado al final del ataque, porque no se podía ver a través de la capa de polisilicio con el microscopio óptico. Finalmente utilizando un microscopio de interferencias se consiguió ver como progresaba el ataque. El microscopio de interferencias muestra máximos y mínimos de diferentes planos a la misma altura. De esta manera, cuando todavía quedaba capa de óxido de silicio debajo, el polisilicio se veía plano. Sucedió todo lo contrario cuando ya se había grabado la capa de óxido, la ausencia de esta capa hacía que se doblara un poco el polisilicio y aparecieran los contrastes. El grabado del canal de las muestras se siguió con un microscopio de interferencias, donde se observó una clara diferencia entre la zona atacada y la no atacada, tal y como se muestra en Figura 3.33. No se observó daño estructural en la capa de polisilicio que había resistido las horas de ataque en HF ni fenómeno de *sticking*.

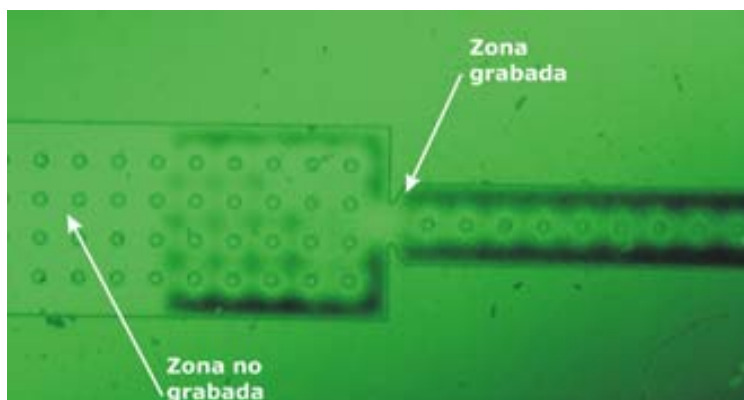


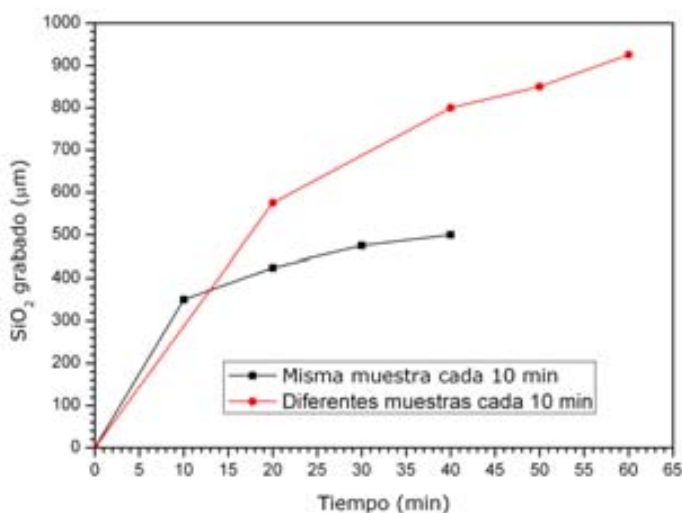
Figura 3.33: Imagen obtenida en un microscopio de interferencias de un fragmento del canal de una micro/nanopipeta con una zona de la capa sacrificial de óxido de silicio grabada y otra zona donde debajo del polisilicio todavía se encuentra la capa de óxido.

3.3.3.5.1 Grabado en HF sin agitación

Se diseñaron diferentes experimentos para estudiar la evolución del grabado de la capa sacrificial dentro del microcanal utilizando micro/nanopipetas con la apertura de la capa de polisilicio realizada únicamente en la punta. En el primero la muestra se sumergió durante 10 min en HF 49%. Pasado este tiempo se extraía el chip, se aclaraba en agua, se secaba, se inspeccionaba en un microscopio de interferencias y se volvía a sumergir en HF durante 10 min más. Este proceso se repitió hasta alcanzar los 60 min.

Para el segundo experimento se seleccionaron diferentes muestras con la misma forma y dimensiones, se sumergieron en HF 49%, se sacaron del reactivo pasados 10, 20, 30 y 40 min, se aclararon en agua, se secaron, pero en este caso no se volvieron a sumergir en HF después de inspeccionarlas en el microscopio de interferencias.

La Gráfica 3.2 muestra los resultados obtenidos para estos dos experimentos realizados. En ella se han representado la distancia de la capa sacrificial grabada en función del tiempo. Se puede observar como para la muestra que se sacaba cada 10 min del reactivo y después se volvía a sumergir en HF esta distancia es cada vez más pequeña hasta prácticamente pararse el grabado. Esto podría ser debido al aire que entraba dentro del canal al sacar la muestra del líquido. Llegaría un momento donde el HF no podría desplazar este aire para continuar con el grabado.

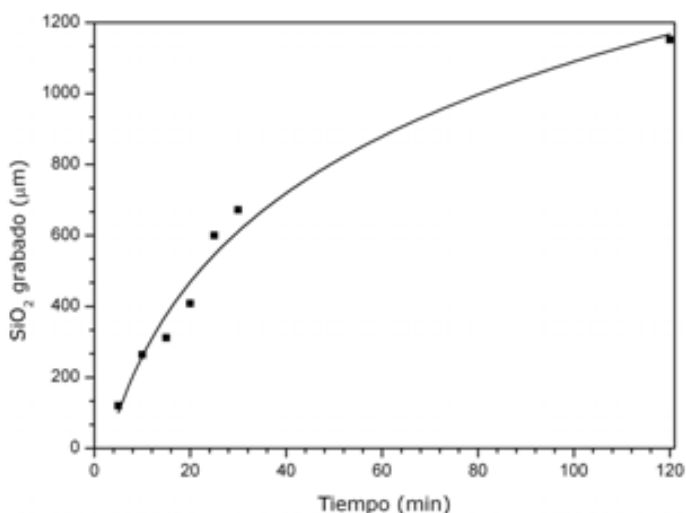


Gráfica 3.2: Representación de la distancia de la capa de óxido grabada lateralmente en HF 49% en función del tiempo para una misma muestra sumergida en intervalos de 10 min y para muestras diferentes extraídas del reactivo cada 10 min.

Se realizó un tercer experimento para estudiar en detalle el comportamiento del grabado en los primeros 30 minutos. Éste consistió en sumergir 7 muestras con la misma forma y mismas dimensiones en HF. Se sacaron seis de estos chips cada 5 minutos hasta que se llegó a la media hora. El séptimo se sacó al cabo de dos horas para poder ver como se comportaba la reacción cerca del final del grabado de todo el canal de óxido de silicio.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

Los resultados obtenidos se muestran en la Gráfica 3.3 donde se ha representado la distancia grabada del canal en función del tiempo. Se puede observar en ella como el ataque no fue lineal en el tiempo. Cerca de la abertura de la punta era más rápido y a medida que el grabado se adentraba en el canal disminuía la velocidad de ataque. El reactivo tendría acceso a la capa sacrificial únicamente por los orificios perforados en la capa estructural, por lo tanto sólo el frente de la solución estaría en contacto con la superficie y debido a problemas de renovación de reactivo, la velocidad del grabado disminuiría [20]. A medida que se fuera produciendo el grabado, la distancia del frente de reacción a las aperturas realizadas en el polisilicio sería mayor y el intercambio de los subproductos de reacción por reactivo nuevo sería más lento como consecuencia de los problemas de difusión [21]. Esta disminución será más pronunciada en canales a grabar más estrechos y largos.



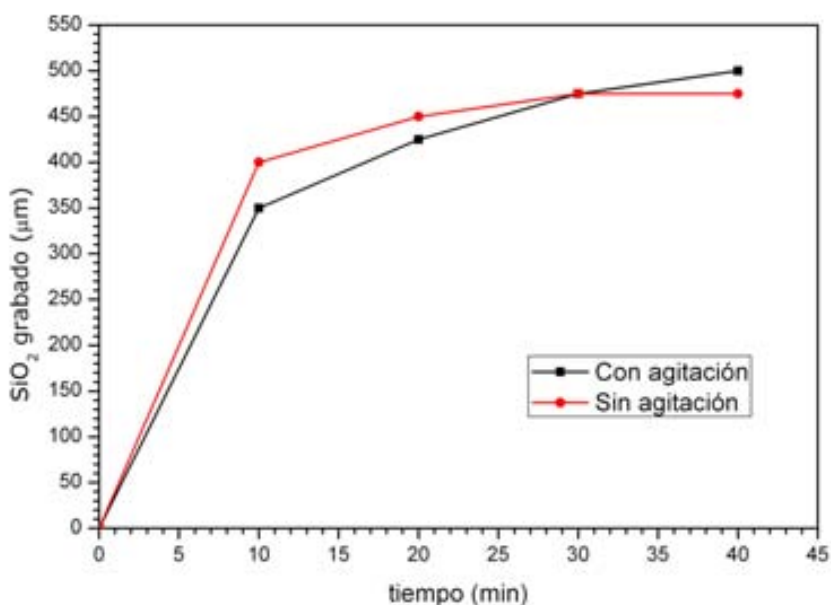
Gráfica 3.3: Representación de la distancia de óxido de silicio grabada en HF 49% desde el orificio abierto en el polisilicio de la punta en función del tiempo.

3.3.3.5.2 Grabado en HF con agitación orbital

El experimento realizado con un chip que se sumergía en HF durante un tiempo, se sacaba para inspeccionar la distancia en micras de óxido de silicio que se habían grabado y se volvía a sumergir en el ácido nos podía ayudar a conocer que pasaba durante el ataque de la capa sacrificial en una misma muestra.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

Por este motivo se intentó optimizar las condiciones del grabado y de esta manera poder llegar a estudiar el ataque entero utilizando un único chip. Para hacerlo se realizó un experimento utilizando agitación. Como las micro/nanopipetas tenían la punta en voladizo y eran frágiles no se podía utilizar ultrasonidos. En su lugar se optó por un agitador orbital que proporciona una agitación más suave. El resultado obtenido queda representado en la Gráfica 3.4 donde puede observarse que con la agitación orbital el ataque no mejoraba la llegada de reactivo nuevo al frente de reacción.



Gráfica 3.4: Representación de la distancia atacada de la capa de óxido de silicio en función del tiempo con agitación orbital y sin.

Aunque la capa de óxido de silicio se había atacado sin dificultad y se había podido verificar el ataque con un microscopio de interferencias. El hecho de introducir las muestras una a una en el reactivo hacía que este método resultara laborioso. Además, cuando se sumergía un chip había que ir con cuidado para no romper la punta que estaba al aire.

Por todo esto, esta etapa del grabado mejoraría si se hiciera a nivel de oblea, antes de separar los chips. Este será uno de los puntos a mejorar en el proceso de fabricación de la segunda generación de micro/nanopipetas.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

En este punto las micro/nanopipetas estaban fabricadas y preparadas para su caracterización, intentar conectarlas a algún equipo, introducir gas y/o líquido y comprobar que el canal había quedado abierto. La Figura 3.34 muestra imágenes SEM de un chip serrado con dimensiones $952 \times 3290 \mu\text{m}^2$ con una micro/nanopipeta totalmente fabricada. Sus medidas hacen que el chip se pueda acoplar fácilmente a un AFM. Sobre la imagen de la cara componentes del chip (Figura 3.34a) se han detallado los elementos que componen la micro/nanopipeta. El depósito y el brazo fabricados sobre el chip de silicio y la punta totalmente liberada en voladizo. La imagen de la cara dorso de la Figura 3.34b muestra la cavidad de entrada al microcanal.

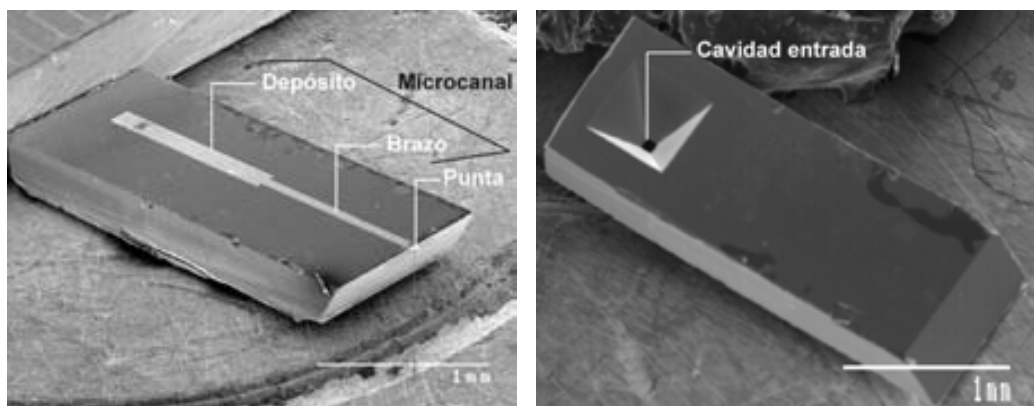


Figura 3.34: Imagen SEM de un chip serrado con una micropipeta una vez finalizado el proceso de fabricación, (a) cara componentes y (b) cara dorso.

3.3.4 Conexión fluido híbrido de micro a macro

Una vez acabado el proceso de fabricación había que realizar diferentes pruebas para realizar una caracterización preliminar del canal de la micro/nanopipeta. El conexionado de los dispositivos muchas veces se vuelve un problema en microfluídica porque implica pasar de dimensiones macro a micro [22, 23]. Los tubos de salida de los equipos suelen tener dimensiones mínimas de 1 o 2 mm mientras que la entrada al canal de la micro/nanopipeta tiene unas dimensiones de $500 \mu\text{m}$ en la superficie.

3.3.4.1 Conexión de los chips con tubos de teflón

Para realizar las conexiones se disponía de una variedad de tubos a utilizar. Para seleccionar el más adecuado, se realizaron una serie de pruebas centrando especial interés en observar como quedaba la superficie después de cortar el tubo con unas tijeras o con un cutter o si las paredes del tubo quedaban manchadas al pasar la tinta por ellos. Si la superficie del corte quedaba irregular o se deformada dificultaría el conexionado al chip, si el tubo quedaba manchado dificultaría el proceso de inspección. La Tabla 3.IX muestra los resultados obtenidos para los tipos de tubo de los que se disponía en el IMB-CNM.

Tabla 3.IX: Resultado del estudio realizado con diferentes tubos de conexión dependiendo del material en el que estaban fabricados, el diámetro externo (\varnothing_{ext}), el diámetro interno (\varnothing_{int}), el tipo de corte realizado y las pruebas con líquido.

Material	\varnothing_{ext} (mm)	\varnothing_{int} (mm)	Corte		Tinta
			Tijeras	Cutter	
Teflón	1.6	0.8	✓	✓	No mancha
Teflón	1.6	0.5	✓	✓	No mancha
Teflón	1.6	<0.1	✓	✓	No mancha
Nylon	1.3	1	✓	~	Mancha
Nylon entrecruzado	1.3	1	✓	~	Mancha
Poliimida	0.96	0.91	✓	~	No mancha

Se escogieron los tubos de teflón con diámetro externo de 1.6 mm y diámetros internos de 0.5 mm y 0.8 mm porque por dimensiones eran más fácil de alinear con la cavidad de entrada del depósito. El tubo de teflón se enganchó con loctite, adhesivo de secado rápido, sobre la superficie de la cavidad de entrada del chip situada en la cara dorso, se dejó secar y se aplicó araldite, adhesivo epoxy de dos fases, para sellar completamente la conexión. El resultado final se puede observar en la Figura 3.35 donde se muestra un chip conectado a un tubo de teflón y un dibujo esquemático para una mejor comprensión.

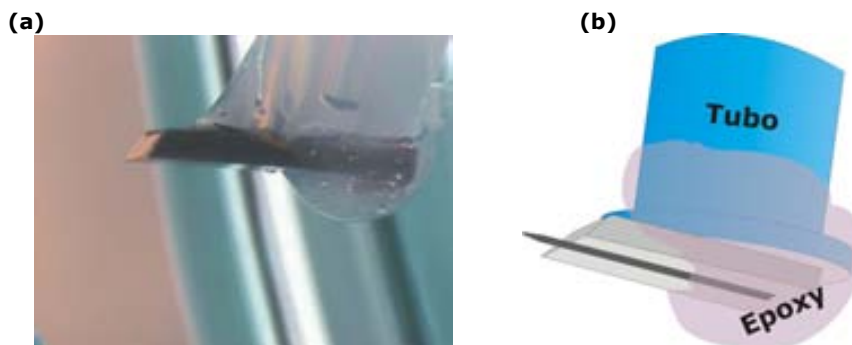


Figura 3.35: (a) Imagen de un chip pegado a un tubo de teflón con loctite y araldite y (b) dibujo del chip enganchado al tubo de teflón.

Las primeras pruebas se realizaron con Nitrógeno, pero al no conseguir que el gas entrara en el canal de la micropipeta, se optó por escoger un gas de menor tamaño molecular y mayor constante de difusión como es el Helio. Pero el resultado que se obtuvo fue el mismo, aparición de fugas porque no se había sellado bien la unión entre el tubo y el chip o la obturación de la cavidad de entrada al canal de la micro/nanopipeta porque entraba adhesivo en su interior.

También añadir que la inspección de los dispositivos una vez realizada la conexión en un microscopio óptico era dificultosa porque el chip no quedaba completamente plano cosa que dificultaba su enfoque, añadir que no se podía inspeccionar la micro/nanopipeta con demasiados aumentos porque el tubo de teflón chocaba con el objetivo de mayor aumento.

3.3.4.2 Conexión de los chips con dispositivos de LTCC

Las pruebas realizadas con los chips conectados directamente a los tubos mostró la necesidad de fabricar una estructura meso, es decir, de escala intermedia para realizar la conexión entre el mundo macro de los equipos y el mundo micro de los chips. Es por ello que se diseñaron unos dispositivos fabricados con cerámicas verdes para facilitar la conexión entre los tubos de teflón y los chips de silicio. Las Low Temperature Cofired Ceramic (LTCC) son unas cerámicas verdes que se utilizan como alternativa a la fabricación en silicio. Su estructura en láminas permite fabricar dispositivos microfluídicos de manera sencilla y se pueden utilizar para aplicaciones médicas, biológicas y/o ambientales [24].

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

Los dispositivos de LTCC ofrecían la posibilidad de realizar unos orificios de entrada más grandes para conectar con facilidad los tubos de teflón y unos orificios de salida más pequeños que conectarán la cavidad de entrada de las micro/nanopipetas. Estos dispositivos fueron fabricados con la colaboración del Grupo de Sensores y Biosensores de la UAB. En la Figura 3.36 se puede observar una sección transversal del dispositivo conectado (a) y los dibujos utilizados como máscara para definir los canales y los orificios de entrada y salida en el LTCC (b). Cada rectángulo de la Figura 3.36 (b) corresponde a una lámina de LTCC. Para facilitar el proceso de adhesión del chip al dispositivo en LTCC se utilizaron chips serrados con cuatro micro/nanopipetas (2x2). Al serrarlos de esta manera la superficie de la cara dorso había quedado más limpia; por lo tanto, la superficie del chip estaría totalmente en contacto con la superficie fabricada en LTCC. Las piezas en LTCC fueron diseñadas para ser alineadas con 2 de las micro/nanopipetas de estos chips.

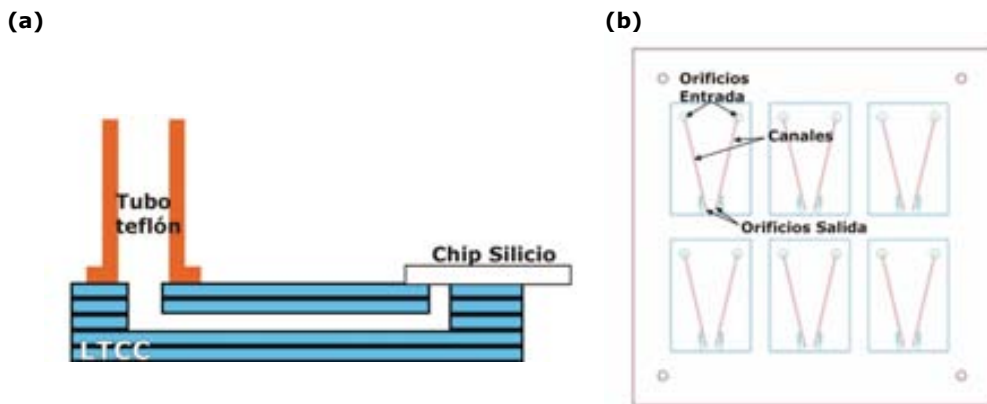


Figura 3.36: (a) Sección transversal de la muestra formada por el dispositivo de LTCC y el chip de silicio con las micro/nanopipetas y (b) máscara utilizada para definir los canales sobre los dispositivos LTCC.

Se inició el proceso de fabricación de los dispositivos de LTCC laminando dos capas de cerámica verde. La laminación es un proceso de termocompresión que consiste en aplicar una presión variable (que oscila entre 1000 y 5000 psi) a 100°C sobre las capas de cerámica a laminar. El tiempo de la laminación también es variable y depende de la estructura de las capas. Si son complejas conviene laminar poco tiempo para evitar deformaciones de la geometría, normalmente de 1.5 a 2 minutos.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

Después de este proceso, a pesar de no tener todavía un bloque de cerámica sólido, las láminas de cerámica no se pueden separar porque se ha empezado a evaporar parte del disolvente.

Una vez laminadas estas capas se mecanizaron con una broca controlada mediante la CNC (*Computer Numerically Controlled*). Primero se hicieron los canales en dos capas utilizando la broca de 1 mm de diámetro. A continuación se laminaron 3 capas donde se mecanizaron los orificios de entrada con una broca de 2mm de diámetro y los orificios de salida con una fresa de 400 μm . Los tubos de teflón se conectarían a los orificios grandes, mientras que el chip de silicio iría en los pequeños. Después se colocaron las láminas entre dos prensas tal y como se muestra en Figura 3.37.

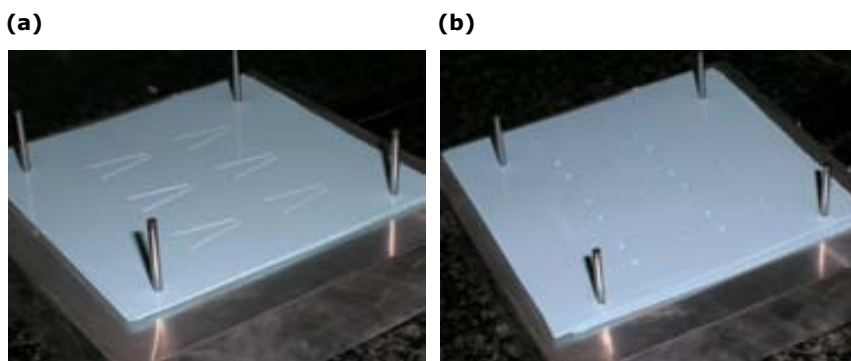


Figura 3.37: Imagen de las láminas de LTCC sobre una de las prensas, (a) láminas mecanizadas con los canales y (b) láminas con los agujeros.

Primero se pusieron las láminas mecanizadas con los canales y después se cubrieron con las láminas que contenían los orificios de entrada y de salida. Se añadió una capa de agua con glucosa entre las láminas, esta solución permite laminar con menos presión, cosa que evita que se dañen o se chafen los canales internos. Finalmente los dispositivos fueron cortados con la CNC y fueron sinterizados. Los dispositivos finales se muestran en la Figura 3.38. El proceso de sinterización consiste en dos rampas de temperatura de 10°C/min y 2 mesetas de 30 min a 350 y 850°C [25]. El problema que surgió en este caso fue el de la alineación entre el orificio de salida de los dispositivos en LTCC con la cavidad de entrada de la micro/nanopipeta. Se solucionó realizando unas marcas que facilitaron el proceso de alineamiento entre el dispositivo en LTCC y el chip de silicio con la micro/nanopipeta.

Comentar que este tipo de conexión facilitó la posterior inspección del chip en un microscopio óptico porque alejaba el tubo de teflón de la zona del carro con los objetivos.

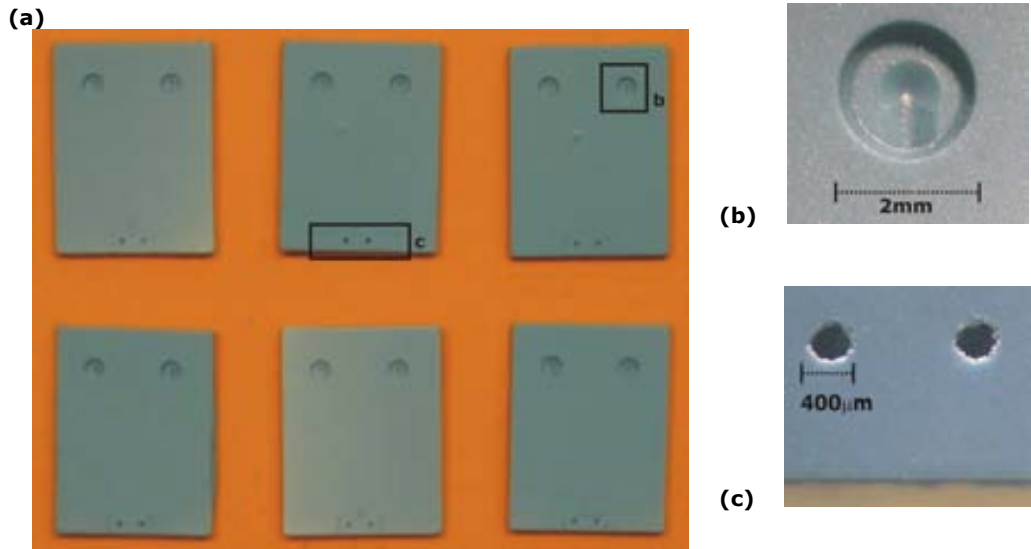


Figura 3.38: Imagen de (a) 6 dispositivos de LTCC, (b) imagen ampliada del orificio de entrada al LTCC (\varnothing 2 mm) y (c) de salida (\varnothing 400 μ m) con los motivos de alineamiento para el chip de silicio con las dos micro/nanopipetas.

Para alinear los dados con el LTCC se diseñaron unos motivos de alineamiento especiales, una imagen de estos motivos se enseña en la Figura 3.39 (a), la cavidad de entrada al depósito del chip tiene que quedar sobre los orificios de salida del dispositivo fabricado en LTCC como se muestra en el dibujo de la Figura 3.39 (b). En la Figura 3.39 (c) se puede observar el dado de silicio con la cara dorso hacia arriba para mostrar como se alineó con el dispositivo de LTCC. Se dio la vuelta al dado y se enganchó con loctite. Por último se puso araldite para sellar la conexión, el resultado final se muestra en la fotografía de la Figura 3.39 (d).

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

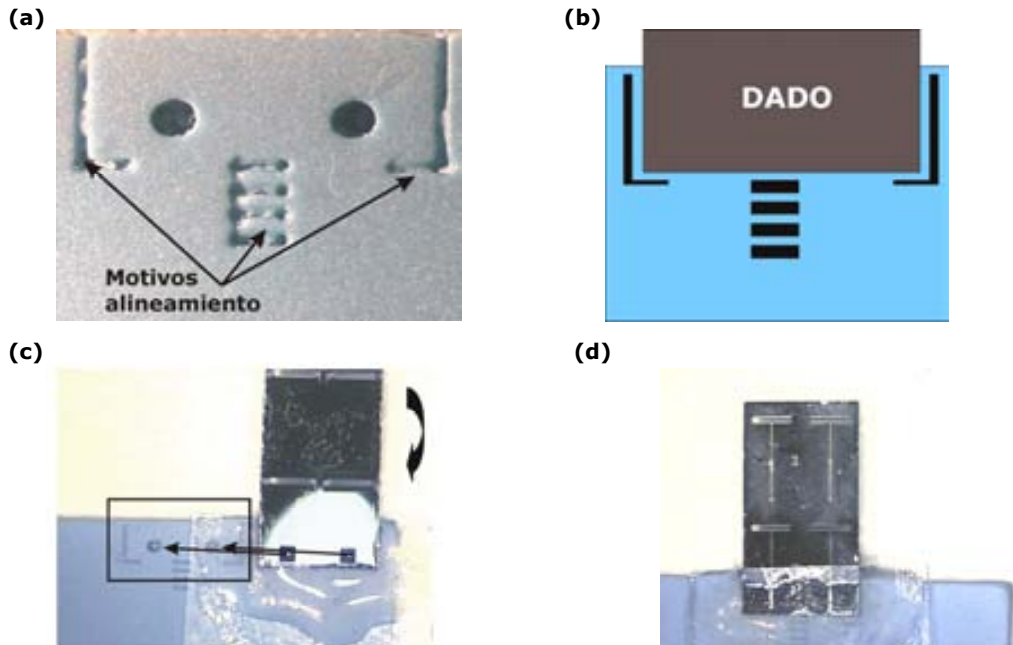


Figura 3.39: (a) Fotografía de los motivos de alineamiento definidos en el dispositivo LTCC, (b) esquema de los motivos y el dado de silicio alineados, (c) fotografía del alineamiento entre el dispositivo LTCC y el dado de silicio y (d) dado alineado y unido al LTCC.

Los tubos de teflón se conectaron al LTCC de la misma manera que se había enganchado al chip de silicio en el apartado anterior, primero se utilizó loctite y cuando éste estuvo seco, se aplicó epoxy-araldite para sellar la conexión. El resultado final se muestra en la imagen de la Figura 3.40 donde se puede comprobar que el LTCC facilita el trabajo de inspección porque ha aumentado la distancia entre el tubo de teflón y el dado de silicio.

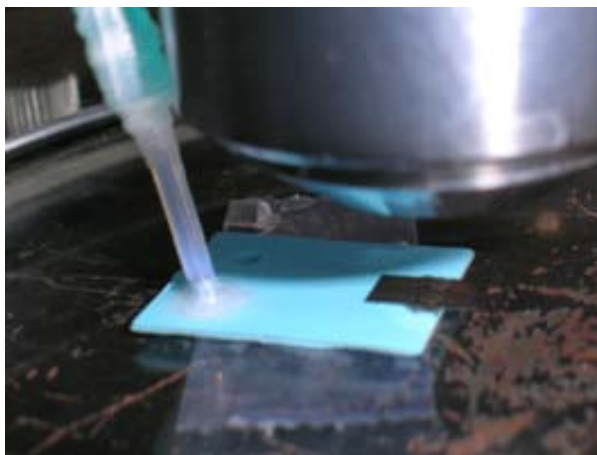
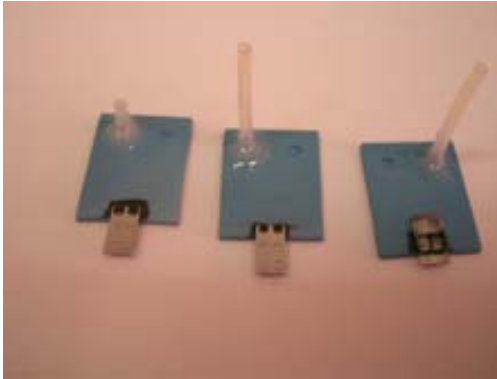


Figura 3.40: Imagen de un dispositivo acabado y preparado para su inspección en un microscopio óptico.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

Para trabajar con disolventes, como por ejemplo el etanol durante un largo periodo de tiempo, se comprobó que el adhesivo utilizado se reblandecía y se acababa rompiendo. Por este motivo se creyó conveniente utilizar un adhesivo epoxy resistente a los disolventes (EPO-TEK H70E-2) para conectar el dado con el dispositivo LTCC. Se colocó EPO-TEK alrededor de los orificios de salida del LTCC, de esta manera nos asegurábamos que quedaría cerrada herméticamente la unión entre el dado de silicio y el dispositivo LTCC. Este epoxy se curó con temperatura, entre 90°C y 120°C, durante 1h. En la Figura 3.41 (a) se muestra una imagen de tres dados de silicio conectados al dispositivo LTCC con epoxy. También se comprobó que el teflón tenía mala adherencia con el LTCC utilizando adhesivos epoxys, por este motivo se cambiaron por conectores de latón. La Figura 3.41 (b) muestra una fotografía de estos nuevos conectores utilizados.

(a)



(b)

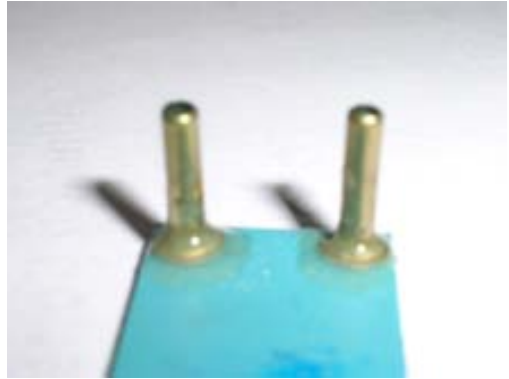


Figura 3.41: Imagen de 3 dispositivos conectados con EPO-TEK y preparados para su caracterización (a) y muestra de dos conectores de latón unidos al LTCC (b)

Los dispositivos meso fabricados en LTCC permitieron conectar los dados que contenían las micro/nanopipetas con los equipos de medida, además facilitaron la inspección de los dispositivos ya que quedaban totalmente planos debajo del objetivo y los tubos de conexión no chocaban con el carro de objetivos.

3.3.4.3 Conexión de los chips con dispositivos de metacrilato

Como se ha explicado en el apartado anterior, los dispositivos LTCC facilitaron la conexión del chip de silicio con los tubos de teflón y/o los conectores de latón. También facilitaron el trabajo de inspección del chip bajo el microscopio óptico. Intentar observar a través de las láminas de cerámica de LTCC era difícil debido a que no eran transparentes. Por este motivo se pensó en fabricar un dispositivo intermedio que sirviera para conectar los chips con las micro/nanopipetas con el mundo macro y que fuera transparente. La solución se encontró utilizando metacrilato (nombre común para el polimetilmetacrilato presentado en láminas) para fabricar estos dispositivos. Este material es característico por su transparencia, por sus buenas propiedades mecánicas, excelente aislante térmico, fácil de mecanizar y de pulir. Estas características hacen que sea utilizado en la industria del automóvil, iluminación, cosméticos, espectáculos, construcción y óptica, entre muchas otras. También es utilizado en medicina, por ejemplo, para la fabricación de prótesis óseas y dentales. Se utilizaron dos láminas de metacrilato de 3 mm de grosor. En una de las láminas se mecanizaron los canales y en la otra los orificios de entrada y salida de los canales. Estas láminas se mecanizaron utilizando una fresadora siguiendo un patrón.

La Figura 3.42a muestra el patrón utilizado para fabricar el primer dispositivo de metacrilato. Las dos láminas de metacrilato se alinearon y se pegaron con metacrilato líquido. El metacrilato líquido se introdujo por capilaridad entre las dos superficies de metacrilato en lámina. Después las dos láminas se pusieron sobre una placa calefactora a 80°C durante 30 min, de esta manera las dos láminas quedaron selladas. La Figura 3.42b muestra una imagen del dispositivo final. En este diseño el chip de silicio quedaba totalmente anclado en una cavidad mecanizada en el metacrilato. El problema encontrado fue que al introducir el chip en la cavidad, la punta de la micro/nanopipeta que estaba al aire podía romperse si tocaba las paredes de metacrilato. Por este motivo se diseñó un segundo dispositivo en metacrilato donde se solucionaba este problema.

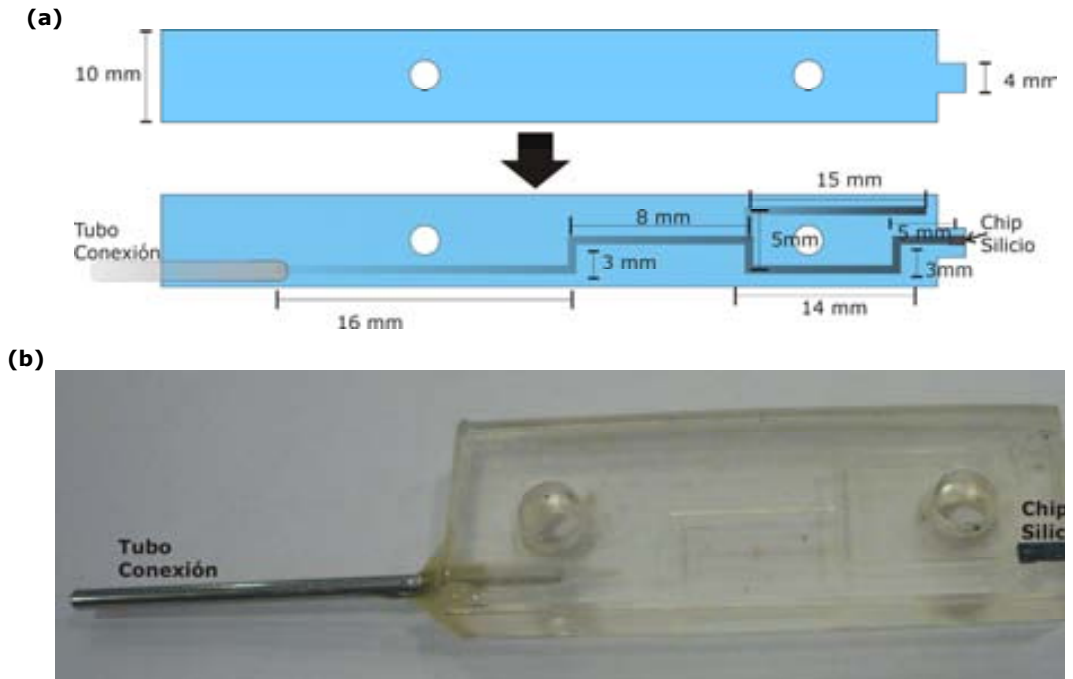


Figura 3.42: (a) Patrón seguido para mecanizar la lámina de metacrilato con los canales y la lámina que los cubriría y (b) dispositivo de microfluídica fabricado en metacrilato

El patrón seguido para fabricar este segundo dispositivo se muestra en la Figura 3.43a. Este dispositivo en lugar de fijar la unión entre las láminas con metacrilato líquido ofrecía la posibilidad de intercambiar las láminas porque se fijaban y unían con la ayuda de dos tornillos. Al tener las diferentes láminas de metacrilatos móviles e intercambiables, ofrecía la posibilidad de tener varias pipetas encapsuladas en una lámina de metacrilato y poder hacer varias pruebas cambiando únicamente la lámina superior del dispositivo en metacrilato, es decir, la que contenía el chip de silicio. Para evitar fugas, la lámina intermedia incorporaba una junta fabricada en PDMS. Con estos dispositivos fabricados en metacrilato al ser transparentes, se solucionó el problema encontrado con los dispositivos fabricados en LTCC. Se observaba con facilidad el canal fabricado en el metacrilato y como el líquido llenaba el canal hasta llegar a la cavidad de entrada de la micropipeta.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

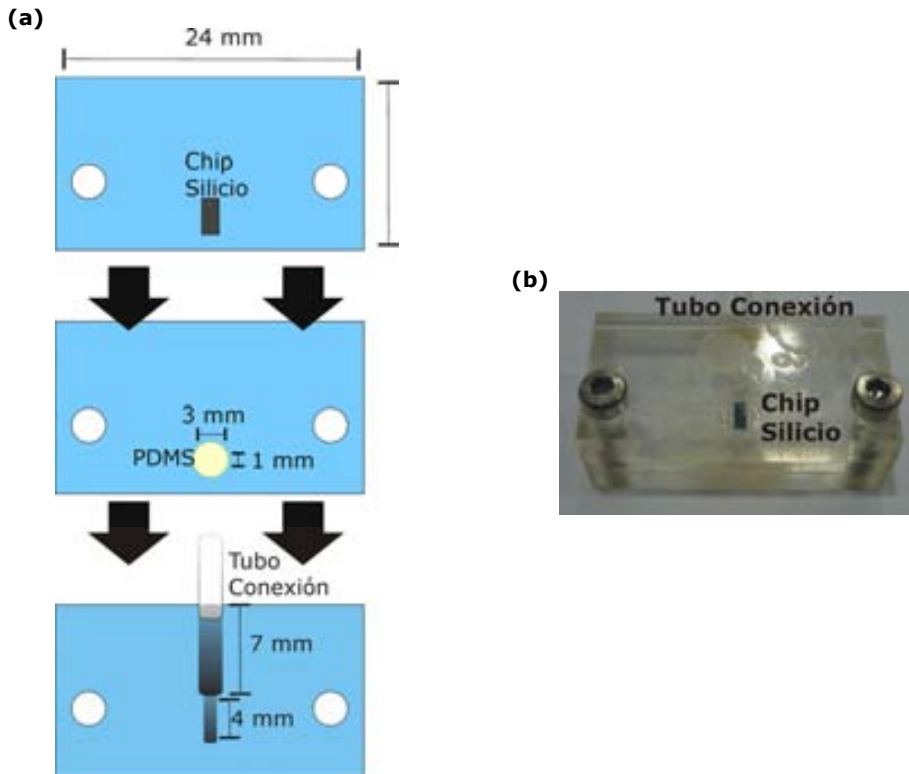


Figura 3.43: (a) Patrón seguido para mecanizar la lámina de metacrilato con los canales, la lámina con la junta de PDMS y la lámina donde encajar el chip de silicio, (b) imagen óptica del segundo dispositivo de microfluídica fabricado en metacrilato para realizar la conexión de los chips.

Con los dispositivos fabricados en metacrilato se facilitó la conexión de los chips con los equipos de medida, además de facilitar la inspección al tratarse de un material transparente, pero su fabricación suponía un trabajo adicional en el proceso de fabricación además de demostrar que el conexionado entre el mundo micro y macro era difícil. En un diseño futuro había que intentar mejorar el conexionado de las micro/nanopipetas con los equipos de medida.

3.4 Caracterización y aplicaciones de las micropipetas

Una vez realizadas las conexiones de las micropipetas, había que comprobar que el canal había quedado abierto, sin obstrucciones y que el líquido entraba en su interior. Una vez realizada esta comprobación y si el canal estaba abierto se utilizarían las micro/nanopipetas fabricadas para la funcionalización de una superficie.

3.4.1 Comprobación apertura canal

La obertura del canal en la punta fue fácil de comprobar inspeccionando la muestra mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM) tal y como muestra la Figura 3.44.

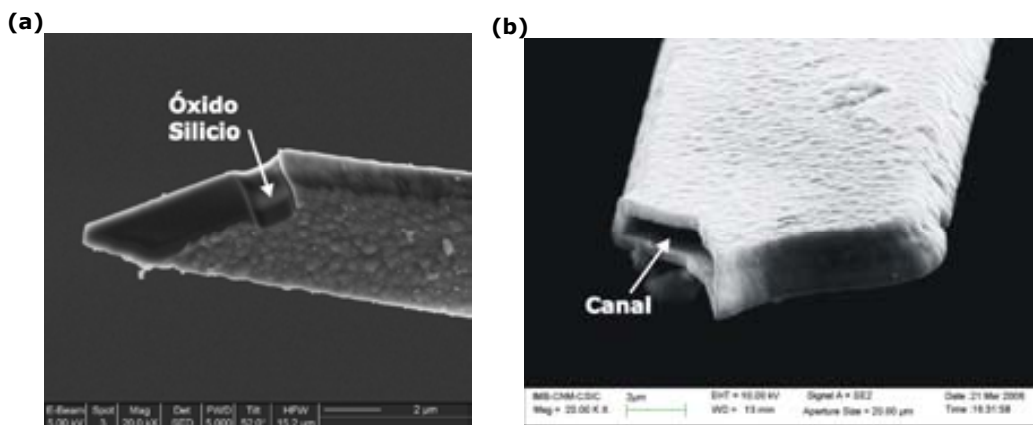


Figura 3.44: Imágenes SEM de una punta de una micropipeta (a) con la capa de óxido y (b) con el canal definido después del ataque de dicha capa. (Apertura de la punta mediante ruptura controlada).

Para comprobar si todo el canal había quedado abierto se pensó en introducir un líquido por capilaridad. Como no se sabía si la entrada del líquido se vería con facilidad a través de la pared de polisilicio, se optó por utilizar una tinta de color. En el caso de no poder ver a través del polisilicio, se podría romper esta pared y ver si el canal había quedado manchado del mismo color de la tinta.

La tinta utilizada tenía base acuosa y era de color azul. La micro/nanopipeta tenía acceso al canal por la punta y por la cavidad. Se depositó una gota con una aguja en uno de los extremos y se intentó inspeccionar debajo de un microscopio

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

óptico pero no se conseguía ver la tinta a través de la pared de polisilicio, por lo que se decidió romper la pared. Al hacerlo se pudo comprobar que la tinta había entrado al canal. En la Figura 3.45a se muestra la zona del canal próxima al depósito por donde se introdujo la tinta azul y en la Figura 3.45b una imagen de la zona de la micropipeta cercana a la punta. Después de romper la pared de polisilicio en esta zona se observó que había restos de tinta azul. Por lo que se podía concluir que los canales estaban abiertos y que la tinta había llenado el canal por capilaridad.

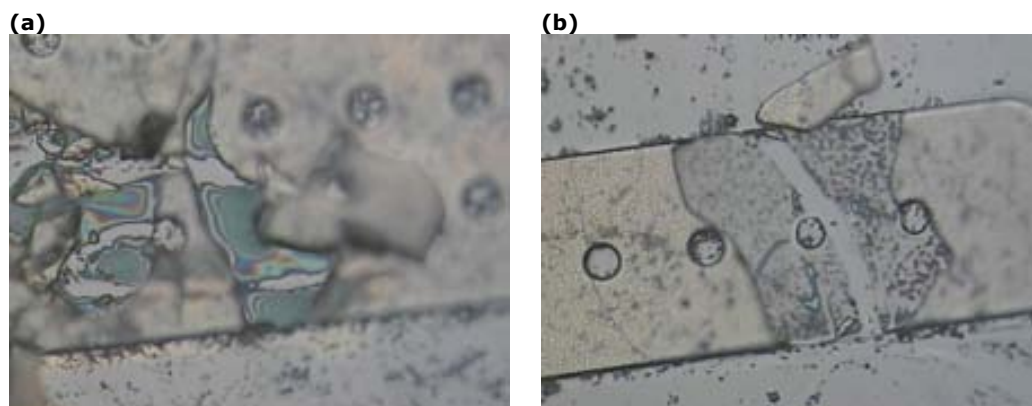


Figura 3.45: Imágenes de los extremos del canal de una micro/nanopipeta: (a) zona próxima a la cavidad por donde se puso la tinta azul y (b) zona próxima a la punta de la micro/nanopipeta donde la tinta azul había llegado por capilaridad.

3.4.2 Funcionalización (*micropattern*) con micropipetas

Una aplicación para los dispositivos fabricados es utilizarlos como herramienta para la funcionalización de superficies acoplando el dispositivo a un microscopio de fuerza atómica (AFM). La funcionalización de superficies consiste en enlazar covalentemente moléculas sobre una superficie a la que son afines. Como se ha comentado en el segundo capítulo de la memoria, 2. *Contextualización teórica*, hay grupos que funcionalizan superficies mediante técnica Dip-pen™ o Nanoplotter™. El primero carece de un flujo continuo de líquido hasta la punta y el segundo ofrece una solución a este problema además de la posibilidad de crear arrays, pero son canales descubiertos. Las micro/nanopipetas de la 1ª generación pueden ser utilizadas para funcionalizar superficies de manera controlada, además al tener los microcanales cubierto, ofrecen una menor evaporación del líquido. Dependiendo del diseño utilizado para la funcionalización se podrían fabricar arrays.

3.4.2.1 Funcionalización superficies de oro

Estas pruebas se realizaron gracias a la colaboración en el proyecto del Laboratorio de Nanobioingeniería (IBEC) del Parque Científico de Barcelona (PCB). La primera prueba utilizando la micro/nanopipeta como herramienta para funcionalizar una superficie se realizó con una punta triangular. La Figura 3.46a muestra una imagen SEM del tipo de punta utilizada. En ella se han acotado las medidas de la punta. La punta se sumergió durante 60 s en una solución de MHA (10 mM ácido 16-Mercaptohexadecanoico (Aldrich) en etanol) para llenar el microcanal por capilaridad desde la punta. A continuación se acopló el chip a un AFM y se realizaron manualmente dos aproximaciones de la micro/nanopipeta a la superficie de oro al aire y a temperatura ambiente. La punta se dejaba en contacto con la superficie durante 1 min. El SetPoint (SP) utilizado fue de 0.15 V. La micropipeta fue reemplazada por una punta rectangular de AFM comercial de 460 μm de largo (MikroMasch CSC17/AIBS, $K=0.15$ N/m) para escanear la superficie.

Todas las medidas se realizaron en modo contacto, medio aire, a temperatura ambiente y con un 30% de humedad relativa. El resultado del scan se muestra en el gráfico de fricción de la Figura 3.46b. Los puntos representan la monocapa formada sobre la superficie al unirse mediante enlaces covalentes el grupo tiol (radical $-\text{SH}$) existente en las moléculas de MHA con oro [26]. El azufre de este grupo funcional tiene gran afinidad por las superficies de oro. El proceso de quimiadsorción produce la ordenación de las moléculas de MHA creando una capa autoensamblada. La reducida longitud de las cadenas del MHA produce un contraste pobre en los gráficos de topografía de AFM. En su lugar, los gráficos de fricción muestran un contraste adecuado debido a la formación del enlace SH-Au.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

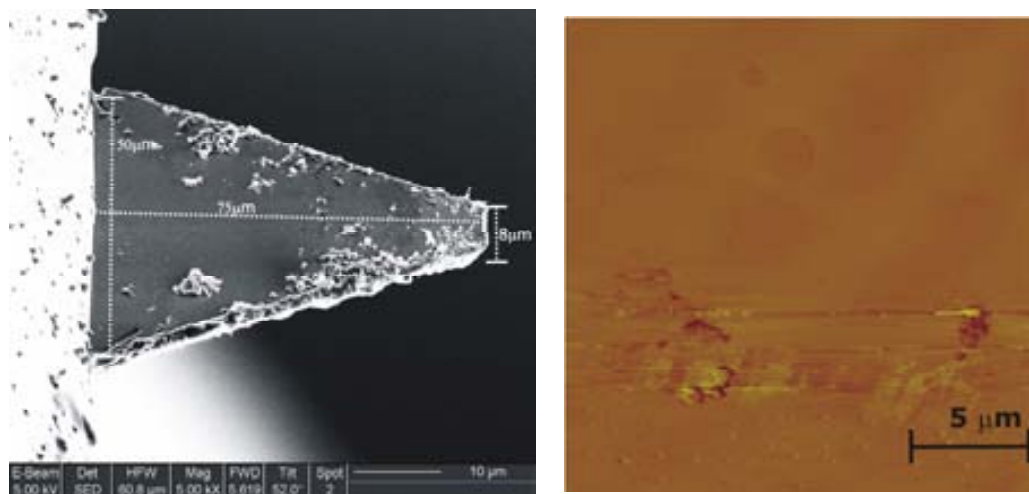


Figura 3.46: (a) Imagen SEM de una punta triangular y (b) gráfico de fricción de la superficie de oro funcionalizada con dicha punta

Observando detenidamente la punta parece que no queda limpia después de estar sumergida en la solución de MHA. Esta observación sugiere que puede que las monocapas observadas en el gráfico de fricción de la Figura 3.46b no fueran de la solución existente dentro del canal y por lo contrario fueran restos de solución depositados sobre la superficie de la punta. Se introdujo una etapa de limpieza sumergiendo la punta en etanol después del minuto en la solución MHA. Se repitió el experimento implementando esta etapa de limpieza. Se realizaron dos estampaciones con un tiempo de contacto de 1 min y $SP=0.15$ V. En el diagrama de fricción aparecieron dos spots regulares como muestra la Figura 3.47. La etapa de limpieza había mejorado el proceso de estampación.

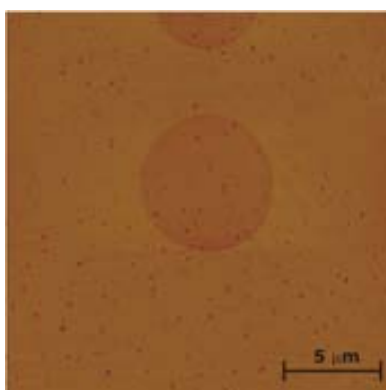


Figura 3.47: Gráfico de fricción de la superficie funcionalizada después de realizar dos aproximaciones con una punta triangular.

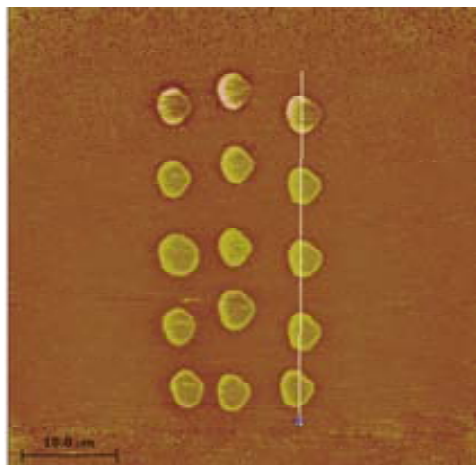
Se intentaron realizar experimentos con puntas rectas, pero era difícil el proceso de aproximación a la superficie de oro porque el diodo del AFM no detectaba esta punta con la intensidad necesaria para evitar su rotura cuando entrara en contacto con la superficie de oro. Al no ser detectada podría darse el caso de seguir bajando el stage del AFM cuando en realidad la punta ya estaría en contacto con la superficie de oro.

El experimento que si que se pudo realizar fue el de aumentar el número de aproximaciones a realizar sin rellenar el canal de la micro/nanopipeta. Para ello se sumergió durante 60 s. en una solución de MHA una micropipeta con una punta triangular de 5 μm . En esta ocasión, la funcionalización se realizó manteniendo la micropipeta en contacto con la superficie de oro durante 10 s para que se depositara la tinta, este procedimiento se repitió varias veces. Los parámetros utilizados fueron de $SP=0.2\text{ V}$, en modo contacto al aire y a temperatura ambiente.

El gráfico de fricción obtenido con el escaneo de la superficie se muestra en la Figura 3.48a donde se pueden observar 15 puntos con un diámetro promedio de 4.1 ± 0.2 . Los quince spots se depositaron utilizando la solución que había dentro del canal de la micropipeta, no hizo falta rellenarlo con más MHA. Las formas no esféricas pueden ser debidas en parte a la forma del orificio de salida del canal. La Figura 3.48b muestra una representación de la sección vertical de los últimos 5 puntos. Los picos de los extremos muestran un aumento de la densidad de tioles debido a efectos de capilaridad [27]. Aumentando la anchura de la punta o disminuyendo el tiempo de contacto optimizarían la forma esférica de los spots.

Al no poder medir con exactitud la altura de la monocapa formada para poder calcular el volumen de la gota depositada, se aproximó este cálculo asumiendo que se depositaban gotas semiesféricas con un radio de 2 μm . Este valor se extrajo de las medidas mostradas en la Figura 3.48b. Bajo estas condiciones el volumen estimado de una gota era de 27 fl.

(a)



(b)

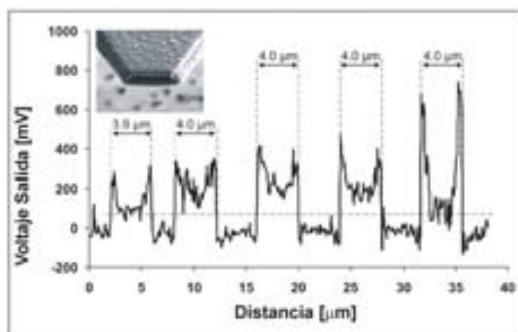


Figura 3.48: (a) Gráfico de fricción de la superficie de oro funcionalizada y (b) gráfico con el diámetro de los cinco últimos spots

3.4.2.2 Funcionalización de superficies en microarrays

La creación de microarrays de manera controlada es de gran importancia en biología. El uso de las micro/nanopipetas con un microcanal pero puntas múltiples ofrece la posibilidad de funcionalizar una superficie con el mismo reactivo y las micro/nanopipetas multipuntas abren la posibilidad de dispensar diferentes reactivos para crear un microarray con una superficie multifuncionalizada.

El primer experimento para crear un microarray se realizó utilizando una micropipeta acabada en cuatro puntas. La imagen SEM de la Figura 3.49a muestra la punta utilizada. Se mantuvieron los parámetros utilizados en los experimentos anteriores, el tiempo de contacto 60 s y el SP=0.15 V, pero se aumento el número de estampaciones a cuatro. Al escanear la zona con la punta del AFM se obtuvo el diagrama de fricción mostrado en la Figura 3.49b. Se podía observar que no todas las puntas habían entrado en contacto con la superficie. Por la distancia entre los spots se podía diferenciar con claridad que se habían producido dos de las cuatro estampaciones, donde en la primera estampación habían contactado tres de las cuatro puntas con la superficie, en la segunda sólo una y en el resto ninguna. La distancia entre los tres puntos coincidía con el ancho total del microcanal de 50μm.

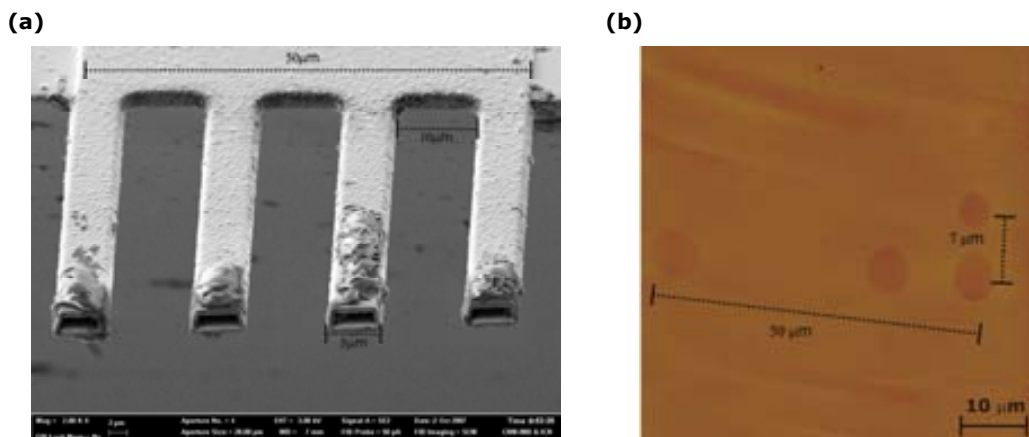


Figura 3.49: (a) Imagen SEM de cuatro puntas y (b) gráfico de fricción de la zona funcionalizada con dicha punta.

Para descartar que la no formación de spot sea debida a la rápida evaporación de la gota formada por MHA en etanol, se cambió el disolvente de la solución por acetonitrilo. Este disolvente es higroscópico y evitar el evaporamiento de la gota sobre la superficie. Se definió un patrón con seis spots en el software del AFM para controlar el desplazamiento realizado. Se realizaron dos pruebas diferentes variando el tiempo de contacto, en la primera es de 40 s y 10 s en la segunda. Después de realizar el barrido de la zona se obtuvieron los gráficos de fricción mostrados en la Figura 3.50. En esta ocasión se pudo observar como el disolvente no se evapora y el posterior barrido con la punta de AFM arrastra el disolvente por toda la superficie.

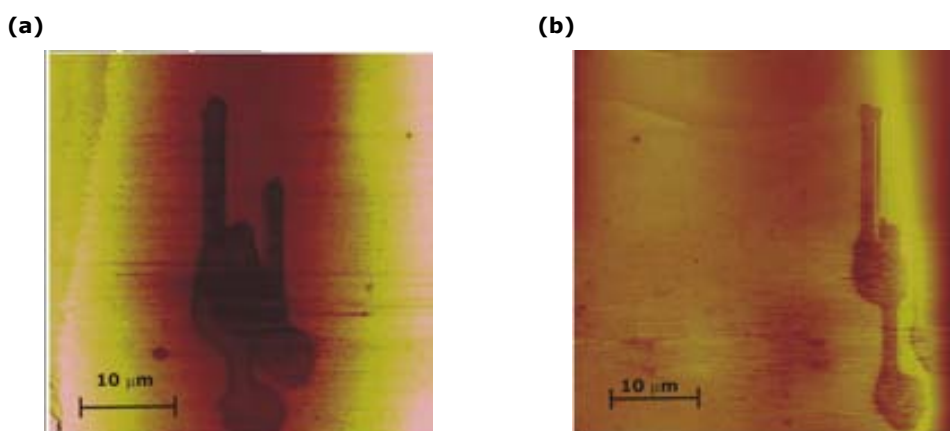


Figura 3.50: Imágenes de fricción de una superficie de oro funcionalizada con MHA en acetonitril con un tiempo de contacto de la punta de (a) 40s y (b) 10s

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

El cambio de disolvente no había sido una buena solución por lo que se descartó la posibilidad de utilizar MHA disuelto en acetonitril. Utilizando la solución de MHA en etanol se modificaron esta vez los parámetros de contacto de la punta sobre la superficie de oro. Se realizaron cuatro aproximaciones con un tiempo de contacto de 30 s. El SP se mantuvo en 0.20 V. Se realizó una quinta estampación con el mismo tiempo de contacto pero aumentando el SP a 0.25 V. La Figura 3.51 muestra el diagrama de fricción obtenido después de escanear la superficie con la punta de AFM. Se puede observar como el hecho de haber aumentado el SP hace aumentar el número de puntas que entran en contacto con la superficie de oro, logrando con 0.25 V que las cuatro puntas entren en contacto. Por el tamaño de los spots, se podría deducir que las puntas no entran en contacto de la misma manera sobre la superficie de oro.

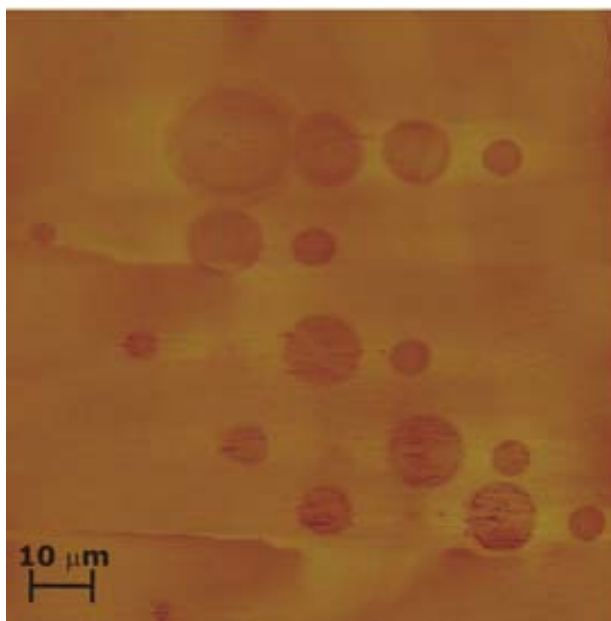
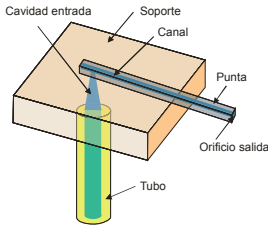


Figura 3.51: Gráfico de fricción de la superficie de oro funcionalizada utilizando una solución MHA:EtOH con una punta múltiple-4

3.5 Conclusiones

A continuación se expondrán las conclusiones que se pueden extraer de los resultados obtenidos y discutidos en este capítulo.



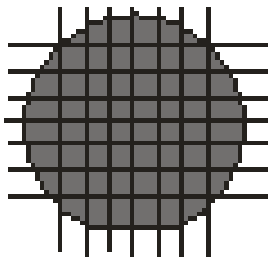
A partir de la idea inicial de fabricar un dispositivo que estuviera sobre un soporte y que se definiera por elementos como cavidad de entrada, microcanal, punta, orificio de salida y conexión:



✓ Se ha definido y desarrollado una tecnología para la fabricación de las micro/nanopipetas basada en la tecnología de microsistemas. Tomando como elemento de partida obleas de silicio que se han utilizado como sustrato, se ha depositado una capa sacrificial de óxido de silicio dopado y una capa estructural de polisilicio. La capa sacrificial ha definido la geometría y las dimensiones del canal de la micro/nanopipeta y la capa estructural ha recubierto todo el dispositivo formando las paredes del microcanal. Se han definido dos cavidades por la cara dorso de la oblea con un ataque anisotrópico en TMAH, una para actuar como cavidad de entrada y la otra para liberar la punta.

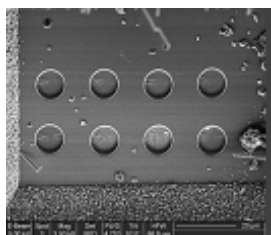


✓ Se han estudiado diferentes diseños para las puntas de las micro/nanopipetas, simples o múltiples, para poder estudiar la viabilidad en su fabricación.

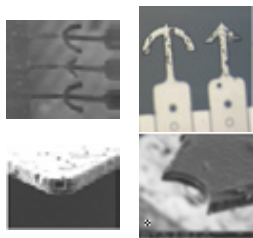


✓ Se ha evaluado el serrado de la oblea con y sin resina de protección para la obtención de los chips. Los mejores resultados se han obtenido serrando la oblea sin resina. A pesar de todo, el proceso de serrado no ha sido una buena opción para la obtención de los chips individuales porque no dejaba limpia su superficie. Esta etapa debería se optimizada en futuros diseños.

3. Micro/nanopipetas: Primera generación



- ✓ Se ha estudiado la apertura de la cavidad de entrada con diferentes métodos. El ataque localizado con TMAH no resultó ser una buena solución. La micro/nanomecanización con el FIB dio resultados excelentes con la posibilidad de crear filtros en la cavidad de entrada.

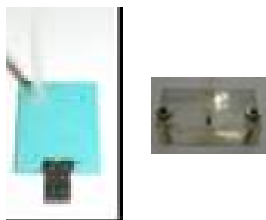


- ✓ Se ha estudiado la apertura de la punta mediante ruptura controlada y FIB. La ruptura controlada ha permitido realizar aperturas sin la necesidad de utilizar máscaras o procesos adicionales. La mecanización con el FIB ha permitido obtener orificios submicrométricos con la geometría deseada. Ejemplo de estas geometrías sería

la forma cóncava fabricada que podría sujetar una célula.

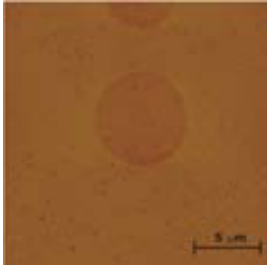


- ✓ Se ha estudiado el proceso de grabado del canal. Se escogió óxido PSG por la elevada velocidad de ataque que presenta en HF 49%. El ataque se siguió con éxito en un microscopio de interferencias. En este microscopio, se pudo observar que los puntos de anclaje diseñados para evitar el *sticking* habían funcionado.



- ✓ Se ha comprobado la dificultad de conectar los tubos a la cavidad de entrada. Este es un punto a mejorar en futuros diseños. Aunque se encontró una solución para la 1ª generación de micro/nanopipetas utilizando dispositivos fabricados en LTCC y en metacrilato. Con la ayuda de estos dispositivos, se han podido conectar los tubos las micro/nanopipetas fabricadas. El dispositivo en metacrilato al ser un material transparente, ha facilitado la inspección.

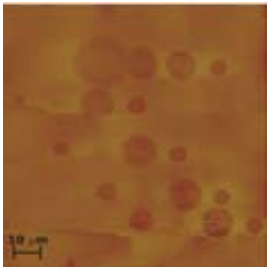
3. Micro/nanopipetas: Primera generación



- ✓ Se ha conseguido funcionalizar una superficie acoplado los dispositivos fabricados a un AFM. Se depositó de manera controlada una gota de la solución de MHA sobre una superficie de oro con una micropipeta con punta triangular. Estas gotas contenían grupos funcionales -SH que se han enlazaron covalentemente a la superficie de oro para formar una monocapa.



- ✓ Se ha conseguido depositar 15 gotas de la solución de MHA sobre una superficie de oro llenando por capilaridad el canal de la micropipeta una única vez. El volumen estimado para cada gota depositado era de 27fl.



- ✓ Utilizando una micropipeta acabada en cuatro puntas se ha conseguido depositar gotas de MHA sobre una superficie de oro creando un *microarray*.

3.6 Referencias

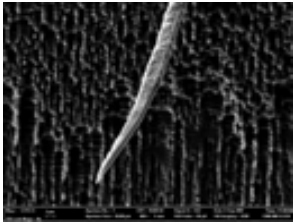
- [1] *Eppendorf*, Available from: <http://www.eppendorf.com/es/>.
- [2] *Hamilton Bonaduz Ag*, Available from: <http://www.hamiltoncomp.com/newdev/pipettes/pipettesindex.asp>.
- [3] Stoevesandt O, Elbs M, Kohler K, Lellouch AC, Fischer R, Andre T, and Brock R, *Peptide Microarrays for the Detection of Molecular Interactions in Cellular Signal Transduction*, *Proteomics*, 5, 2005, 2010-2017.
- [4] Angenendt P, Kreutzberger J, Glokler J, and Hoheisel JD, *Generation of High Density Protein Microarrays by Cell-Free in Situ Expression of Unpurified PCR Products*, *Molecular & Cellular Proteomics*, 5, 2006, 1658-1666.
- [5] Kumar A and Whitesides GM, *Features of Gold Having Micrometer to Centimeter Dimensions Can Be Formed through a Combination of Stamping with an Elastomeric Stamp and an Alkanethiol Ink Followed by Chemical Etching*, *Applied Physics Letters*, 63, 1993, 2002-2004.
- [6] Piner RD, Zhu J, Xu F, Hong SH, and Mirkin CA, *"Dip-Pen" Nanolithography*, *Science*, 283, 1999, 661-663.
- [7] Dougherty GM, Sands TD, and Pisano AP, *Microfabrication Using One-Step Lpcvd Porous Polysilicon Films*, *Journal of Microelectromechanical Systems*, 12, 2003, 418-424.
- [8] Benitez M, *Puesta a Punto De Una Tecnología De Micromecanización Superficial Y Su Aplicación a La Fabricación De Sensores Y Activadores*. PhD Thesis, Universidad Autónoma de Barcelona, 1996.
- [9] Glanville J, *Focused Ion-Beam Technology for Integrated-Circuit Modification*, *Solid State Technology*, 32, 1989, 270-272.
- [10] Melngailis J, *Focused Ion-Beam Technology and Applications*, *Journal of Vacuum Science & Technology B*, 5, 1987, 469-495.
- [11] Reyntjens S and Puers R, *A Review of Focused Ion Beam Applications in Microsystem Technology*, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 11, 2001, 287-300.
- [12] Brugger J, Beljakovic G, Despont M, Derooij N, and Vettiger P, *Silicon Micro/Nanomechanical Device Fabrication Based on Focused Ion Beam Surface Modification and Koh Etching*, *Microelectronic Engineering*, 35, 1997, 401-404.
- [13] Daniel JH and Moore DF, *A Microaccelerometer Structure Fabricated in Silicon-on-Insulator Using a Focused Ion Beam Process*, *Sensors and Actuators A: Physical* 73, 1999, 201- 209.
- [14] Reyntjens S and Puers R, *Focused Ion Beam Induced Deposition: Fabrication of Three-Dimensional Microstructures and Young's Modulus of the Deposited Material*, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 10, 2000, 181-188.
- [15] Ashurst WR, Yau C, Carraro C, Maboudian R, and Dugger M, *Dichlorodimethylsilane as an Anti-Stiction Monolayer for MemS: A*

3. Micro/nanopipetas: Primera generación

- Comparison to the Octadecyltrichlorosilane Self-Assembled Monolayer*, Journal of Microelectromechanical Systems, 10, 2001, 41-49.
- [16] Bong Hwan K, Bong Hwan K, Taek Dong C, Chang Hoon O, and Kukjin Chun Akc, *A New Organic Modifier for Anti-Stiction*, Journal of Microelectromechanical Systems, 10, 2001, 33-40.
- [17] Benitez M, Plaza J, Sheng S, and Esteve J, *A New Process for Releasing Micromechanical Structures in Surface Micromachining*, Journal of Micromechanics and Microengineering, 6, 1996, 36-38.
- [18] Svensson L, Plaza J, Benitez M, and Esteve J, *Surface Micromachining Technology Applied to the Fabrication of a FET Pressure Sensor*, Journal of Micromechanics and Microengineering, 6, 1996, 80-83.
- [19] Plaza J, Benitez M, Esteve J, and Lora-Tamayo E, *New FT Accelerometer Based on Surface Micromachining*, Sensors and Actuators A-Physical, 61, 1997, 342-345.
- [20] Monk DJ, Soane DS, and Howe RT, *Sacrificial Layer SiO₂ Wet Etching for Micromachining*, in *Solid-State Sensors and Actuators*, 1991. Digest of Technical Papers, TRANSDUCERS '91.
- [21] Liu J, Tai YC, Lee J, Pong KC, Zohar Y, and Ho Cm, *In Situ Monitoring and Universal Modelling of Sacrificial PSG*, in *Micro Electro Mechanical Systems*, 1993, MEMS '93, Proceedings 'An Investigation of Micro Structures, Sensors, Actuators, Machines and Systems'. IEEE.
- [22] Fredrickson CK and Fan ZH, *Macro-to-Micro Interfaces for Microfluidic Devices*, Lab on a Chip, 4, 2004, 526-533.
- [23] Szekeley L and Guttman A, *Simple Approaches to Close the Open Structure of Microfluidic Chips and Connecting Them to the Macro-World*, Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 841, 2006, 123-128.
- [24] Gongora-Rubio Pe-V MR, Sola-Laguna L and Santiago-Aviles JJ, *Overview of Low Temperature Co-Fired Ceramics Tape Technology for Meso-System Technology (MSST)*, Sensors & Actuators A, Physical, 89, 2001, 222 - 241.
- [25] Rubio M, Mendes Z; Ibañez N; Oliveira N, Jivaldo Do R, *Low Temperature and Pressure Lamination of LTCC Tapes for Meso-Systems.*, in IMAPS CONFERENCE AND EXHIBITION ON CERAMIC INTERCONNECT TECHNOLOGY, 2004. Denver.
- [26] Wilbur JL, Biebuyck HA, Macdonald JC, and Whitesides GM, *Scanning Force Microscopies Can Image Patterned Self-Assembled Monolayers*, Langmuir, 11, 1995, 825-831.
- [27] Deegan RD, Bakajin O, Dupont TF, Huber G, Nagel SR, and Witten Ta, *Capillary Flow as the Cause of Ring Stains from Dried Liquid Drops*, Nature, 389, 1997, 827-829.

4

Micro/nanopipetas:



Segunda generación

En este capítulo se discutirá la segunda tecnología desarrollada para la fabricación de las micro/nanopipetas, implementando mejoras para solucionar los problemas detectados durante el proceso de fabricación de la primera generación. También se explicará su utilización con embriones de ratón

4.1 Introducción

La fabricación de la segunda generación de micro/nanopipetas se enmarcó en el proyecto MINAHE II. El objetivo principal de este proyecto era el desarrollo de micro/nanoherramientas para su utilización con células vivas, por este motivo el desarrollo de la tecnología para la fabricación de las micro/nanopipetas de la segunda generación tenía que dirigirse hacia la fabricación de dispositivos para su aplicación en biología celular. Uno de los requisitos principales de este campo es obtener dispositivos que sean transparentes porque en muchas ocasiones se requiere una evaluación visual del análisis, además de la necesidad de utilizar materiales biocompatibles. La biocompatibilidad de los materiales utilizados para la fabricación MEMS está siendo estudiada para realizar aplicaciones *in vivo* [1].

Según la definición encontrada en *The Williams Dictionary of Biomaterials*, se entiende por biocompatibilidad la habilidad de un material para provocar una respuesta apropiada en el huésped para una aplicación específica [2]. Según un estudio realizado por Kotzar *et al.* [3] concluía que el silicio, el óxido térmico, el polisilicio, el nitruro de silicio, el titanio y el SU-8 podían ser utilizados como materiales para fabricar dispositivos implantables. Esta información sirve de guía para el diseño y la selección de materiales biocompatibles, pero pequeñas variaciones en el proceso de fabricación o en la composición pueden cambiar los resultados de biocompatibilidad.

Por otro lado, durante el proceso de fabricación de la primera generación de micro/nanopipetas surgieron algunos problemas, como por ejemplo la obtención de los chips o dados con el proceso de serrado, la deposición de la capa estructural de polisilicio en la cavidad de entrada impidiendo el acceso del reactivo a la capa sacrificial y la dificultad de realizar la conexión de los dispositivos a los equipos de medida. Además la capa estructural utilizada no era transparente, condición necesaria para aplicaciones biológicas.

El proceso de serrado dejaba la superficie del chip poco limpia al no poder utilizar resina de protección. También se observó que las puntas liberadas de la primera generación de micro/nanopipetas se rompían con facilidad cuando chocaban frontalmente con un dispositivo contiguo. Esto sucedía en el paso posterior al serrado, cuando se separaban las micro/nanopipetas del *blue-tape*. Si al levantarlas del plástico chocaban con el dispositivo que tenían delante, la punta en cantilever

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

podía romperse. A pesar de haber obtenido superficies más limpias y puntas más protegidas cuando se serraron los dados conteniendo 2x2 micro/nanopipetas, había que intentar evitar la etapa del serrado.

La deposición de capa estructural en la cavidad de entrada dificultaba la definición del microcanal porque para realizar el grabado de la capa sacrificial había que abrir ventanas en la capa estructural. Además, los ataques anisotrópicos en TMAH limitaban la geometría de las cavidades. Otra mejora a realizar era la manera de conectar las micro/nanopipetas a los equipos de medida. A pesar de haberse solucionado utilizando dispositivos meso fabricados en LTCC y/o metacrilato, suponía un trabajo adicional la fabricación de estas estructuras. Incorporaban un proceso de alineamiento entre diferentes dispositivos y no siempre se alineaban bien. Por este motivo se debía conseguir la conexión de las micro/nanopipetas a los equipos de medida dentro de un mismo proceso tecnológico, sin la necesidad de fabricar otros dispositivos que sirvieran de interfase para la conexión.

Para poder desarrollar esta nueva tecnología, se enumeraron las necesidades surgidas del nuevo proyecto y los problemas encontrados durante el proceso de fabricación de la primera generación de las micro/nanopipetas. En el proceso de fabricación de la segunda generación de micro/nanopipetas se buscaba conseguir la solución a estos problemas y necesidades dentro de un mismo proceso tecnológico, sin la necesidad de post-procesos adicionales. Estos motivos condujeron a diseñar una nueva distribución de los elementos que componían las micro/nanopipetas que implicó la realización de un nuevo proceso tecnológico para obtener los dispositivos de 2a generación. Una vez definidos estos pasos, comenzaría el proceso de fabricación y una vez fabricados los nuevos dispositivos se debería comprobar, como en el caso de los de la 1a generación, que los canales habían quedado abiertos, que no se habían colapsado ni se habían roto.

4.2 Estudios tecnológicos preliminares

En el proceso de fabricación de la primera generación se había escogido grabado anisotrópico en TMAH para realizar las cavidades por la cara dorso. Este tipo de ataques obliga a definir las estructuras a grabar con mayores dimensiones porque reduce su tamaño a medida que avanza el grabado por el espesor de la oblea. En la segunda generación de micro/nanopipetas había que fabricar un gran número de cavidades y las dimensiones debían estar controladas en todo momento. Por estos motivos se escogió realizar grabados secos profundos DRIE (*Deep Reactive Ion Etching*), ofrecen mayor versatilidad que los grabados anisotrópicos y permiten un mayor control de la zona a grabar. Para definir el proceso tecnológico utilizando DRIE para la obtención de las cavidades era necesario un estudio preliminar para comprobar la viabilidad del método escogido.

4.2.1 Run prueba definición cavidades con DRIE

La apertura de las cavidades mediante grabado seco profundo podía ser una etapa crítica en el proceso de fabricación porque comprendía el grabado de la oblea en diferentes zonas. Había que definir diferentes tipos de cavidades: anillos huecos donde conectar los tubos externos, la entrada al microcanal, la zona de conexión y el rebaje del depósito que uniría la zona de conexión con la cavidad de entrada al microcanal y la liberación de la punta. Estas cavidades se detallan en el dibujo de la Figura 4.1.

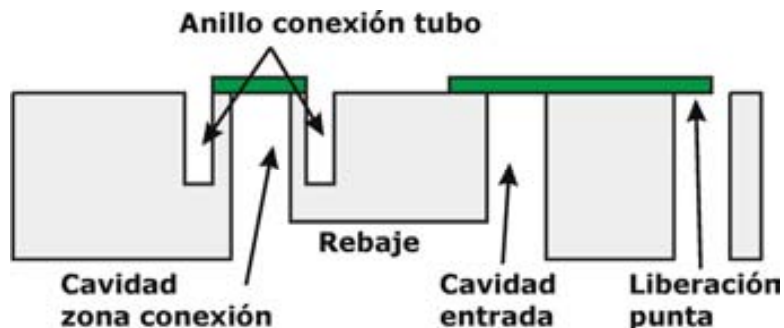


Figura 4.1: Dibujo esquemático con las cavidades a grabar para obtener las micro/nanopipetas de la segunda generación

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

Para conseguir todas las aberturas para la fabricación de la segunda generación de dispositivos, había que realizar tres grabados secos profundos DRIE diferentes, el primero por la cara dorso, el segundo por la cara componentes y el tercero nuevamente en la cara dorso. El primer DRIE por la cara dorso era especialmente delicado porque había que grabar prácticamente todo el grosor de la oblea, pero había que dejar un espesor mínimo para poder realizar un ataque seco profundo por la cara componentes para obtener los anillos donde conectar los tubos. Este DRIE iría seguido del tercer y último ataque seco profundo por la cara componentes que definiría el rebaje y abriría las cavidades de la zona de conexión y entrada además de liberar la punta. Se deberían buscar dos materiales diferentes para actuar como máscara en los dos DRIE por la cara dorso, porque para realizar el último DRIE por la cara dorso no se podía depositar resina porque la oblea ya estaría mecanizada por esa cara. El primer material a utilizar como máscara debería tener el espesor suficiente para poder realizar el primer grabado de casi todo el grosor de la oblea. Una capa de resina y otra de óxido de silicio fueron los materiales escogidos para realizar la función de máscara. Se realizó un run de prueba para conocer con exactitud la selectividad de óxido-silicio y resina-silicio.

Esta selectividad dependía del equipo utilizado para realizar los grabados. Si la capa de óxido de silicio o de resina desaparecía, quedaría silicio expuesto que podría dañarse. Por este motivo, era necesario saber con exactitud la velocidad de ataque de la capa de óxido y de resina frente al silicio y poder calcular el grosor necesario de resina y de óxido para evitar que desaparecieran estas capas durante el ataque seco profundo. Para poder tener una imagen de cada paso seguido, a lo largo de este apartado, al igual que en el capítulo anterior, se podrán ver unas tablas donde se mostrarán unos dibujos con la sección transversal de una micro/nanopipeta. La primera columna de las citadas tablas indicará el número de la etapa y tratará de dar una breve explicación de la etapa seguida del código con el que es nombrada en BACO, la segunda corresponderá al dibujo de la sección transversal y la tercera indicará las obleas utilizadas.

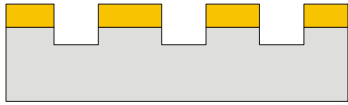
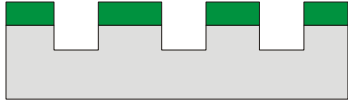
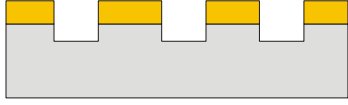
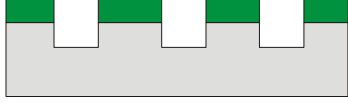
4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

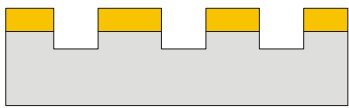
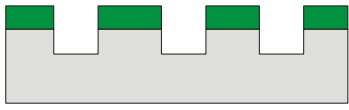
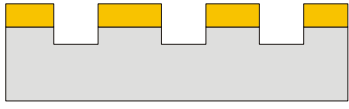
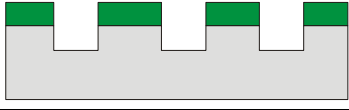
Run 3731		
1. INICIO		1 - 2
2. Marcar las obleas (MARC-PAA)		1 - 2
3. Limpieza general simple (NETG-SIM)		1 - 2
4. Fitolitografía Especial (FOTO-ESP) por cara componentes con resina ma-P1240 de 6 μm Máscara: CNM225-DRIE		1
5. Medida con Filmetric-F20 del grosor capa resina ma-P1240 depositada (MES-ESP)		1
6. Deposición de 4 μm de óxido sin dopar por cara componentes (DAMI-ING)		2
7. Fitolitografía Especial (FOTO-STU) por cara componentes, depositando 2 μm de resina sobre una capa de óxido Máscara: CNM225-DRIE		2
8. Etapa no Standard por SB (ESPECIAL) Recocido resina a 200°C durante 30 min		2
9. Grabado de la capa de óxido de silicio (PGIOXGUI)		2
10. Decapado de resina (DEC-RESI)		2

Se marcaron (**MARC-PAA**) y se limpiaron (**NETG-SIM**) dos obleas de silicio. A continuación se depositó y se estructuró sobre la cara componentes de la oblea 1 una capa de 6 μm de fotoresina maP-1240 (**FOTO-ESP**). La etapa de fotolitografía era especial por el espesor de la resina utilizada, superior al habitual en una etapa fotolitográfica estándar. Sobre la cara componentes de la oblea 2 se depositó una capa de 4 μm de óxido de silicio sin dopar (**DAMI-ING**).

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

Para estructurar esta capa de óxido de silicio se realizó una etapa fotolitográfica **(FOTO-ESP)** depositando una capa de 2 μm de resina que permitiera el posterior ataque seco sin dañar la capa de 4 μm de óxido de silicio. Esta fotolitografía, al igual que la anterior, debía ser especial por el espesor de la capa de resina depositada. A continuación se recoció esta resina a 200°C durante 30 min **(ESPECIAL)**. El recocido endurecía la resina para que aguantase el grabado seco de la capa de óxido de silicio. Con el ataque seco **(PGIOXGUI)** realizado utilizando el equipo Alcatel GIR 160, se traspasó el dibujo de la resina a la capa de óxido de silicio. Las condiciones del proceso de grabado para obtener paredes verticales fueron caudal de CHF_3 de 50 cm^3/min , presión de 0.05 mbar y una potencia de 500 W. Se realizó un sobreataque para asegurar que no había óxido en las zonas que lo habíamos eliminado y no podía hacer de máscara. Una vez estructurada la capa de óxido de silicio, se decapó la resina con plasma de oxígeno **(DEC-RESI)**.

Grabado del silicio-máscara de oxido de silicio y resina maP-1240		
11. Grabado profundo del silicio (A601-ING) : atacar 100 μm cara componentes		1
12. Grabado profundo del silicio (A601-ING) : atacar 100 μm cara		2
13. Medidas especiales (MES-ESP) : medida en TENCOR del escalón formado en el ataque		1
		2

Medida grosor máscaras después grabado		
<p>14. Medidas especiales (MES-ESP): medida en Filmetric-F20 del grosor de la capa de resina, después de grabado.</p>		1
<p>15. Medida en Nanospec (MES-NANO): medida del grosor de la capa de óxido después del grabado.</p>		2
<p>16. FINAL</p>	 	1 - 2

Una vez depositada y estructurada la capa de resina y de óxido, se realizaron ataques secos profundos DRIE en las obleas. Para poder calcular la velocidad de ataque de la resina y del óxido, se programaban ataques de 100 μm de silicio (**A601-ING**). Grabada esta profundidad, se media el escalón generado en esta etapa utilizando el TENCOR (**MES-ESP**). El grosor de la capa de resina se media en el Filmetric y el de la de óxido en el Nanospec. Como se había medido el grosor inicial, se sabía cuanto había disminuido el grosor de la capa durante el DRIE, por tanto se sabía cuantas micras de resina y óxido se habían grabado durante el ataque seco profundo. Las micras de silicio atacadas se podía calcular fácilmente y con exactitud restando el valor obtenido del grosor de la capa de resina o de óxido al valor del escalón obtenido con el TENCOR, el resultado mostraba las micras de silicio grabadas. Sabiendo las micras grabadas de cada material para un mismo tiempo, la selectividad del grabado se calculó fácilmente. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.I.

Remarcar que en el proceso de ataque profundo, el ataque no es homogéneo, se graban más micras en el centro de la oblea que en el borde, esta es la razón por la que en la tabla se han diferenciado dos zonas y se ha designado Int a la zona centro de la oblea y Ext al borde de la misma. Se puede comprobar la elevada selectividad en el ataque de los materiales escogidos frente al ataque de silicio.

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

La velocidad de ataque profundo en el silicio es mucho mayor que en el óxido de silicio o la resina. Por ejemplo, para el caso del óxido de silicio se atacan en el mismo tiempo $1.54 \mu\text{m}$ en el interior de la oblea por $291.75 \mu\text{m}$ de silicio.

La selectividad depende de la resina y del óxido de silicio utilizados, los resultados mostrados en la Tabla 4.I nos confirman que tanto el óxido de silicio escogido como la resina podían actuar como máscaras en los ataques secos profundos a realizar para la obtención de las micro/nanopipetas de la segunda generación. Estos DRIE eran etapas críticas en el proceso de fabricación por lo que requerían conocimiento de las velocidades de ataque y las selectividades de los materiales utilizados como máscara en el equipo utilizado (Alcatel 601E).

Tabla 4.I: Selectividad del DRIE (Alcatel 601E) en resina maP-1240 y SiO_2 sin dopar frente Silicio

	Ext	Int
Selectividad Si/resina	83.98	68.97
Selectividad Si/SiO_2	226.50	189.21

4.2.2 Run prueba oxidación del polisilicio

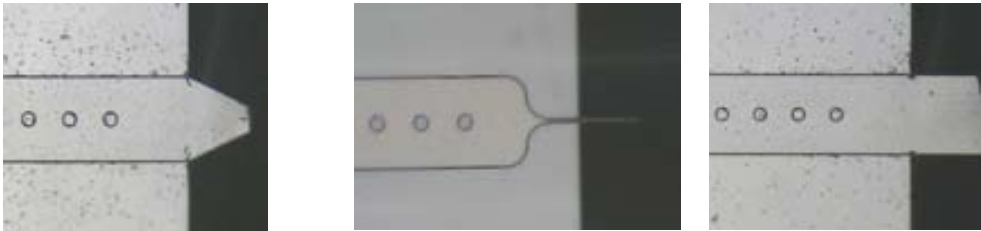
El polisilicio es un material opaco y no permite visualizar a través de él. Aunque en microelectrónica se considera que $0.5 \mu\text{m}$ de polisilicio podía ser transparente, para inspeccionar que pasaba en el interior del microcanal de las micro/nanopipetas no había sido suficiente y se habían roto las paredes de polisilicio para comprobar que la tinta había entrado en el canal. Como un requisito para aplicaciones biológicas era la transparencia de los dispositivos, se creyó conveniente convertir las paredes que definían el canal a un material que fuera transparente.

Los materiales transparentes típicos utilizados en microelectrónica son el óxido de silicio y el nitruro de silicio. Como las micro/nanopipetas estaban fabricadas en polisilicio, una solución sería oxidar este polisilicio para convertirlo a óxido y de esta manera obtener el material transparente que permitiera la visualización óptica a través del mismo. Realizar este proceso para esta finalidad era una novedad. Para realizar la oxidación de la capa de polisilicio se introdujeron los dispositivos en un horno con atmósfera oxidante.

El proceso de oxidación del silicio reduce el 44% del silicio. Como el grosor de la capa polisilicio era de $0.5 \mu\text{m}$ se debía formar una capa de óxido de silicio con un

grosor de $0.8 \mu\text{m}$. Se oxidó más de lo necesario para asegurar que no quedaba polisilicio en las paredes. Los chips se introdujeron en un horno hasta conseguir un grosor de óxido de $8137 \pm 48 \text{ \AA}$ medido en la oblea de test. Este grosor de óxido fue suficiente para convertir toda la capa de polisilicio a óxido y dejar que fuera transparente, como se muestra en la Figura 4.2.

Diferentes puntas de micro/nanopipetas con la pared de polisilicio



Mismas puntas con la pared de polisilicio convertida en óxido de silicio

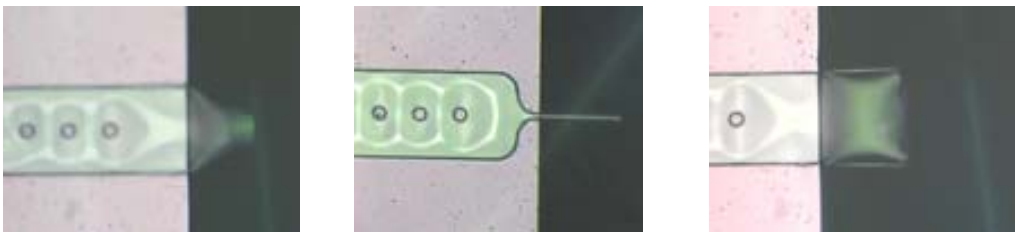


Figura 4.2: Imágenes ópticas de la oxidación de la pared de polisilicio a óxido de silicio de diferentes puntas de micro/nanopipeta.

Una vez obtenidas las paredes transparentes para los canales, se encapsuló el chip con la micro/nanopipeta al dispositivo de metacrilato para comprobar si el líquido llenaba el canal. El chip se sumergió en agua para llenar el canal de la micro/nanopipeta por capilaridad. En unos experimentos realizados con unos capilares de vidrio de diferente diámetro, se había comprobado que para introducir líquido por presión en los capilares, desplazando el aire del canal, implicaba ejercer una mayor presión. Una vez lleno el canal se conectó una jeringa de 10 ml llena de agua al dispositivo de metacrilato. La Figura 4.3 muestra una secuencia de fotogramas del video rodado con una cámara LCCD conectada a un microscopio. En ella se puede observar la punta de una micro/nanopipeta que al iniciar el experimento estaba llena de agua, como muestra el primer fotograma que corresponde a la Figura 4.3a, como el agua retrocedía por el canal (Figura 4.3b y c) y como se consiguió llevar el líquido otra vez hasta la punta al inyectar más agua con

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

la jeringa (Figura 4.3d). Aunque se consiguió llevar el líquido hasta la punta de una micro/nanopipeta inyectando líquido con una jeringa, no se consiguió ver líquido saliendo del microcanal cuando se inspeccionaba el dispositivo con el microscopio óptico, es decir, no se observó la formación de gota en el orificio de salida de la punta de la micro/nanopipeta. Probablemente esto era debido a las conexiones realizadas que impedían aplicar la presión necesaria para generar la gota en la punta de la micro/nanopipeta.

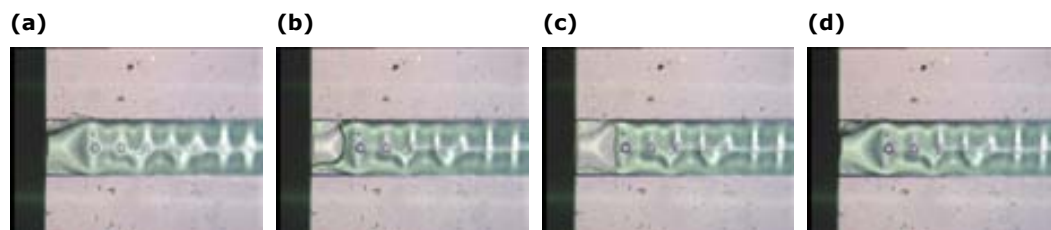


Figura 4.3: Secuencia de fotogramas donde se puede observar el movimiento del agua en la punta de una micro/nanopipeta de óxido al inyectar más líquido con una jeringa.

4.3 Diseño de las micro/nanopipetas

Las partes que formaron las micro/nanopipetas fueron las mismas que las que se definieron en el capítulo anterior 3. *Micro/nanopipetas: Primera generación*, pero distribuidas de manera diferente, tal y como se muestran en la Figura 4.4. Se puede observar en la figura un soporte, sobre el que fabricaron tres canales estrechos por donde circularían los líquidos. El tamaño del chip se diseñó para que fuera el tamaño mínimo que facilitara su manipulación. Estos canales deberían tener respectivamente una cavidad de entrada por donde se introducirían los líquidos y una punta muy fina que serviría como orificio de salida. Habría que diseñar para las puntas un sistema de protección de choques sobre el soporte porque en el diseño anterior se había observado que se rompían cuando chocaban frontalmente contra otro objeto. También se intentaría diseñar sobre el soporte unos orificios donde los tubos encajaran perfectamente sobre ellos y de esta manera lograr la conexión de las micro/nanopipetas a los equipos de medida sin la necesidad de utilizar los dispositivos fabricados en LTCC y/o metacrilato. La posición de estos nuevos tubos implicaría la fabricación de un canal que uniese la salida del tubo con la cavidad de entrada de la pipeta.

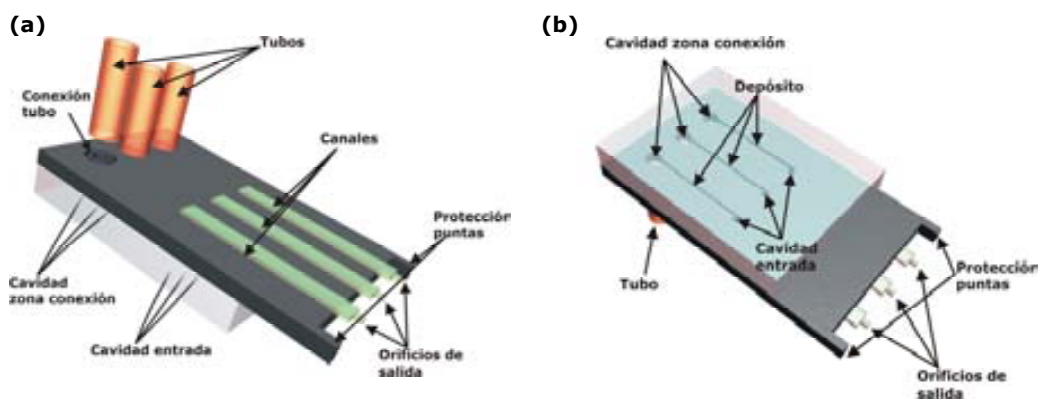


Figura 4.4: Esquema de los componentes de una micro/nanopipeta de 2a generación, (a) cara componentes y (b) cara dorso.

4.4 Proceso tecnológico y fabricación de las micro/nanopipetas

Con los componentes de las micro/nanopipetas a fabricar marcados, como en el caso de las micro/nanopipetas de la primera generación, había que elaborar un proceso tecnológico con las etapas de fabricación necesarias para la integración de estos componentes sobre un mismo chip. Una vez definidas estas etapas, se conocería el número de máscaras necesarias para el proceso de fabricación y se procedería a su diseño. Como se ha comentado en el capítulo anterior, estas máscaras contienen la información necesaria sobre las medidas y las formas de las micro/nanopipetas. En este nuevo proceso se implementarían por un lado, las soluciones para los problemas encontrados durante el primer proceso de fabricación, como por ejemplo, evitar la etapa del serrado de las obleas para la obtención de los chips individuales. Y por otro, se debían tener en cuenta los requisitos necesarios para cumplir los objetivos del MINAHE II, es decir, fabricar los dispositivos para aplicaciones biológicas.

4.4.1 Descripción del proceso tecnológico

Para poder dibujar las máscaras con la geometría y las medidas de los dispositivos y empezar con el proceso de fabricación, se tenía que definir la secuencia de pasos tecnológicos para obtener los dispositivos. Igual que en la primera tecnología, se fijó como objetivo obtener microcanales estrechos y recubiertos de un único material por lo que se utilizó nuevamente la tecnología en silicio de microelectrónica, dada la versatilidad que ofrecía. Otro de los objetivos de este diseño era conseguir que las paredes del canal fueran transparentes y, como se habían obtenido al oxidar el polisilicio, se escogieron los mismos materiales como capa sacrificial y estructural para la fabricación de los nuevos dispositivos. Sobre una oblea de silicio, como elemento soporte de las micro/nanopipetas, habría que depositar por la cara componentes la capa sacrificial de óxido de silicio que definiría la geometría y las dimensiones del canal una vez estructurada.

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

El cuerpo de la micro/nanopipeta se recubriría por la capa estructural de polisilicio que se oxidaría una vez se hubiera obtenido el microcanal grabando la capa sacrificial. Después se abrirían tres cavidades por la cara dorso de la oblea hasta llegar a la capa sacrificial, la primera de estas cavidades definiría la conexión con el tubo, la segunda el orificio de entrada al canal y la tercera volvería a hacer que la punta del dispositivo quedara liberada del soporte de silicio. El siguiente paso consistirá en depositar el material que haría la función de capa estructural, es decir, que lo recubrirá todo y que definiría el canal de la micro/nanopipeta conjuntamente con el sustrato de silicio. Se optó por utilizar polisilicio como capa estructural porque aunque se había comprobado que no era transparente, posteriormente se podía oxidar para transformarlo. Se creyó conveniente en buscar un método alternativo para poder depositar óxido directamente como capa estructural, tal y como se explicará en el punto *4.4.4.1.1 Resina como capa sacrificial*.

Una vez depositada la capa estructural se procedería a grabar la capa sacrificial por la cavidad de entrada que con este nuevo proceso habría quedado abierta. Con este paso quedaría definido el canal de la micro/nanopipeta. A continuación se obtendrían los chips individuales utilizando la técnica de *Manual Cleaving*, aplicando una pequeña presión se separaría el chip de la oblea. Una vez obtenido el chip, habría que abrir el orificio de salida de las puntas de las micro/nanopipetas. Finalmente, se engancharían los tubos para poder conectar las micro/nanopipetas a los equipos de medida y se comprobaría si el canal había quedado abierto o si estaba roto u obturado.

La Figura 4.5 muestra de manera esquemática en dibujos de los procesos de fabricación a seguir para obtener las micro/nanopipetas de segunda generación. La oblea de silicio inicial (a), la deposición de la capa sacrificial (b), la estructuración de la misma (c), la abertura de las cavidades (d), el recubrimiento de todo con la capa estructural (e), el grabado de la capa sacrificial y obtención del chip (f), la abertura de las puntas (g) y las conexiones de los tubos(h).

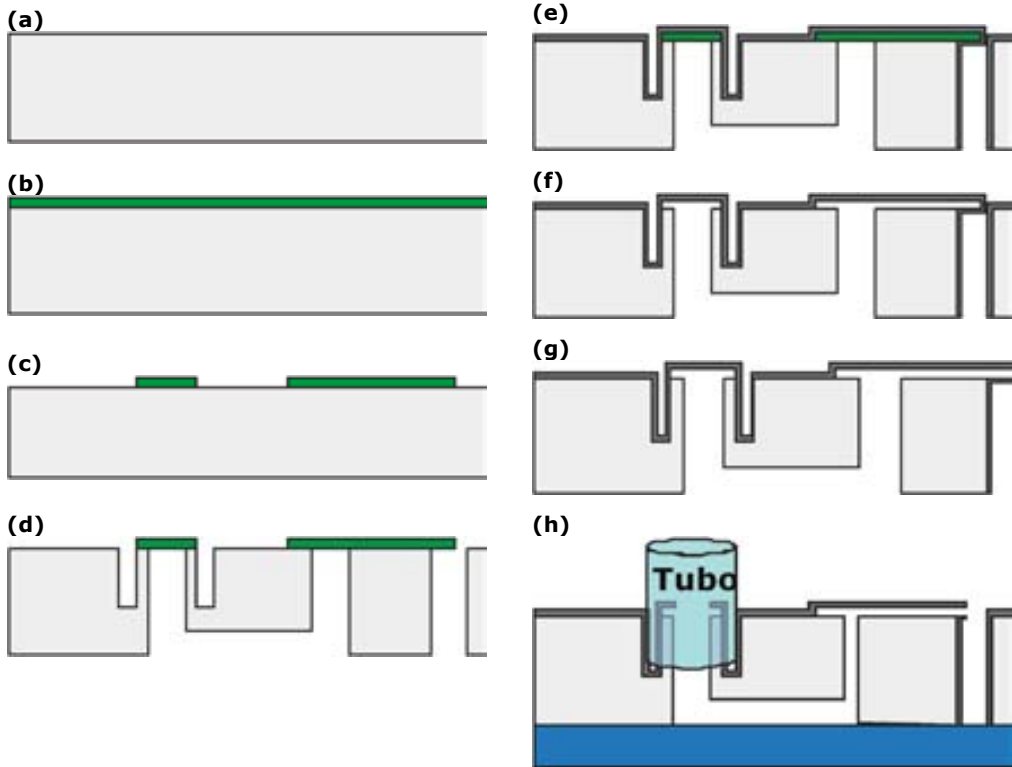


Figura 4.5: Dibujos de los procesos a seguir para la fabricación de las micro/nanopipetas de segunda generación (a) oblea de silicio inicial, (b) deposición de la capa sacrificial, (c) estructuración de esta capa, (d) apertura de las cavidades, (e) recubrimiento con la capa estructural, (f) grabado de la capa sacrificial y obtención del chip, (g) apertura de los orificios de salida y (h) conexión de los tubos.

4.4.2 Diseño de las máscaras

Una vez descrito el proceso tecnológico, se conocían los elementos que componían las micro/nanopipetas, las etapas a seguir y, por lo tanto, las máscaras que eran necesarias para la fabricación de las micro/nanopipetas. Para la fabricación de las micro/nanopipetas de la segunda generación fue necesario crear cuatro máscaras para fabricar los chips en silicio y una máscara para fabricar los chips en vidrio que cubrirían el depósito del chip de silicio.

4.4.2.1 Chips de silicio

El juego de máscara que se utilizó para el segundo proceso tecnológico se denominó CNM231. La Tabla 4.II describe este juego de máscaras que se utilizó para la fabricación de las micro/nanopipetas de la segunda generación. Esta misma tabla

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

indica la finalidad que tiene cada una de las máscaras en el proceso. Como se ha explicado en el capítulo anterior *3. Micro/Nanopipetas: Primera generación*, la nomenclatura utilizada en el IMB para identificar cada una de las máscaras empieza con la identificación del juego de máscaras al que pertenecen, en este caso CNM231, seguido de unas letras que identifican una máscara dentro del juego. El juego de máscaras CNM231 está formado por cuatro máscaras.

Comparándolo con el proceso de fabricación de las micro/nanopipetas de primera generación, había aumentado el número de máscaras a utilizar en dos, cosa que hacía suponer un proceso tecnológico con más dificultad. La misma Tabla 4.II indica el orden en el que se utilizaron las máscaras, es decir, el Nivel que tiene cada una de ellas. También se indica el nombre que tenían dentro del juego CNM231 (Nombre), que parte de las micro/nanopipetas definieron (Uso) y el campo que tienen (Campo).

Tabla 4.II: Máscaras del juego CNM231 para la fabricación de las micro/nanopipetas

Nivel	Nombre	Uso	Campo
1	PIPETA	Definición geometría pipeta	Claro
2	REBAJE	Definición depósitos	Oscuro
3	CORTE	Definición chips y cavidades	Oscuro
4	TUB	Definición conexión tubos	Oscuro

Según la Tabla 4.II, la primera máscara utilizada sería CNM231-PIPETA y con ella se transferirá la geometría de los dispositivos a la capa sacrificial que como en el caso anterior, definirán el canal de la micro/nanopipeta. La máscara CNM231-REBAJE se utilizará en segundo lugar y dará las medidas del depósito que conectará la cavidad de la zona de conexión con la cavidad de entrada a la micro/nanopipeta. La tercera máscara utilizada será la CNM231-CORTE y con ella quedaran definidos por un lado los chips que contendrán las micronanopipetas y por otro, las cavidades que se abrirían por la cara dorso de la oblea de silicio para llegar a la capa sacrificial depositada en la cara componentes desde la cara dorso. La definición de los chips evitará el paso del serrado de la oblea. La primera de las cavidades definidas será la correspondiente a la zona de conexión, la segunda abrirá la cavidad de entrada al canal de la micro/nanopipeta y la tercera liberará la punta de la micro/nanopipeta. En último lugar se utilizará la máscara CNM231-TUB, con ella se definirán las cavidades por la cara componentes donde se encajaran los tubos de conexión.

El dibujo para un chip de las cuatro máscaras utilizadas en la fabricación de las micro/nanopipetas de segunda generación puede observarse en la Figura 4.6. La primera columna muestra la máscara CNM231-PIPETA para este dispositivo, la segunda representa la máscara CNM231-REBAJE, la tercera corresponde a la máscara CNM231-CORTE y la cuarta a la CNM231-TUB.

En la máscara PIPETA se puede observar las 3 micro/nanopieptas que formaran el chip y 3 redondas, que corresponden a las zonas donde quedarán definidas las salidas de los tubos de conexión, cada tubo conectará una MP del chip. La máscara REBAJE definirá por la cara dorso el canal que unirá la salida del tubo de conexión con la entrada al canal de la pipeta, así como se empezará a definir la zona donde quedarán liberadas las puntas con las protecciones correspondientes. La máscara CORTE señalará la cavidad de salida del tubo de conexión, la de entrada al canal de la MP y la que liberará las puntas de las micro/nanopipetas. La máscara TUB marcará la zona donde se encajará y se pegará el tubo de conexión.

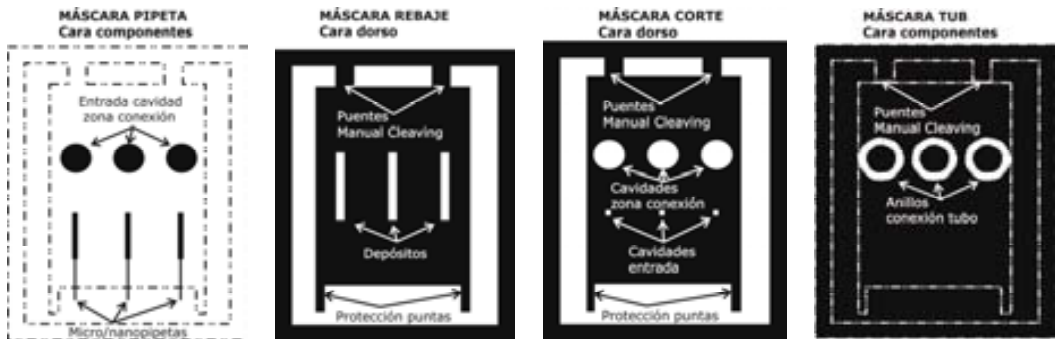


Figura 4.6: Motivos de las diferentes máscaras del juego CNM231 para el diseño de un chip de micro/nanopipetas de la segunda generación. Cromo dibujado en negro.

Para alinear las diferentes máscaras se utilizaron dos motivos de alineación diferentes, los motivos de alineamiento doble cara y los de la misma cara, motivos utilizados habitualmente en el CNM. Los primeros se dibujaron en dos chips centrados verticalmente que restaban equidistantes respecto al centro de la oblea. Los segundos se dibujaron en cada chip de micro/nanopipetas. La Tabla 4.III muestra el orden y la secuencia de alineamiento seguida. En este caso, la máscara REBAJE se alineaba con la máscara PIPETA utilizando los motivos de alineamiento doble cara. La máscara CORTE se alineó con la máscara REBAJE utilizando los motivos de alineamiento de la misma cara. Por último, la máscara TUB con la máscara PIPETA con los motivos de la misma cara.

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

Tabla 4.III: Secuencia de alineamiento juego de máscaras CNM-231

	Cara	Alineamiento estándar	Alineamiento doble cara
PIPETA	Componente	-	-
REBAJE	Dorso	-	PIPETA
CORTE	Dorso	REBAJE	-
TUBO	Componente	PIPETA	-

La Figura 4.7 muestra los dibujos, la secuencia y distribución de los motivos de alineación doble cara (Figura 4.7a) en la oblea y estándar (Figura 4.7b) en un chip que han sido utilizados en las diferentes máscaras del juego CNM231.

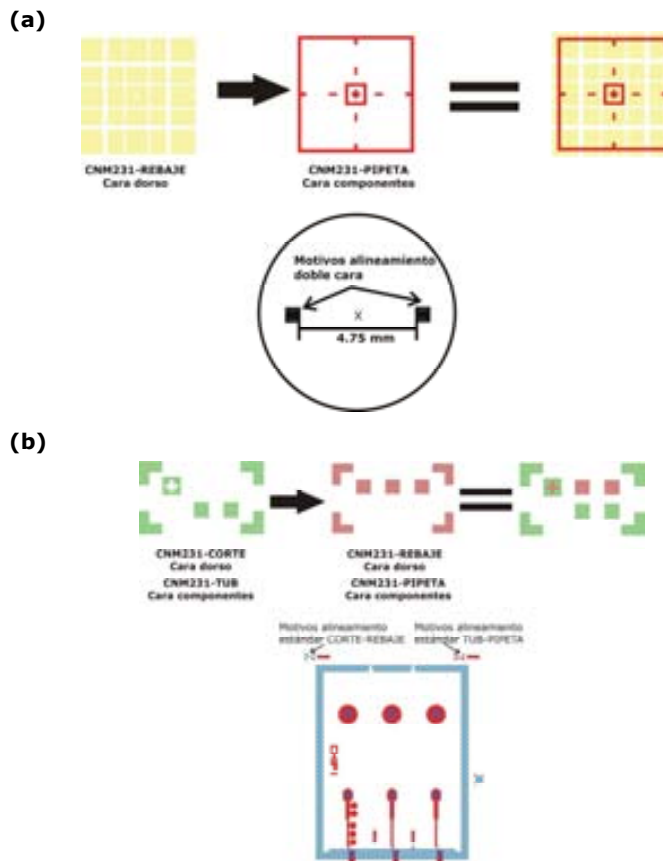


Figura 4.7: Dibujo, distribución y secuencia de alineamiento de los motivos de alineamiento (a) doble cara y (b) estándar de las máscaras del juego CNM231.

Dada la versatilidad que ofrece la fabricación en tecnología MEMS que permite diseñar diferentes dispositivos para ser fabricados simultáneamente, utilizando el mismo proceso de fabricación, se diseñaron siete chips diferentes para el segundo proceso tecnológico presentado. Cinco de estos chips serían el soporte donde se fabricarían las micro/nanopipetas, los dos chips restantes tendrían diferentes dispositivos microfluídicos.

Los chips que contenían las micro/nanopipetas fueron numerados del I al V. De los chips adicionales, el primero contendría microfiltros y el segundo micromezcladores. Estos dispositivos microfluídicos adicionales se explicarán en detalle en el siguiente capítulo de esta memoria, *5. Dispositivos adicionales obtenidos con la tecnología de segunda generación*. Estos siete chips se repitieron distribuyéndose por toda la oblea hasta completar su superficie. En el Anexo B se muestra la distribución de los chips en una misma oblea.

La Figura 4.8 muestra la superposición de las máscaras PIPETA, REBAJE, CORTE y TUBO para los cinco diseños diferentes dibujados correspondientes a los cinco chips con micro/nanopipetas realizados. Los chips se diferenciaban en el diseño o en el sistema de apertura de la punta. La diferencia en los diseños radicaba en el tipo de punta que tenían las micro/nanopipetas si era sencilla, múltiple o múltipuntas. Los chips I, II y V tendrían micro/nanopipetas con puntas simples, en el chip IV se diseñarían micro/nanopipetas con puntas múltiples y sobre el chip III se fabricarían las micro/nanopipetas multipuntas, es decir con varios microcanales con sus respectivas puntas.

El sistema de apertura diferenció entre utilizar micromecanización con FIB o rotura controlada. Los chips I, III y V fueron diseñados para romperse de manera controlada en un punto predeterminado. Los diseños de estos chips se basaron en los buenos resultados obtenidos en la fabricación de las micro/nanopipetas de la primera generación para la ruptura controlada en un punto determinado.

El diseño de estas nuevas micro/nanopipetas también incluiría unos motivos de test del ataque de la capa sacrificial y son las redondas que se observan en la micro/nanopipeta de la izquierda de los chips I, II, IV y V. Estos motivos se diseñaron para poder seguir la evolución de la formación del microcanal inspeccionando el chip en un microscopio óptico y evitando el uso del microscopio de interferencias.

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

El cuerpo de la micro/nanopipeta se estructuró de manera que quedara un marco sobre la cavidad de entrada para evitar que la cavidad de entrada definida con el DRIE fuera más grande que el canal.

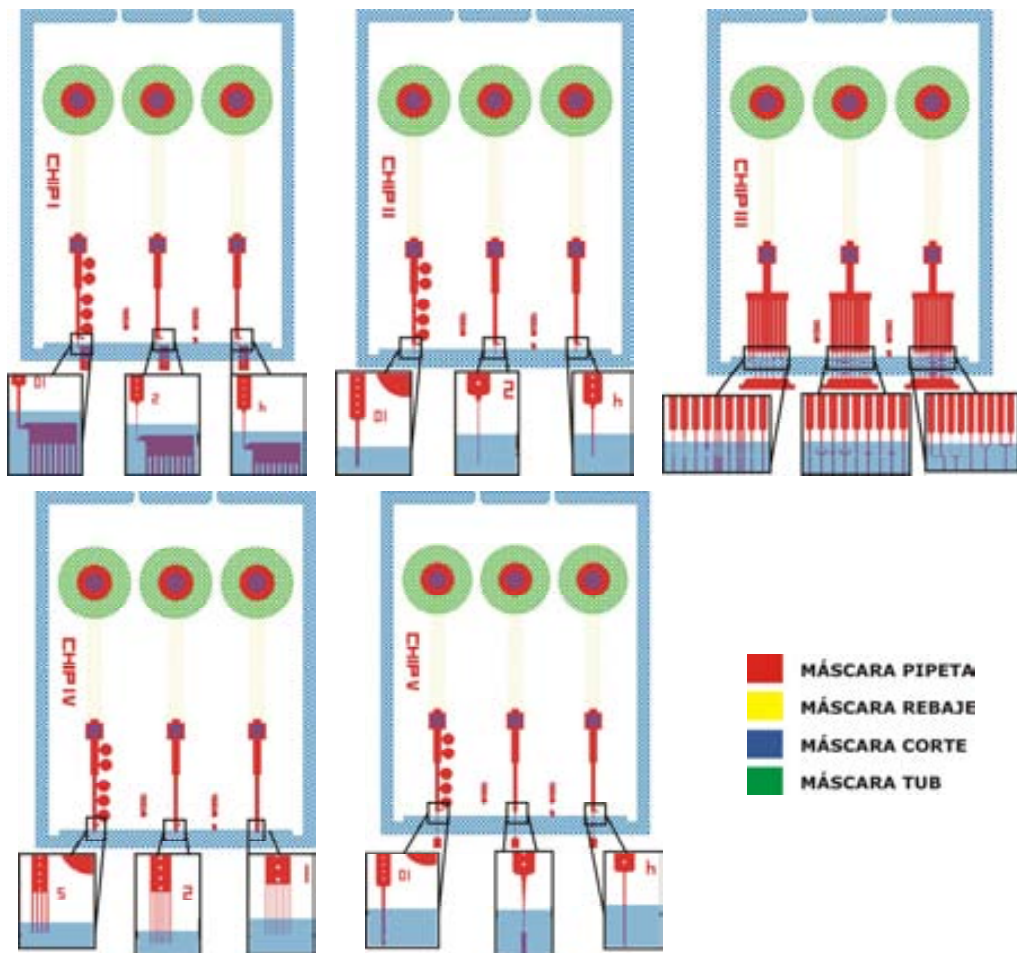


Figura 4.8: Dibujo de la superposición de máscaras para los cinco chips diferentes diseñados para la fabricación de las micro/nanopipetas segunda generación: Chip I, Chip II, Chip III, Chip IV, Chip V y los respectivos detalles de las puntas.

La Figura 4.9 muestra la sección de un chip donde se han señalado las diferentes partes que integran una micro/nanopipeta de la segunda generación. Se han señalado el tubo, la cavidad de la zona de conexión con el tubo, el depósito, la cavidad de entrada, el microcanal, la punta y el sistema de protección de puntas utilizado.

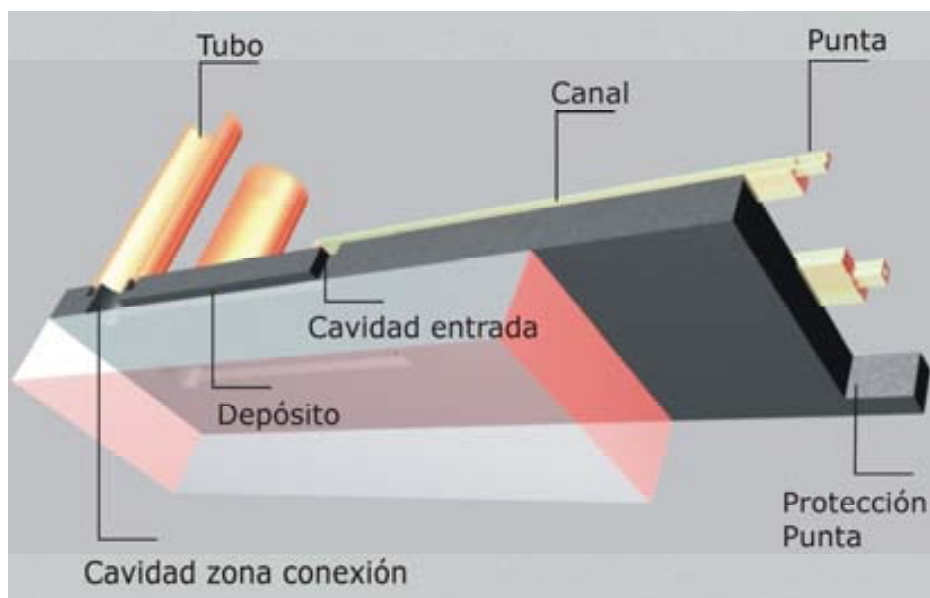


Figura 4.9: Sección transversal de un chip donde se han señalado las partes que componen una micro/nanopipeta de la segunda generación

La Tabla 4.IV muestra las dimensiones del depósito, el canal y la punta de las micro/nanopipetas. Las medidas son comunes para el depósito y el canal y difieren en la punta de la micro/nanopipeta. El diseño de las puntas fue en forma rectangular y sus tamaños de 10-2-4 μm respectivamente para cada una de las micro/nanopipetas del chip. El tamaño de las puntas en el chip IV, es decir, el que contenía las micro/nanopipetas con puntas múltiple fue de 5-2-1 μm .

Tabla 4.IV: Rango de dimensiones de las micro/nanopipetas de la segunda generación

	Ancho (μm)	Largo (μm)	Altura (μm)
Depósito	200	2500	50 - 100
Canal	50-120	2350	1.5
Punta	1-50	50-75	1.5

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

Se introdujeron cambios en el diseño de las micro/nanopipetas para disminuir esfuerzos mecánicos en la capa depositada. En los diseños de la primera generación de micro/nanopipetas se había observado la aparición de grietas que podían acabar produciendo la ruptura de la punta cuando parte del canal quedaba en voladizo. En la 2a generación todo el canal de la micro/nanopipeta queda sobre el silicio y solamente es la punta la que se libera. La Figura 4.10a muestra un dibujo de una punta rota de la primera generación en la zona del canal anclada al silicio, es la zona donde empezaba el voladizo. La Figura 4.10b muestra la imagen de una punta sin romper de la segunda generación. El problema se resolvió diseñando la zona en voladizo más estrecha, de esta manera se disminuían los esfuerzos mecánicos producidos durante la fabricación y se evitaba la fractura de la punta.

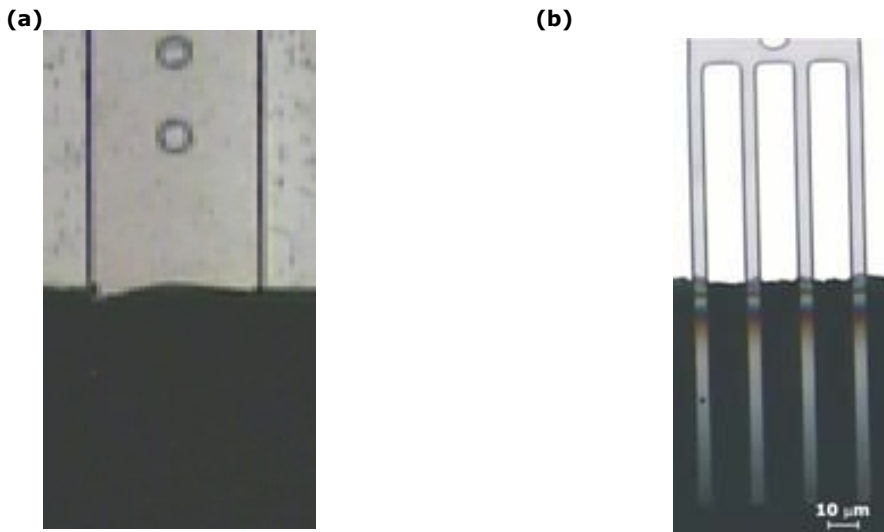


Figura 4.10: Imágenes ópticas de (a) Punta de una micro/nanopipeta de la 1ª generación y diseño mejorado de la misma punta para la 2a generación.

Para tener un mayor control del proceso de fabricación pensado, se diseñaron diferentes motivos de test. Dos motivos controlarían el ataque seco profundo realizado con la máscara REBAJE y CORTE. Un tercer motivo de test serviría para seguir la evolución del grabado de la capa sacrificial de óxido en HF que definiría el canal de la pipeta por otro. La Figura 4.11(a) y (b) muestran los motivos de test utilizados para el ataque seco profundo y la Figura 4.11(c) muestra el motivo circular empleado para controlar el avance del ataque de la capa de óxido sacrificial con HF.

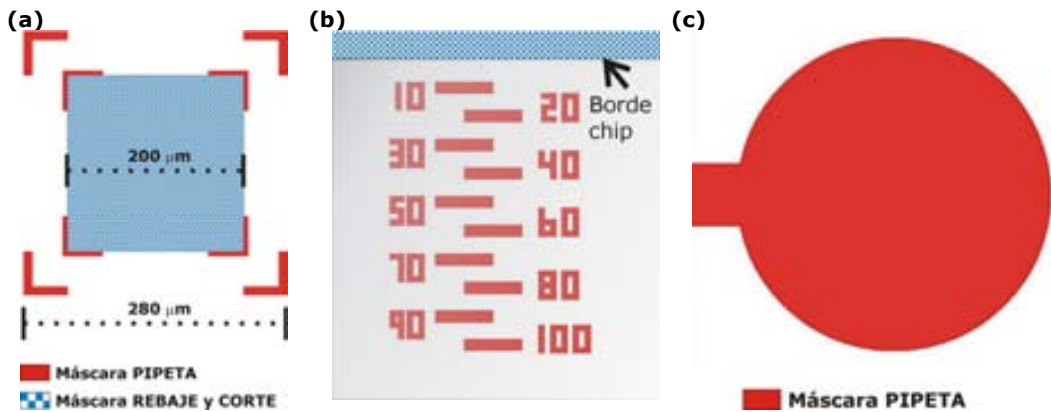


Figura 4.11: Motivos de test utilizados, (a) DRIE1 se utilizó para controlar la apertura de las cavidades diseñadas, (b) DRIE2 se utilizó para controlar el sobreataque lateral del grabado seco profundo y (c) seguimiento del grabado de la capa sacrificial

El grabado seco profundo era un paso crítico debido a que este ataque llegaría desde la cara dorso a la cara componentes. El motivo DRIE1 se utilizaría para seguir la evolución del proceso en el cuerpo de la micro/nanopipeta. Si el ataque se quedaba corto no se abrirían las cavidades de entrada y no pasaría líquido al interior del canal de la micro/nanopipeta. Por el contrario, si se excedía el ataque, la abertura realizada por la cara dorso superaría el ancho definido por el cuerpo de la micro/nanopipeta. Si esto sucedía no se podría definir el canal de la micro/nanopipeta porque la cavidad de entrada sería más ancha que el microcanal y quedaría cerrada al depositar el polisilicio. Además este hecho haría que el líquido saliera fuera del canal del dispositivo.

La apertura del cuadrado debería de ser de 200 μm aunque podía ser más grande, nunca debía superar las 280 μm . Además, si se producía sobreataque, el canal de la micro/nanopipeta dejaría de estar sobre el chip de silicio y esto produciría la aparición de esfuerzos mecánicos como se había observado en el proceso de fabricación de la primera generación. Por este motivo se utilizó el motivo de test DRIE2. Al estar situado en el extremo del chip indicaba cuantas micras de la superficie del chip se habían sobreatacado durante el grabado seco profundo. Finalmente el motivo ataque sacrificial se diseñó para poder seguir el grabado de la capa de óxido de silicio sacrificial porque durante el proceso de fabricación de la 1ª generación se había observado que las 0.5 μm de la capa de polisilicio no eran transparentes en un microscopio óptico, hecho que dificultaba comprobar si el canal había quedado abierto. El motivo de ataque sacrificial presentaba una superficie

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

plana cuando tenía debajo la capa sacrificial, al contrario de lo que pasaba cuando la capa se había grabado donde se observaba como se había abombado la superficie. La distribución en un chip de todos los motivos de test utilizados se muestran en la Figura 4.12.

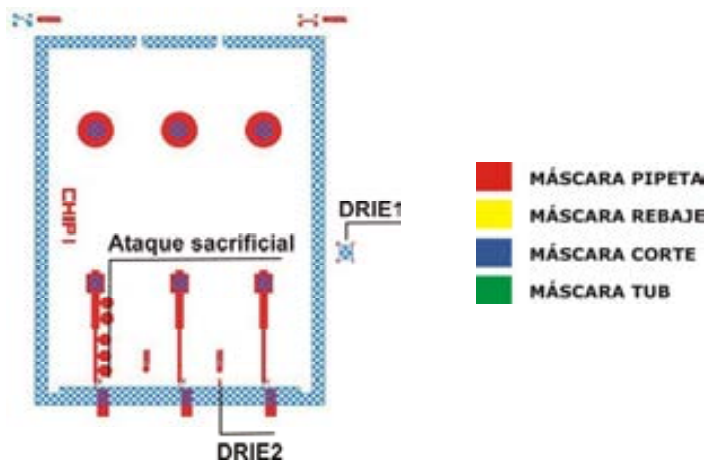


Figura 4.12: Distribución de las estructuras tecnológicas de test en un chip de la segunda generación de micro/nanopipetas

4.4.2.2 Chips de vidrio

Para cubrir el depósito fabricado en la cara dorso del chip y evitar que la capa estructural cerrara la cavidad de entrada al depositarse, se utilizarían unos chips de vidrio. El micromecanizado de la oblea de vidrio se mandó realizar a Little Things Factory GMBH [4] mediante la técnica de *Sand Blasting*. Se diseñó un chip cuyas dimensiones encajasen con el chip de silicio y cubriesen los depósitos fabricados en la cara dorso. El esquema del chip de vidrio realizado y enviado a la compañía Little Things Factory GMBH para su fabricación se muestra en la Figura 4.13. El Anexo C muestra la distribución de este chip a nivel de oblea. En el diseño del chip de vidrio se debía tener en cuenta la pérdida de dimensiones al mecanizar la oblea mediante la técnica de *Sand Blasting*. Se producía un ángulo de 75° de diferencia entre la parte superior y la inferior del chip de vidrio. El puente para el *manual cleaving* en el chip de vidrio no debía coincidir con los puentes del chip de silicio, si estos puentes quedaban acoplados, el chip se podría romper por sitios no definidos.

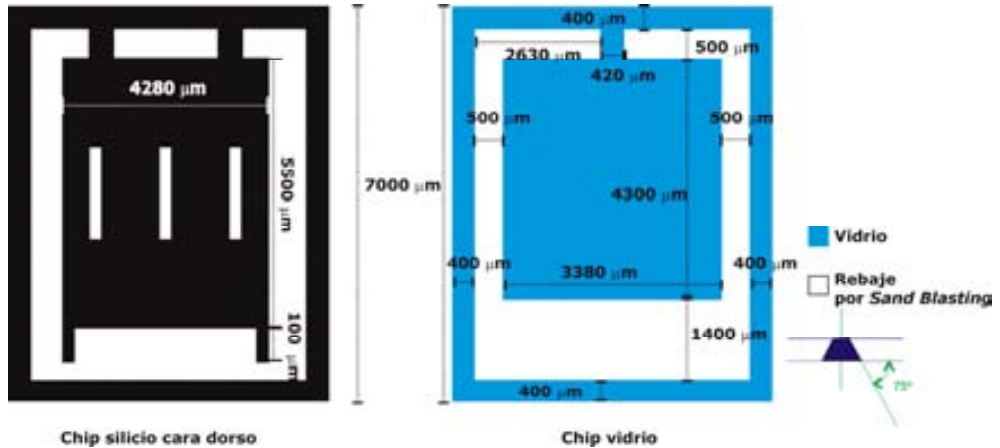


Figura 4.13: Esquema del chip de silicio y de vidrio diseñados.

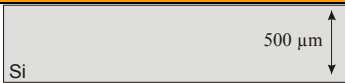


4.4.3 Proceso de fabricación de micro/nanopipetas con capa estructural de óxido de silicio obtenida al oxidar una capa de polisilicio

Con el proceso tecnológico definido y el diseño de las máscaras realizado, empieza el proceso de fabricación de las micro/nanopipetas de la 2a generación. En este apartado se explicará en detalle las etapas realizadas durante este proceso dentro de la Sala Blanca del IMB-CNM, los problemas y las soluciones encontrados. Como en el capítulo anterior *3. Micro/nanopipetas: Primera generación*, para poder tener una imagen más clara de cada paso seguido, se han insertado unas tablas que contienen dibujos de la sección transversal de una micro/nanopipeta.

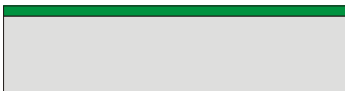
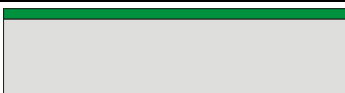
4.4.3.1 Proceso de fabricación en Sala Blanca

Uno de los objetivos era obtener micro/nanopipetas fabricadas en un material transparente para utilizarlas en aplicaciones biológicas. Como se había podido oxidar el polisilicio y convertirlo en un material transparente, se escogió polisilicio como capa estructural del dispositivo y el óxido de silicio como capa sacrificial.

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

Run 2984-PIP		
1. INICIO		1 - 4
2. Marcar las obleas (500 μm) (MARC-PXB)		1 - 4
3. Limpieza piraña + dip HF (NETG-GEN)		1 - 4

El material escogido para iniciar el proceso de fabricación fueron 4 obleas de silicio de 500 μm pulidas por las dos caras. No se escogieron obleas de 300 μm porque no daban el margen suficiente de trabajo para los dos ataques secos profundos que debían hacerse por la cara dorso. Después se marcaron (**MARC-PXB**) y limpiaron (**NETG-GEN**) estas obleas.

Deposición de la capa sacrificial		
4. Deposición de 1 - 4 μm de óxido dopado por cara componentes (DAMI-ING)		1 - 4
5. Deposición de 1,5 μm de óxido sin dopar por cara dorso (DAMI-ING)		1 - 4

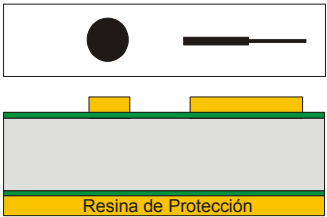


Se depositó una capa de óxido dopado (**DAMI-ING**) con un grosor de 1 μm para la primera oblea, 2 μm para la segunda y la tercera y de 4 μm para la cuarta. Esta capa de óxido, una vez estructurada, definiría la forma y las dimensiones de las micro/nanopipetas y actuaría como capa de paro en el último grabado seco profundo DRIE realizado desde la cara dorso. El óxido utilizado es el mismo que el que se utilizó en la primera generación, pero ha cambiado la designación de la etapa en BACO. Entre las diferentes etapas existentes en la Sala Blanca para depositar óxido, el que se deposita en ésta es el más uniforme, pero una capa con un grosor de 4 μm no se había depositado antes con estas condiciones. Se lanzó un run de prueba (2823-PIP) para comprobar que era posible depositar una capa de este grosor con estas condiciones.

En este proceso, se depositó una capa de óxido de silicio sin dopar de $4\ \mu\text{m}$. Una vez comprobado que era posible, se siguió adelante con el proceso de fabricación de las micro/nanopipetas y se depositaron las capas de óxido dopado de diferente grosor en las obleas. El grosor de la capa de óxido de silicio depositado se midió en la oblea de test utilizada para cada deposición y el resultado obtenido fue un grosor de $1.002\pm 0.305\ \mu\text{m}$ para la primera oblea, $2.003\pm 0.764\ \mu\text{m}$ para la segunda y la tercera y $4.005\pm 0.143\ \mu\text{m}$ para la cuarta. Recordemos que la estructuración de esta capa de óxido definirá la altura y la forma del canal de la micro/nanopipeta.

A continuación se depositó en las obleas una capa de óxido de silicio sin dopar por la cara dorso. Esta capa de óxido de silicio haría la función de máscara en uno de los ataques secos profundos DRIE posteriores del silicio, concretamente el que liberaría la estructura del chip, abriría las cavidades que llegaban a la capa de óxido sacrificial de la cara componentes desde la cara dorso y definiría el depósito. Este ataque seco no era del todo selectivo, aunque a una velocidad menor que el silicio, el grosor de la capa de óxido también va disminuyendo. Si la capa de óxido de silicio desaparecía, quedaría silicio expuesto que podría dañarse. Por este motivo, era necesario saber con exactitud la velocidad de ataque de la capa de óxido frente al silicio y el grosor necesario para evitar que desapareciera esta capa durante el ataque.

Con los resultados obtenidos en el run prueba 2823-PIP y mostrados en el punto *4.2.1 Run prueba definición cavidades con DRIE*, se calculó el grosor que debía tener esta capa de óxido para un ataque seco profundo de unas $50\text{-}100\ \mu\text{m}$ de silicio obteniéndose un valor mínimo de $0.5\ \mu\text{m}$. Para asegurar que la capa de óxido aguantaba todo el ataque seco del silicio, se decidió depositar una capa de $1.5\ \mu\text{m}$ de óxido de silicio sin dopar por la cara dorso de la oblea. El grosor medido en la oblea test dio como resultado $1.502\pm 0.261\ \mu\text{m}$.

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

Estructuración de la capa sacrificial		
<p>7. Fotolitografía de Ingeniería (FOTO-ING) por cara componentes, como fotolitografía estándar Obleas 2 Caras FOTO-FRD protegiendo cara dorso, pero con resina de 2 μm Máscara: CNM231-PIPETA</p>		1 - 4
<p>8. Etapa no Standard por SB (ESPECIAL) Recocido de la resina a 200°C durante 30 min</p>		1 - 4
<p>9. Grabado de las capas de óxido de silicio (PGIOXGUI)</p>		1 - 4

Para definir la forma de las micro/nanopipetas y la zona de conexión con los tubos, se realizó una etapa de fotolitográfica (**FOTO-ING**) en la cara componentes de las obleas utilizando la máscara PIPETA. El grosor de la resina depositada en esta etapa fue de 2 μm y era suficiente para aguantar el posterior ataque seco de la capa de óxido de silicio. A continuación se recoció esta resina a 200°C durante 30 min (**ESPECIAL**). Este paso era crítico porque se habían diseñado puntas que tenían 1 μm de ancho. Aunque estas puntas podían quedar bien definidas en la etapa de fotolitografía, al hacer el recocido de la resina para endurecerla y que aguantase bien el grabado seco de la capa de óxido de silicio posterior, la temperatura alcanzada en el horno podía hacer que la fotoresina fluyera y se perdieran estas dimensiones. La Figura 4.14a muestra como se conservaron estas puntas de 1 μm , tal y como se observó después del grabado seco (**PGIOXGUI**) realizado por la cara componentes. En la Figura 4.14b se muestra el aspecto de una punta rectangular de 4 μm .

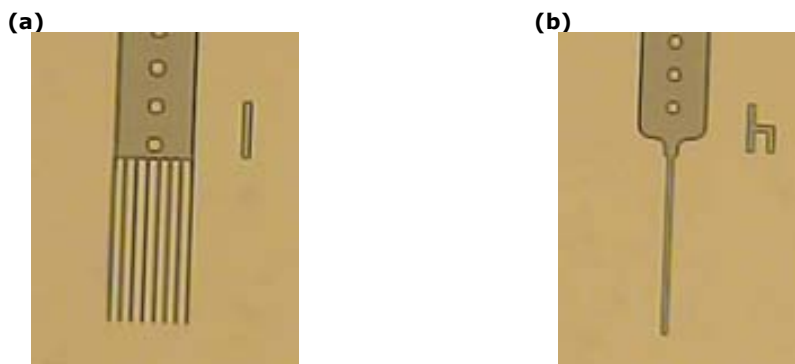


Figura 4.14: Imágenes ópticas de (a) Multipuntas de 1 μm de anchura y (b) punta rectangular de 4 μm de anchura

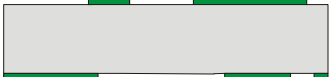
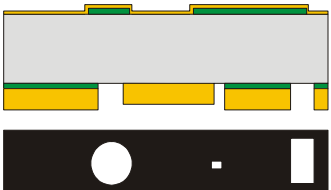
Con este ataque seco se traspasaba el dibujo de la resina a la capa de óxido de silicio. El proceso de grabado se realizó con las mismas condiciones que las utilizadas en la primera generación. Recordemos cuales eran, caudal de CHF_3 de $50 \text{ cm}^3/\text{min}$, presión de 0.05 mbar y una potencia de 500 W. Estas condiciones estaban optimizadas para grabar una capa de óxido de silicio de $8 \mu\text{m}$ de grosor obteniendo paredes verticales, por lo tanto no hubo problemas para mecanizar la capa de $4 \mu\text{m}$ de óxido de silicio.

Definición de la máscara para la obtención del depósito		
10. Decapado de resina (DEC-RESI) Decapado de resina en ácido (QDRACXXX)		1 - 4
11. Etapa Fotolitografía con alineamiento doble cara (FOTO-FKD): cara dorso Máscara: CNM231-REBAJE		1 - 4
12. Etapa no Standard por SB (ESPECIAL) Recocido de la resina a 200°C durante 30 min		1 - 4
13. Grabado de la capa de óxido (PGIOXGUI): cara dorso		1 - 4

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

Una vez definido el cuerpo de la micro/nanopipeta, se decapó la resina (**DEC-RESI**) con plasma de O₂. Como surgieron algunos problemas y quedaron restos de resina en la oblea se introdujo una etapa adicional de limpieza en ácido (**QDRACXXX**). Después de esta etapa la oblea quedó completamente limpia de resina. A continuación había que empezar a definir las cavidades y el rebaje para el depósito que une la cavidad de la zona de conexión con la cavidad de entrada por la cara dorso, para hacerlo era necesario una etapa de fotolitografía de alineamiento de doble cara (**FOTO-FKD**) por la cara dorso, utilizando la máscara REBAJE y poniendo resina de protección por la cara componentes.

La resina se recoció para que resistiera el grabado (**ESPECIAL**) y se realizó el ataque seco del óxido de silicio (**PGIOXGUI**) de la cara dorso. Este grabado transferiría a la capa de óxido la estructura que debería tener para ejercer de máscara en el ataque profundo seco que definiría el depósito que une la cavidad de la zona de conexión y la cavidad de entrada al microcanal de la micro/nanopipeta.

Definición de la máscara para la obtención de las cavidades		
14. Decapado de resina en ácido (QDRACXXX)		1 - 4
15. Etapa Fotolitografía para obleas doble cara pero con alineamiento simple. Como FOTO-FRD pero con resina maP-1275 (FOTO-ING): cara dorso Máscara: CNM231-CORTE		1 - 4

Una vez definido el rebaje en la capa de óxido de silicio, se decapó la resina (**QDRACXXX**) en ácido porque no se podía utilizar el plasma de O₂, al no encontrarse operativo el equipo. El siguiente paso fue definir las cavidades que llegarían a la cara componentes desde la cara dorso. Parte de estas cavidades definirían la zona de conexión, otras la entrada al canal de la micro/nanopipeta, liberarían la punta y la estructura del chip y definirían el chip conteniendo tres micro/nanopipetas y liberarían las puntas. Para hacerlo fue necesario realizar el tercer paso fotolitográfico (**FOTO-ING**) por la cara dorso utilizando la máscara CORTE y con resina de protección por la cara componentes. El alineamiento se realizó contra los motivos de la máscara REBAJE. La capa de resina depositada por la

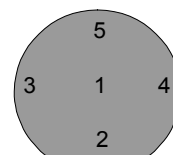
cara dorso debería tener un grosor de 8 μm para resistir el ataque DRIE desde esta cara hasta la cara componentes. Este espesor fue calculado según los resultados obtenidos en el run prueba 2823-PIP y mostrados en la Tabla 4.I del punto 4.2.1. *Run Prueba*. En ningún caso, el grosor de la capa de resina podía estar por debajo de 6.5 μm . Esta capa iba a ser utilizada como máscara en el posterior ataque seco profundo de 400-450 μm de silicio y no podía desaparecer antes de finalizar este grabado. La etapa que venía a continuación era una de las más críticas del proceso de fabricación.

Grabado de las cavidades		
16. Grabado profundo del silicio DRIE (A601-ING) (425-450 μm): cara dorso		1 - 4


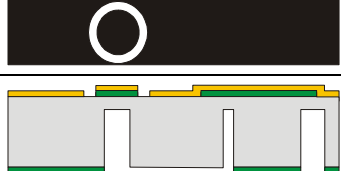
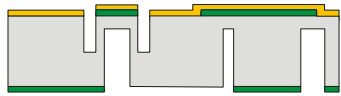
Había que realizar un ataque seco profundo de 400-450 μm de silicio (A601-ING) para empezar a fabricar las cavidades por la cara dorso. El grabado no podía superar las 450 μm de silicio porque la oblea era de 500 μm y todavía se iba a realizar una etapa fotolitográfica con su posterior grabado profundo por la cara componentes. Estas 50 μm de grosor en la oblea hacían posible la cuarta etapa fotolitográfica, un espesor menor podía hacer que la oblea se rompiera en este paso. Como el ataque profundo no es uniforme en toda la oblea, se midió el espesor atacado en 5 puntos de la oblea, el punto 1 corresponde al centro de la oblea y los puntos 2-5 a los cuatro bordes de la misma. La Tabla 4.V muestra la profundidad de silicio grabada en esta etapa para la oblea 2, obteniéndose una profundidad media de $404 \pm 25 \mu\text{m}$. Esto dejaba un espesor aproximado de 96 μm para poder realizar el último paso fotolitográfico por la cara componentes.

Tabla 4.V: Profundidad de silicio grabada por la cara dorso de la oblea 2 con la máscara CORTE.

Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4	Punto5
444 μm	410 μm	377 μm	397 μm	391 μm



4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

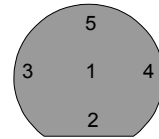
Definición anillos para las conexiones de los tubos		
17. Decapado de resina (DEC-RESI)		1 - 4
18. Etapa Fotolitografía como estándar obleas 2 caras FOTO-FCD sin protección cara dorso pero con resina maP-1275 (FOTO-ING): cara componentes Máscara: CNM231-TUB		1 - 4
19. Grabado profundo del silicio DRIE (A601-ING) (250-300 μm): cara componentes		1 - 4

Realizado el grabado del rebaje y de las cavidades por la cara dorso de la oblea, se decapó la resina (**DEC-RESI**). Este paso se pudo hacer con plasma de O₂ porque el equipo ya estaba operativo. A continuación se definió el anillo para conectar los tubos al chip por la cara componentes con la última fotolitografía. En esta etapa fotolitográfica (**FOTO-ING**) se depositó resina maP-1275 por la cara componentes. No se protegió la cara dorso con resina de protección porque ya estaba mecanizada. El alineamiento se realizó contra los motivos realizados con la máscara PIPETA de la primera fotolitografía. Los ataques profundos realizados en la cara dorso producían pérdidas en el vacío del *spinner*, lo que implicó depositar la resina utilizando un spinner especial para obleas con cavidades grabadas por la cara dorso, pero el grosor de la capa depositada no era uniforme.

Las medidas dieron resultados diferentes dependiendo de la zona de la oblea donde se midieron, obteniendo valores que oscilaban entre 7.8 μm y 9.4 μm. Esta capa iba a ser utilizada como máscara en un ataque seco profundo, esto significaba que el grosor depositado era suficiente y no era crucial el hecho que el grosor no hubiera quedado uniforme. Con el anillo para el tubo de conexión definido en la cara componentes de la oblea en la etapa de fotolito, el siguiente paso a realizar era el grabado de las cavidades con un ataque seco profundo. Se han de atacar entre 250 y 300 μm de silicio para poder conectar el tubo con facilidad. No se debería sobrepasar las 300 μm porque los ataques realizados por la cara componentes podrían conectar con los DRIE realizados por la cara dorso. El resultado de este ataque para los cinco puntos de la oblea 2 se muestra en la Tabla 4.VI.

Tabla 4.VI: Profundidad de silicio grabado en cara componentes de la oblea 2 con la máscara TUB

Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4	Punto 5
258 μm	245 μm	245 μm	245 μm	253 μm



Definición depósito		
<p>20. Grabado profundo del silicio DRIE (A601-ING) (50-100 μm): cara dorso</p>		1 - 4

Una vez fabricadas las conexiones de los tubos, había que realizar el tercer y último grabado DRIE **(A601-ING)** para definir el depósito y terminar de grabar la cavidad de entrada, la cavidad de la zona de conexión, liberar las puntas y definir el chip con las tres micro/nanopipetas. La oblea estaba mecanizada, lo que significaba que empezaba a ser frágil. Para no excedernos con el ataque se realizó un primer grabado de 10 min.

Pasado este tiempo, se inspeccionó la oblea en el microscopio y se observó que el chip empezaba a estar definido porque las trincheras habían empezado a abrirse. Al proseguir con el ataque, había que bajar la presión del helio a 200 Pa para regular el caudal, esto es debido a la apertura de las cavidades que definían el chip. Después de 6 min más de ataque, las cavidades de entrada y las trincheras que definían el chip habían quedado abiertas. La Figura 4.15(a) muestra la cara componentes de un chip después de realizar el DRIE rebaje. En esta imagen se ha marcado el motivo de test DRIE1 para el ataque después del DRIE. Se puede observar como el motivo ha quedado abierto indicando la abertura de las cavidades.

Esto significa, tal como muestra la figura, que la cavidad de entrada ha quedado abierta sin sobrepasar las dimensiones de anchura marcadas por la capa de óxido estructurada. La Figura 4.15(b) muestra el aspecto final que mostraba uno de los motivos diseñados para controlar el sobreataque después de realizar el grabado DRIE. En esta ocasión se observó un sobreataque de 40 μm .

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

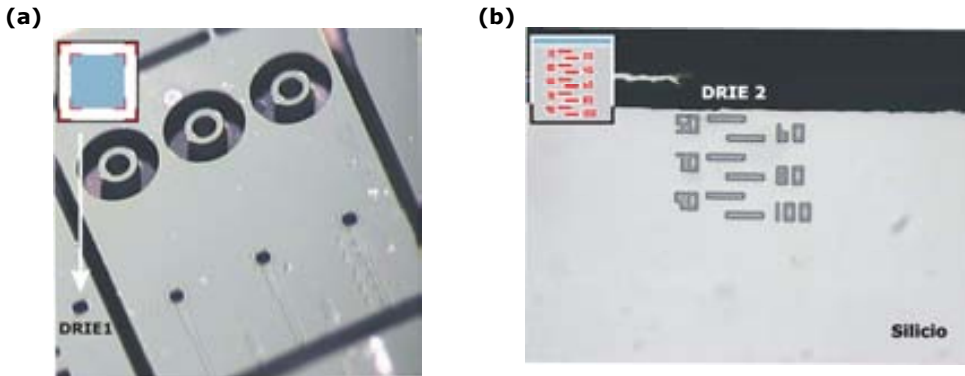


Figura 4.15: Imágenes ópticas de (a) motivo test DRIE1 indicativo de la apertura de la cavidad de entrada abierto y (b) motivo DRIE2 indicando el sobreataque producido por el grabado seco profundo rebaje.

El aspecto que ofrecía la punta de óxido de silicio en voladizo de las micro/nanopipetas de la segunda generación después de la apertura de la cavidad que definía el chip y liberaba la punta se muestra en la Figura 4.16. A modo de ejemplo se han escogido dos puntas de 2 y 1 μm de ancho.

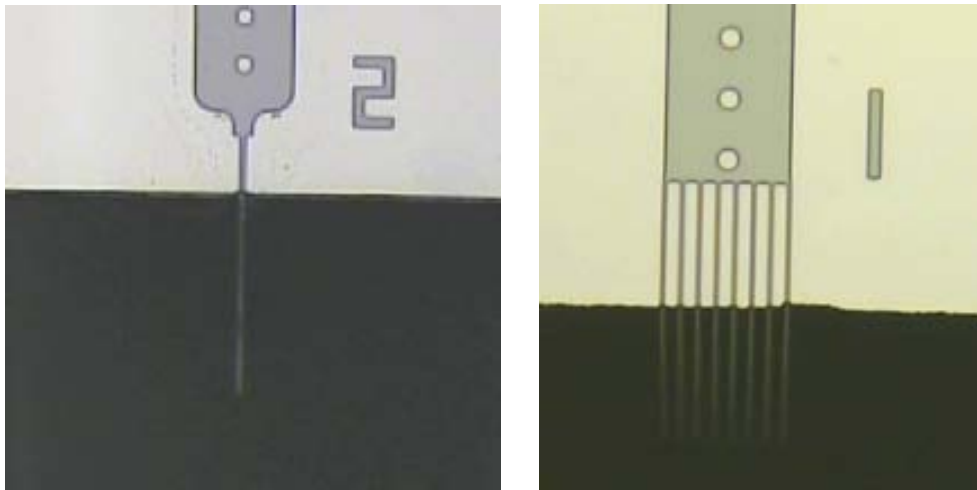
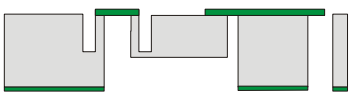
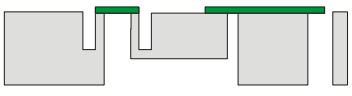
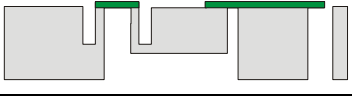



Figura 4.16: Imágenes ópticas de dos tipo de punta de micro/nanopipeta de la segunda generación en voladizo con anchura de (a) 2 μm y (b) 1 μm .

Deposición de la capa estructural		
21. Decapado de resina (DEC-RESI)		1 - 4
21. Grabado de la capa de óxido de la cara dorso (GGIR-ESP)		1 - 4
22. Decapado del óxido de silicio nativo (GHUM-ESP) como QPRMEC25 pero con secado en estufa de nitrógeno.		1 - 4
23. Deposición de 0.5 μm de poliSi LPCVD (DPOLSENA)		1 - 4

Una vez definidos los chips, se decapó la resina con plasma (**DEC-RESI**). Después del grabado profundo, la resina se había dañado con los gases y la superficie de la oblea no quedaba completamente limpia tras el decapado con el plasma de oxígeno, como muestra la imagen de la Figura 4.17(a). Como había que depositar la capa estructural de polisilicio para definir las paredes de los canales, no podían quedar restos de resina sobre la superficie de la oblea. Por este motivo se sumergió la oblea en acetona y en piraña ($H_2SO_4:H_2O_2$, 2:1). Para evitar que las burbujas de la solución piraña dañen las puntas, se deja reposar la mezcla unos minutos. La Figura 4.17(b) muestra la superficie completamente limpia de un chip después de este proceso. Se vuelve a introducir la oblea en el plasma para descartar la posibilidad de la fina capa de resina. No cambia el aspecto de la superficie. Ha quedado dañada después del grabado profundo.

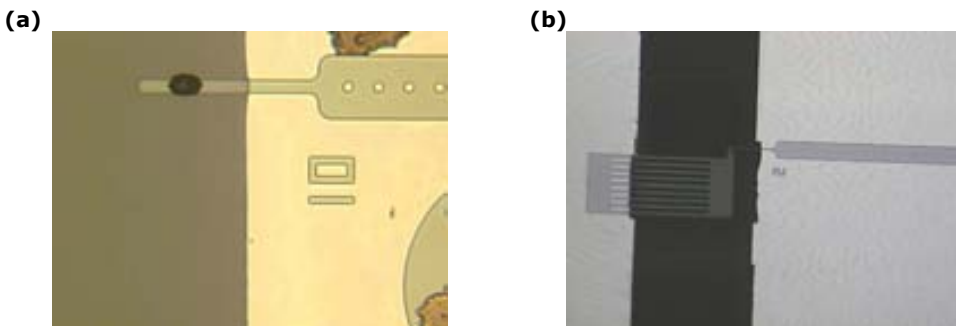


Figura 4.17: Imágenes de microscopio óptico de (a) una punta antes (a) y (b) otra punta después del proceso de limpieza de la resina.

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

Una de las razones de escoger el polisilicio como capa estructural se debe a la conformidad que presenta este material, es decir, la facilidad que tiene para adoptar la forma del material que recubre. Esta condición presentaba un problema para la cavidad de entrada dada la dificultad encontrada durante el proceso de fabricación de la primera generación para abrirla cuando el polisilicio la había cubierto. Para tratar de evitar que el polisilicio cubriera la cavidad de entrada, se colocó una oblea de silicio soporte en contacto con la oblea mecanizada.

La cara rugosa de la oblea estaba en contacto con la oblea que contenía las micro/nanopipetas para evitar que las obleas quedaran unidas durante el proceso de deposición del polisilicio. Las obleas fueron introducidas en el horno de manera horizontal, tal como muestra la Figura 4.18(a). Se pusieron obleas de manera vertical a modo de pantalla para evitar que el venteo del horno moviera las obleas horizontales. La Figura 4.18(b) muestra en detalle la oblea mecanizada antes de entrar en el horno.

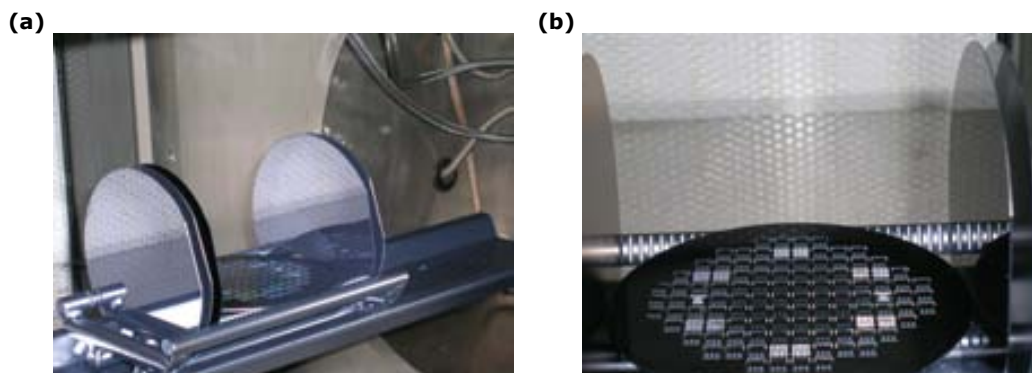


Figura 4.18: (a) Montaje de la oblea mecanizada para la deposición del polisilicio y (b) detalle de la oblea mecanizada.

Una vez finalizado el proceso de deposición del polisilicio, las obleas fueron extraídas del horno. Al separarlas, se observó como los chips habían quedado dibujados sobre la oblea soporte (Figura 4.19a). Esto significaba que el polisilicio se había introducido por las trincheras y probablemente habría tapado la cavidad de entrada de la micro/nanopipeta. Para comprobarlo, había que introducir un chip en HF 49%. Si la capa sacrificial de óxido no se atacaba implicaría que la cavidad había quedado cerrada. Después de dejar el chip sumergido durante 30 min en el reactivo, se aclaró con agua y se inspecciono con un microscopio óptico.

Como muestra la imagen tomada de la Figura 4.19b no se observó ningún cambio en las estructuras de test realizadas para controlar el ataque, el HF no había tenido acceso a la capa sacrificial de óxido porque había una capa de polisilicio que recubría la cavidad de entrada.

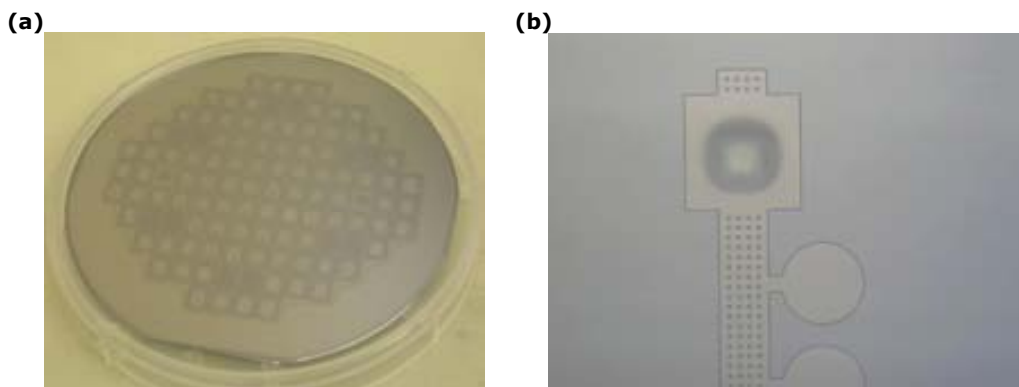


Figura 4.19: (a) Imagen de la oblea soporte utilizada durante la deposición de polisilicio e (b) imagen de microscopio óptico de los motivos de test de ataque sacrificial después del tener sumergido el chip en HF 49% durante 30 min.

Definición canal: Ataque capa de óxido		
<p>24. Grabado profundo del polisilicio DRIE (A601-ING) (0.5 μm): cara dorso</p>		1 - 4
<p>25. Recuperación de los chips individuales y ataque de la capa sacrificial en HF 49% (FEIN-ESP)</p>		1 - 4
<p>26. Oxidación polisilicio (OHC-8000)</p>		1 - 4

Para poder acceder a la capa de óxido, debía abrirse la cavidad de entrada. El ataque en TMAH no había funcionado para la primera generación y la abertura utilizando FIB era un proceso muy lento y encarecía el proceso de fabricación. Por estos motivos se creyó conveniente realizar un grabado seco DRIE (**A601-ING**). Con esta opción surgía un problema, el gas utilizado podría atacar el polisilicio que recubría el cuerpo de las micro/nanopipetas en general y el de las puntas en particular. Esto significaba tener que proteger la cara componentes y las puntas con fotoresina. Para realizarlo, se colocaron los chips con las micro/nanopipetas sobre

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

otra oblea de silicio soporte. La cara componente de los chips estaba en contacto con la oblea. A continuación se depositó una gota de resina cerca del extremo del chip. La resina, al entrar en contacto con el chip, recubrió las puntas y la cara componentes como se muestra en la Figura 4.20. Cuando todos los chips quedaron protegidos por la resina, se introdujo la oblea en una estufa a 100°C para recocerla.

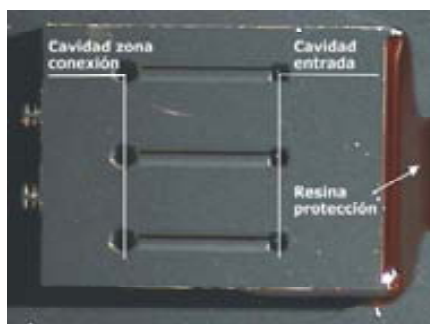
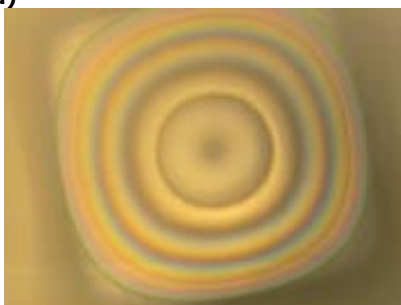


Figura 4.20: Imagen de un chip preparado para abrir la cavidad de entrada con un grabado DRIE.

Como el polisilicio se encontraba en las cavidades de entrada cuadradas de 200 μm de lado y 500 μm de profundidad, se realizó un sobreataque para asegurar que se abrieran las cavidades de entrada. Las cavidades de los chips se inspeccionaron con un microscopio óptico y se observó que se había abierto la capa de polisilicio que las recubría como muestra la Figura 4.21a. La oblea soporte se sumergió en acetona para diluir la resina y recuperar los chips (FEIN-ESP). A continuación se sumergieron los chips en HF 49% para grabar la capa sacrificial y definir el canal. Uno de los chips fue sacado del reactivo para comprobar la evolución del ataque. La Figura 4.21b muestra una imagen tomada con un microscopio óptico. Se puede observar como el ataque había comenzado y se podía seguir fácilmente su evolución con los motivos test control de ataque, diseñados para tal fin.

(a)



(b)



Figura 4.21: (a) Imágenes de microscopio óptico de una cavidad de entrada con el polisilicio abierto y (b) de los motivos de test ataque sacrificial durante el grabado en HF de la capa sacrificial.

Una vez atacada la capa de óxido sacrificial y definido el canal había que convertir las paredes opacas del polisilicio en transparentes para poder utilizar las micro/nanopipetas en aplicaciones biológicas. Se depositaron los chips sobre una oblea soporte y se introdujeron en el horno para su oxidación (**OCH-8000**). Para asegurar que todo el polisilicio se oxidaba, se realizó el proceso para obtener una capa de óxido de 8000 Å. La capa de óxido medida en la oblea de test dió como resultado 7987 ± 10 Å de grosor.

La Figura 4.22 muestra dos imágenes obtenidas con un microscopio óptico del canal de una micro/nanopipeta antes (a) y después (b) del proceso de oxidación de la capa de polisilicio. Se puede observar como cambia el aspecto de la capa estructural, transformándose de opaca a transparente. Además también se puede observar en la Figura 4.22b como se estresa la capa estructural después del proceso de oxidación.

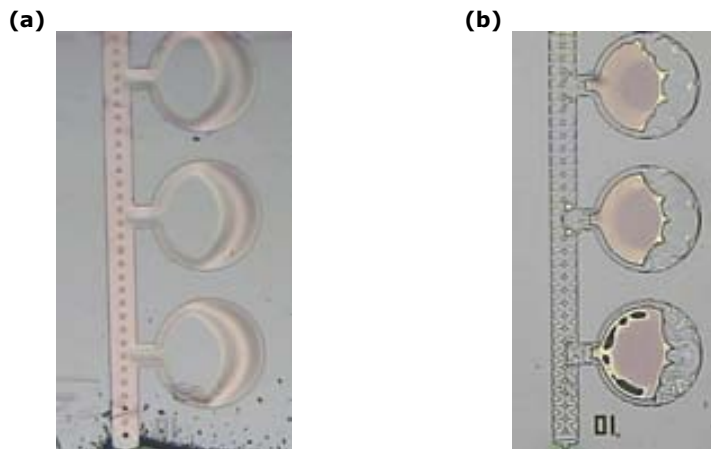


Figura 4.22: Imágenes de microscopio óptico del canal de una micro/nanopipeta de $10 \mu\text{m}$ antes (a) y después (b) del proceso de oxidación del polisilicio.

Una vez obtenidas las paredes transparentes de las paredes del canal, había que cubrir el canal del depósito de la cara dorso del chip y realizar las conexiones. Al haber realizado una oxidación para convertir el polisilicio a óxido de silicio, había crecido una capa de óxido por la cara dorso del chip. Esta capa impedía cubrir el depósito con un chip de vidrio realizando una soldadura anódica. Además esta tecnología no había impedido que al depositar polisilicio se tapara la cavidad de entrada.

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

La elección de una oblea soporte en la etapa de deposición de polisilicio no había evitado que el material escogido para actuar como capa estructural sellara la cavidad de entrada. Esto era sucedido porque el polisilicio se deposita en fase gas. Para evitar que el polisilicio llegara a la cavidad de entrada, una posible estrategia sería poner una oblea soporte totalmente unida y sellada a la oblea que contenía los chips. Pero si la oblea soporte quedaba soldada nos impediría obtener los chips con la técnica de *Manual Cleaving* y tendríamos los problemas observados en la etapa del serrado del proceso de fabricación de las micro/nanopipetas de la primera generación. Además esta oblea soporte impediría que se pudiera observar que ocurría en el canal-depósito de la cara dorso del chip.

4.4.4 Proceso de fabricación micro/nanopipetas con capa estructural de óxido de silicio depositado

Debido a la necesidad de obtener dispositivos con las paredes transparentes y no habiendo evitado la entrada de la capa estructural de polisilicio en la cavidad de entrada y ni el crecimiento de una capa de óxido en la cara dorso del chip que dificultaba la soldadura anódica del chip de silicio al chip de vidrio, al realizar la oxidación de la capa de polisilicio para convertirla en un material transparente, se decidió depositar directamente una capa de óxido de silicio como capa estructural.

4.4.4.1 Estudio de la capa sacrificial adecuada para capa estructural de óxido de silicio depositado

La definición de nuevos materiales como capa estructural y sacrificial para la fabricación inició una búsqueda dentro de los materiales utilizados normalmente en tecnología de microsistemas. El hecho de necesitar una pared del canal transparente hizo que se escogiese óxido de silicio como capa estructural. Como esta condición era necesaria para poder trabajar con células esta búsqueda se centró en el material de la capa sacrificial.

Este material debería soportar las condiciones de deposición de la capa de óxido de silicio y además su grabado debería ser selectivo, es decir, el reactivo que se utilizara para su eliminación no podía dañar la capa estructural de óxido.

Se lanzó un run para realizar pruebas de ataque de dos materiales diferentes como capa sacrificial y cuyo ataque fuese selectivo al óxido de silicio utilizado como capa estructural.


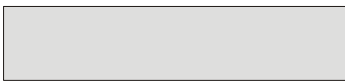

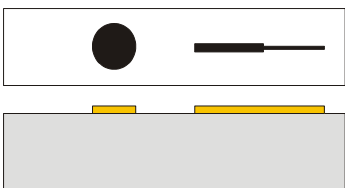
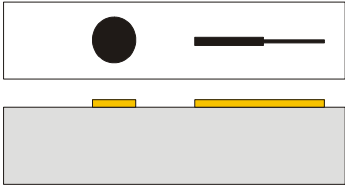
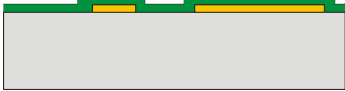
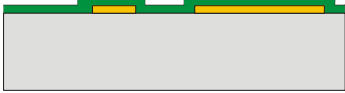
Los materiales escogidos para actuar como capa sacrificial fueron resina y aluminio [5]. Los procesos de grabado o eliminación de estos materiales eran selectivos con el óxido. Para disolver la resina se sumergieron los dispositivos fabricados en acetona a una temperatura de 40°C. La temperatura de la solución no podía sobrepasar los 55°C, ya que a esta temperatura la acetona empezaba a hervir y se evaporaba más rápidamente.

Para grabar el aluminio en el IMB-CNM se utiliza una solución comercial denominada Defreckling Aluminum Etch (DAE, Fujifilm Electronic Materials, Bélgica). Esta solución es una mezcla de ácido acético, fluorobórico, nítrico y fosfórico, pero los tiempos de ataque son muy lentos para los dispositivos presentados en este capítulo al estar definidos por un microcanal. Finalmente se escogió una mezcla formada por HCl:HNO₃ (2:1) a 80°C utilizada para grabar aluminio en la fabricación de microcanales para utilizarlos en experimentos de electroforesis capilar o como guías de onda [6, 7]

4.4.4.1.1 Resina como capa sacrificial

En el caso de la capa sacrificial formada por fotoresina había que comprobar que la capa de óxido de silicio depositada recubría totalmente el grosor de la capa de resina, el aspecto que tendría la fotoresina y el óxido de silicio una vez depositada la capa estructural, y el grosor de capa sacrificial que se podría recubrir con el óxido de silicio depositado. Para realizar el estudio, se depositaron y estructuraron dos capas de resina de dos grosores diferentes. Había que tener en cuenta que la temperatura de deposición del óxido vendría condicionada por la temperatura que podría soportar la capa de resina.

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

Run 3731 – Capa sacrificial resina		
1. INICIO		1 - 4
2. Marcar las obleas (MARC-PAA)		1 - 4
3. Limpieza general (NETG-GEN)		1 - 4
4. Fotolitografía Standard (FOTO-STU) por cara componentes Máscara: CNM231-PIP		1 - 2
5. Fotolitografía Especial (FOTO-ESP) por cara componentes, depositando 2 μm de resina Máscara: CNM231-PIP		3 - 4
6. Deposición 0.5 μm óxido de silicio por cara componentes (DPLA-ING). Depositar óxido a baja temperatura (100°C)		1 - 4
7. FINAL		1 - 4

Después de marcar (**MARC-PAA**) y limpiar (**NETG-GEN**) 4 obleas, se definieron dos etapas fotolitográficas diferentes para depositar dos capas de resina con grosores diferentes. Con la fotolito Standard (**FOTO-STU**) se depositó sobre la cara componentes de las obleas 1-2 una capa de resina HPIR-65132 con un grosor de 1.2 μm. Para las obleas 3-4 el grosor de la capa de resina fue de 2 μm, depositada y estructurada con una etapa de fotolitografía especial (**FOTO-ESP**). Se utilizó la máscara CNM231-PIP porque el estudio podía variar dependiendo de la anchura y longitud de los dispositivos a fabricar.

Una vez definidos los motivos sobre la resina, se depositaron 0.5 μm de óxido de silicio PECVD (**DPLA-ING**) sobre dos obleas con grosores diferentes de la capa

de fotoresina. Este tipo de óxido normalmente se deposita a 380°C, pero esta temperatura puede hacer que la resina se queme, este fue el motivo para depositar el óxido a 100°C [8]. Al realizar la deposición a esta temperatura se obtiene un óxido de peor calidad. Se midió la capa de óxido depositada en las obleas de test obteniendo como resultado $3497 \pm 260 \text{ \AA}$ para la oblea 1 y $4449 \pm 230 \text{ \AA}$ para la oblea 3.

La primera prueba realizada fue comprobar la porosidad de la capa de óxido depositada. Se partieron las obleas en cuatro trozos con una punta de diamante. Para observar el aspecto de la capa sacrificial, la oblea 1 fue inspeccionada con un microscopio óptico. Se observaron unos puntos, mostrados en la Figura 4.23a debidos al estrés que aparecía en la capa de la resina al depositar el óxido. Para comprobar la porosidad de la capa de óxido depositada, se sumergió un cuarto de la oblea 1 en acetona a 40°C. Pasados 5 minutos, se extrajo la muestra y se aclaró en IPA. El resultado obtenido puede observarse en la Figura 4.23b. La acetona se había introducido por los poros de la capa de óxido y había disuelto la capa de la resina de manera poco homogénea. La aparición de estreses en la capa de resina al depositar la capa de óxido y la porosidad que presentaba la capa de óxido depositada hicieron descartar la resina como material para utilizar como capa sacrificial en la fabricación de las micro/nanopipetas.

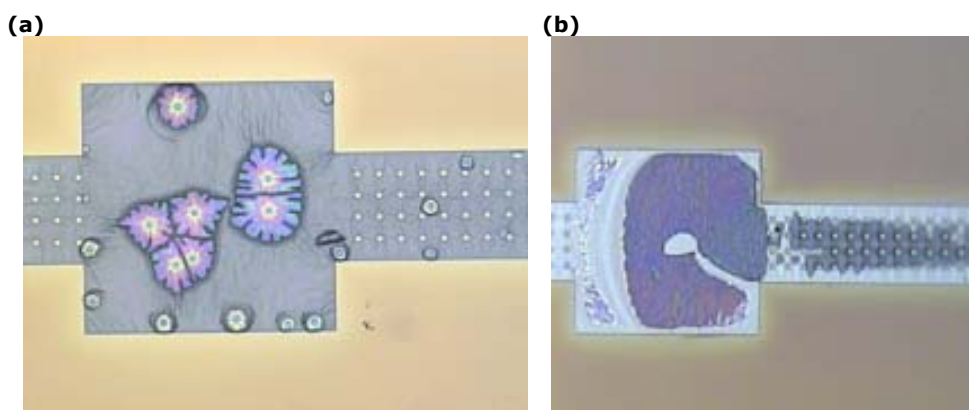



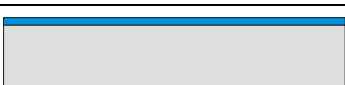
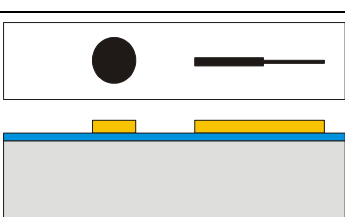
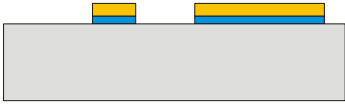


Figura 4.23: Imagen óptica de la capa sacrificial de resina (a) antes y (b) después de la eliminación en acetona

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

4.4.4.1.2 Aluminio como capa sacrificial

En el caso de la capa sacrificial de aluminio, como en el caso de la resina, también había que comprobar que la capa de óxido de silicio depositada recubría totalmente el grosor de la capa de aluminio, el aspecto que tendría el aluminio y el óxido de silicio una vez depositado y el grosor de aluminio que se podría recubrir totalmente con el óxido de silicio depositado. Para realizar el estudio, se depositaron y estructuraron dos capas de aluminio con dos grosores diferentes.

Run 3731 - Capa sacrificial Aluminio		
1. INICIO		1 - 4
2. Marcar las obleas (MARC-PAA) y		1 - 4
3. Limpieza general (NETG-GEN)		1 - 4
4. Deposición de 1-2 μm de aluminio por cara componentes (MZ550ING)		1 - 4
5. Fotolitografía antirreflectante en aluminio (FOTO-SAR) por cara componentes Máscara: CNM231-PIP		1 - 4
6. Grabado del Al en el QUAD (PQ2ALXXX)		1 - 4

Se marcaron (**MARC-PAA**) y limpiaron (**NETG-GEN**) 4 obleas para depositar una capa de aluminio (**MZ550ING**). Se escogieron dos grosores diferentes de aluminio para poder estudiar, como en el caso de la resina, si el óxido depositado podía recubrir totalmente el grosor de la capa de aluminio depositado y si la capa de óxido se estresaría y/o quedaría porosa al recubrir la capa de aluminio. Los grosores de aluminio escogidos fueron de 1 μm para las obleas 1-2 y de 2 μm para las obleas

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

3-4. Después de depositar el aluminio se realizó una fotolito utilizando resina antireflejante (**FOTO-SAR**). Al realizar la primera fotolitografía sobre el aluminio, la máscara utilizada (CNM231-PIP) quedó manchada con restos de resina. Esta mancha se imprimió en fotolitos sucesivas. Al inspeccionar la oblea, se observó que sólo había un dispositivo afectado, con lo que se decidió continuar con el run. La máscara se limpió fácilmente.

La capa de aluminio fue estructurada grabando el aluminio en el QUAD (**PQ2ALXXX**). Después de realizar el primer grabado de aluminio se observó la aparición de unos puntos negros en la parte central de la oblea. Un detalle de estos puntos en dos de las micro/nanopipetas puede observarse en la Figura 4.24. Estos puntos podían ser restos de polímero o una combinación de polímero y aluminio.

Si se sobreatacaba, no mejoraba el aspecto y se podían perder las dimensiones de los dispositivos más pequeños. Finalmente, se concluyó que estos puntos eran consecuencia del sobreataque del aluminio porque había más superficie de aluminio expuesta que de resina y se continuó con el run.

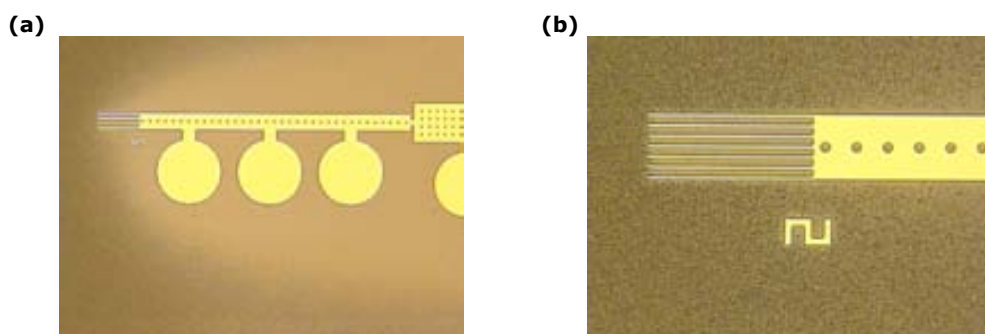




Figura 4.24: Detalle de la parte central de la primera oblea de (a) una micro/nanopipeta de 5 μm y (b) de 2 μm después del grabado del aluminio.

Deposición de 0.5 μm de óxido de silicio		
7. Limpieza con agua de obleas con metal (NETGH2OC)		1 - 4
8. Deposición 0.5 μm óxido de silicio por cara componentes (DPLA-ING). Depositar óxido a 380°C		1,3

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

Antes de depositar la capa de óxido de silicio, se limpiaron con agua las obleas **(NETGH20)**. Se depositaron 0.5 μm de de óxido de silicio **(DPLA-ING)** a 380°C sobre dos obleas con espesores diferentes de la capa de aluminio. Los resultados obtenidos al medir el grosor de la capa de óxido de silicio sobre las obleas de test fueron de 5378±174 Å para la oblea 1, 5441±220 Å para la oblea 3. Para comprobar la porosidad del óxido depositado en las obleas con capa sacrificial de aluminio, se partieron las obleas en cuartos con una punta de diamante y se sumergió un cuarto de la oblea 1 con 1 μm de grosor de la capa de aluminio y otro cuarto de la oblea 3 con 2 μm de capa de aluminio en una solución de HCl:HNO₃ (2:1) a 80°C. Pasados 20 minutos, se extrajeron los trozos de oblea y se aclararon con agua.

Una vez secos se inspeccionaron utilizando un microscopio óptico. El resultado obtenido se muestra en la Figura 4.25. Se observó una clara diferencia entre la zona donde se había atacado el aluminio y la zona donde todavía quedaba la capa de aluminio sin atacar. La capa estructural de óxido facilitaba la inspección y por lo tanto el seguimiento del grabado de la capa sacrificial. El hecho que se hubiese atacado la capa de aluminio sin haber abierto la capa de óxido que la recubría, significaba que la capa estructural depositada contenía algunos poros. Había que mejorar la deposición del óxido de silicio para minimizar al máximo la aparición de poros en la capa estructural.

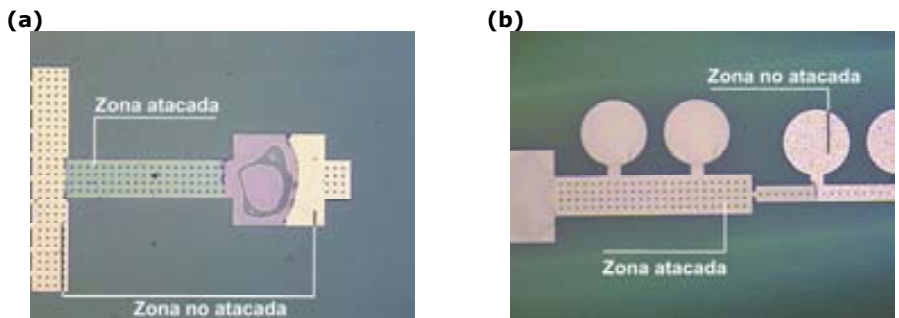


Figura 4.25: Imágenes ópticas obtenidas después de 20 minutos de ataque de la capa de aluminio para (a) la oblea 1 y (b) la oblea 3

Deposición de 0.5 μm de óxido de silicio y 0.5 μm de nitruro de silicio		
<p>9. Deposición 0.25 μm óxido de silicio por cara componentes (DPLA-ING). Depositar óxido a 380°C. Depositar 0.25 μm de nitruro de silicio</p>		4

Para conseguir disminuir el número de poros en la capa estructural, se combinó la deposición de óxido de silicio con la deposición de nitruro de silicio. Se realizó una prueba con la oblea 4. Sobre esta oblea se depositaron a 380 °C 0.25 μm de óxido de silicio PECVD, después de parar el plasma se depositaron 0.25 μm de nitruro de silicio **(DPLA-ING)**. Se dividió la oblea en cuartos con una punta de diamante y se sumergió uno de los cuartos durante 20 minutos en la solución HCl:HNO₃ (2:1) a 80°C. A continuación se aclaró la muestra en agua y con el microscopio no se observó que la capa de aluminio estuviera grabada.

La combinación de óxido y nitruro habían disminuido hasta eliminar la porosidad de la capa estructural como muestra la imagen tomada con el microscopio óptico de la Figura 4.26a. En el cuarto de oblea utilizado, había muestras donde al partir la oblea, se había abierto el canal de la micro/nanopipeta y se observó que la capa de aluminio se había grabado.

En estas muestras se comprobó que la capa estructural no quedaba intacta después del grabado. Al desaparecer la capa de aluminio, la capa estructural se quebraba y se rompía como muestra la Figura 4.26b. La introducción de nitruro implicó la aparición de estreses en la capa estructural, convirtiéndola en más frágil y provocando su ruptura una vez grabada la capa de aluminio. La combinación de óxido y nitruro de silicio como capa estructural no había sido una buena solución.

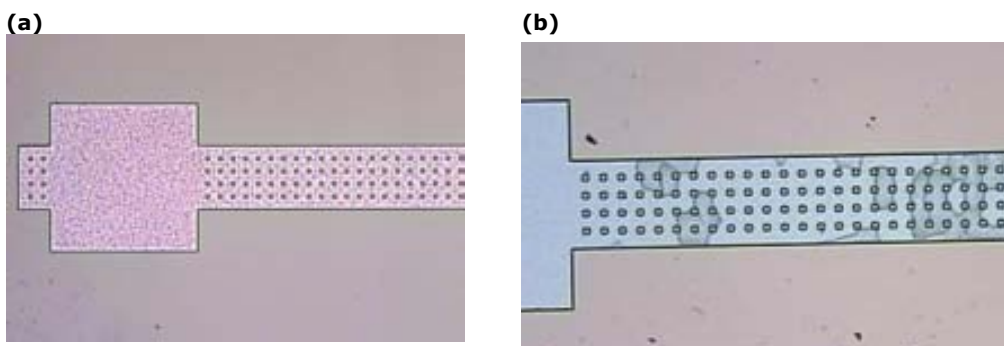
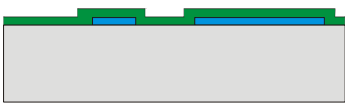



Figura 4.26: Imagen óptica de la zona de la membrana de una micro/nanopipeta después de 20 min en solución HCl:HNO₃ (a) motivo totalmente cubierto por la capa de óxido y nitruro y (b) motivo con la capa de aluminio completamente atacada.

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

Deposición de 1 μm de óxido de silicio en dos depósitos de 0.5 μm		
10. Deposición 1 μm óxido de silicio por cara componentes (DPLA-ING). Realizar dos depósitos de 0.5 μm		2
11. FINAL		1 - 4

El hecho de realizar dos deposiciones diferentes para conseguir el grosor de la capa estructural deseado parecía que reducía la formación de poros. Esto condujo a efectuar una tercera prueba con la oblea 2 realizando dos depósitos de 0.5 μm de óxido de silicio (**DPLA-ING**) para definir la capa estructural. Una vez depositado el óxido, se partió la oblea en tiras con la ayuda de una punta de diamante. Una de estas tiras se sumergió durante 1h en la solución HCl:HNO₃ (2:1) a 80°C. Pasado este tiempo, se inspeccionó la tira con un microscopio óptico. Se observó que el grabado de aluminio había comenzado en algunas muestras. Algunas de estas muestras tenían el microcanal abierto debido al corte realizado en la oblea como se muestra en la Figura 4.27a.

Otras en cambio, a pesar de tener la capa estructural envolviendo todo el aluminio, el reactivo había entrado y había empezado a grabar la capa de aluminio como se muestra en la Figura 4.27b. Este hecho demostraba que realizando dos depósitos de óxido de silicio también aparecían poros en la capa estructural.

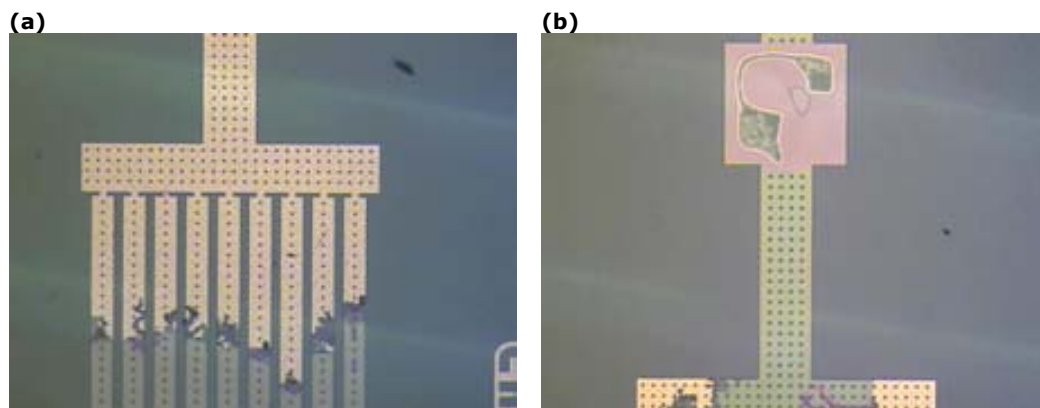


Figura 4.27: Imágenes ópticas de la evolución del grabado del Aluminio en muestras con (a) microcanal abierto y (b) microcanal con poros

Observando en el microscopio, parecía que el número de muestras que presentaban porosidad había disminuido. Para poder confirmar este hecho, se depositó óxido sobre dos obleas que tenían estructurados unos motivos de aluminio con un grosor de $1\ \mu\text{m}$ siguiendo dos procedimientos diferentes. El primer proceso consistió en realizar dos deposiciones de óxido de $3000\ \text{Å}$ a 380°C utilizando un caudal de $\text{SiH}_4/\text{N}_2\text{O}$ de 25/500. En el segundo proceso se realizó una única deposición de óxido de silicio de $6000\ \text{Å}$ a 300°C con un caudal de $\text{SiH}_4/\text{N}_2\text{O}$ de 20/500. Se partieron estas obleas en cuartos y se sumergió un cuarto de cada oblea durante 20 minutos en una solución de $\text{HCl}:\text{HNO}_3$ (2:1) a 80°C . Pasado este tiempo, se retiraron los cuartos de oblea de la solución reactiva, se aclararon en agua y se inspeccionaron con la ayuda de un microscopio óptico. Se observó que había motivos atacados en los dos cuartos de oblea, pero el número de motivos atacados en el cuarto que correspondía al segundo proceso era mucho mayor. Se calculó el porcentaje de motivos atacados para cada proceso dando como resultado 11.90% para el cuarto de oblea que correspondía a dos deposiciones de óxido de $3000\ \text{Å}$ y el 78.51% de motivos atacados para el cuarto de oblea con una única deposición de $6000\ \text{Å}$. Aunque las dos deposiciones de óxido para definir la capa estructural no eliminaban totalmente la porosidad existente, si que la reducían de manera sustancial y aumentaba el rendimiento de dispositivos sin atacar hasta un 90 %.

Los resultados obtenidos de un 88.10% de motivos sin atacar, condujeron a la elección de aluminio como material para la capa sacrificial utilizando una capa de óxido de silicio como capa estructural. Para disminuir la porosidad de la capa estructural, se decidió realizar dos deposiciones de óxido de silicio para conseguir el grosor deseado de las paredes del microcanal definidas por la capa estructural.

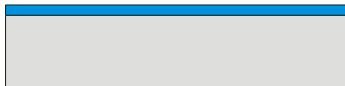
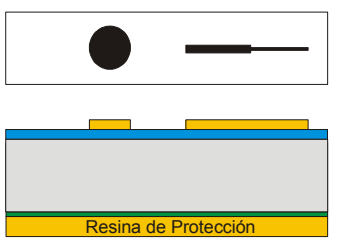
4.4.4.2 Proceso de fabricación en Sala Blanca

Una vez escogidos los nuevos materiales para definir la capa estructural y la capa sacrificial de las micro/nanopipetas, se procedió a definir las etapas a seguir en el run para el proceso de fabricación de los dispositivos. El aluminio se depositó como capa sacrificial. Para intentar recubrir todo el aluminio que definía la punta de la micro/nanopipeta con el óxido de silicio PECVD se realizaría un depósito por la cara componentes y otro por la cara dorso.

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

Run 3759 - PIP		
1. INICIO		1 - 4
2. Marcar las obleas (500 µm) (MARC-PXB) y		1 - 4
3. Limpieza piraña + dip HF (NETG-GEN)		1 - 4
4. Deposición de 1 µm de óxido sin dopar por cara dorso (DAMI-ING)		1 - 4



Se marcaron (**MARC-PXB**) y limpiaron (**NETG-GEN**) cuatro obleas de silicio de 500 µm pulidas doble cara. Por la cara dorso se depositó una capa de óxido de 1 µm (**DAMI-ING**). Una vez estructurada esta capa de óxido se utilizará como máscara para el último ataque seco DRIE por la cara posterior. El grosor de esta máscara fue calculado con las velocidades de ataque obtenidas en el apartado 4.2.1. *Run prueba definición cavidades con DRIE.*

Deposición de la capa sacrificial		
5. Deposición de 0.7 o 1.5 µm de aluminio por cara componentes con grosor (MZ550-ING)		1 - 4
6. Fotolitografía sobre aluminio (FOTO-ALH) por cara componentes. Máscara: CNM231-PIPETA		1 - 4

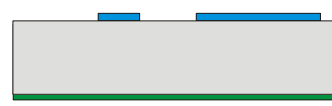
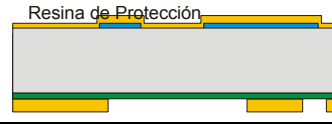

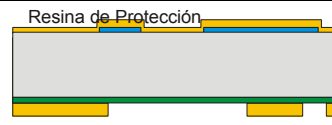

En la cara componentes se deposita una capa de aluminio (**MZ550-ING**). Esta capa se utilizará como capa sacrificial para definir el grosor y forma del microcanal.

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

Se depositaron dos espesores diferentes del orden de 0.7-1.5 μm . Por otro lado, esta capa se utilizó como capa de paro de ataque del DRIE de las cavidades. El cuerpo de la micro/nanopipeta se obtuvo estructurando la capa de aluminio o la capa de aluminio y de óxido, dependiendo de la oblea. Para obtenerlo, primero se transfirieron los motivos de la máscara CNM2321-PIPETA a la capa de aluminio en una etapa de fotolitografía (**FOTO-ALH**).

Estructuración capa sacrificial		
7. Etapa no Standard por SB (ESPECIAL) Recocido de la resina a 200°C durante 30 min		1 - 4
8. Grabado de la capa de aluminio en el QUAD (PQ2ALXXX)		1 - 4


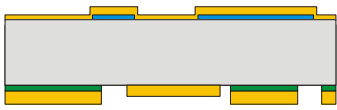

A continuación se recoció la resina a 200°C durante 30 minutos (**ESPECIAL**) para que resistiera el posterior grabado de la capa de aluminio (**PQ2ALXXX**) o grabado de la capa de aluminio y de óxido (**PGIOXGUI**) en el QUAD.

Definición de la máscara para la obtención del depósito		
9. Decapado de resina (DEC-RESI)		1 - 4
10. Etapa Fotolitografía con alineamiento doble cara (FOTO-FKD): cara dorso Máscara: CNM23-REBAJE	 	1 - 4
11. Etapa no Standard por SB (ESPECIAL) Recocido de la resina a 200°C durante 30 min		1 - 4
12. Grabado de la capa de óxido (PGIOXGUI): cara dorso		1 - 4

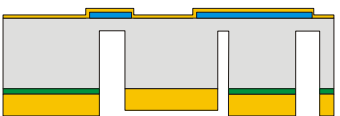
4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

Una vez estructurado el cuerpo de la micro/nanopipeta, había que realizar el rebaje por la cara dorso que definiría el canal-depósito situado en esta cara. Se decapó la resina con plasma de O₂ (**DEC-RESI**) y se realizó un proceso fotolitográfico de alineamiento doble cara (**FOTO-FKD**) por la cara posterior de la oblea para poder transferir los motivos de la máscara CNM231-REBAJE a la capa de óxido previamente depositada sobre esta cara.

Se recoció la resina a 200°C durante 30 minutos para endurecerla y que resistiera el posterior grabado de la capa de óxido por la cara dorso (**PGIOXGUI**). Esta capa de óxido actuará como máscara en el último grabado seco profundo DRIE realizado por la cara dorso.

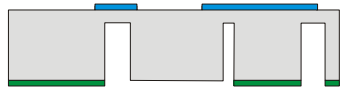
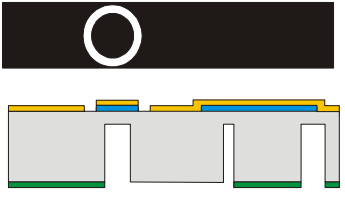
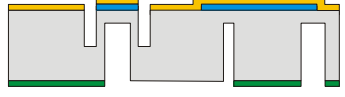
Definición de la máscara para la obtención de las cavidades		
13. Decapado de resina (DEC-RESI)		1 - 4
14. Etapa Fotolitografía con alineamiento doble cara como FOTO-FKD pero con resina maP 1275 (FOTO-ING): cara dorso Mascara: CNM231-CORTE		1 - 4
		

Tras el ataque de esta capa de óxido, se decapó la fotoresina con plasma de O₂ (**DEC-RESI**) y se realizó un segundo proceso fotolitográfico por la cara dorso (**FOTO-ING**). Esta etapa de fotolitografía transferiría los motivos de la máscara CNM231-CORTE a la oblea. La resina depositada actuaría como máscara para el primer grabado profundo seco DRIE realizado por la cara dorso de casi la totalidad del espesor de la oblea. El grosor mínimo de la resina depositada para actuar como máscara debía ser de 6.5 μm, según los resultados obtenidos en el run de prueba realizado y mostrado en el punto 4.2.1. *Run prueba definición cavidades con DRIE.*

Grabado de las cavidades		
15. Grabado profundo del silicio (400-450 μm) (A601-ING): cara dorso		1 - 4

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

Una vez definida la máscara de resina, se procedió al grabado profundo seco de las 400-450 μm de silicio (**A601-ING**). Éste ataque no se realizaría hasta el final de la oblea. Se dejarían unas 50-100 μm para poder realizar un proceso fotolitográfico adicional seguido de un ataque seco profundo DRIE por la cara componentes.

Definición anillos para las conexiones de los tubos		
16. Decapado de resina (DEC-RESI)		1 - 4
17. Etapa Fotolitografía como FOTO-FCD pero con resina maP 1275 (FOTO-ING): cara componentes Máscara: CNM231-TUB		1 - 4
18. Grabado profundo del silicio (250-300 μm) (A601-ING): cara componentes		1 - 4

Después de grabar entre 400-450 μm por la cara dorso, había que definir unos anillos por la cara componentes. Estos anillos tendrían las dimensiones necesarias para encajar los tubos externos y realizar las conexiones a los equipos de medida. Para realizarlos, se decapó la resina con plasma de O_2 (**DEC-RES**). A continuación se transfirieron los motivos de la máscara CNM231-TUB a la cara componentes de la oblea realizando la cuarta y última etapa de fotolitografía (**FOTO-ING**). Esta etapa fotolitográfica era como una fotolitografía estándar para obleas de dos caras, pero con resina maP-1275. El rebaje del anillo se consiguió realizando por la cara componentes el segundo grabado profundo seco DRIE (**A601-ING**). Este era un paso delicado porque recordemos que se había grabado prácticamente todo el grosor de la oblea en un DRIE anterior realizado por la cara dorso.

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

Definición depósito		
19. Grabado profundo del silicio (50-100 μm) (A601-ING): cara dorso		1 - 4
20. Grabado de la capa de óxido de la cara dorso (GGIR-ESP).		1 - 4
21. Decapado de resina (DEC-ESP) , como DEC-RES pero como la oblea está mecanizada hay que poner la oblea sobre una soporte de silicio		1 - 4

Una vez conseguido con éxito los rebajes de los anillos para conectar los tubos exteriores, había que abrir las cavidades y definir el chip en un último grabado DRIE realizado desde la cara dorso **(A601-ING)**. Este ataque profundo llegaría hasta la cara componentes abriendo las cavidades de la zona de conexión y de entrada al microcanal y liberaría la punta. Varios tipos de puntas de aluminio liberadas se muestran en la Figura 4.28. Se puede observar como las puntas habían quedado bien definidas en aluminio y habían aguantado el grabado profundo seco realizado desde la cara dorso. Este DRIE también realizaría el canal-depósito que comunicaría la cavidad de entrada a la pipeta y la cavidad de la zona de conexión. Una vez realizado todos los ataques secos profundos se quitó la capa de óxido de la cara dorso de la oblea **(GGIR-ESP)** para poder realizar la soldadura anódica posterior con el objeto de cubrir los canales y se decapó la resina **(DEC-ESP)**. El decapado de la resina se realizó con plasma de O_2 , pero como estaba mecanizada, se colocó una oblea de silicio para que hiciera de pantalla.

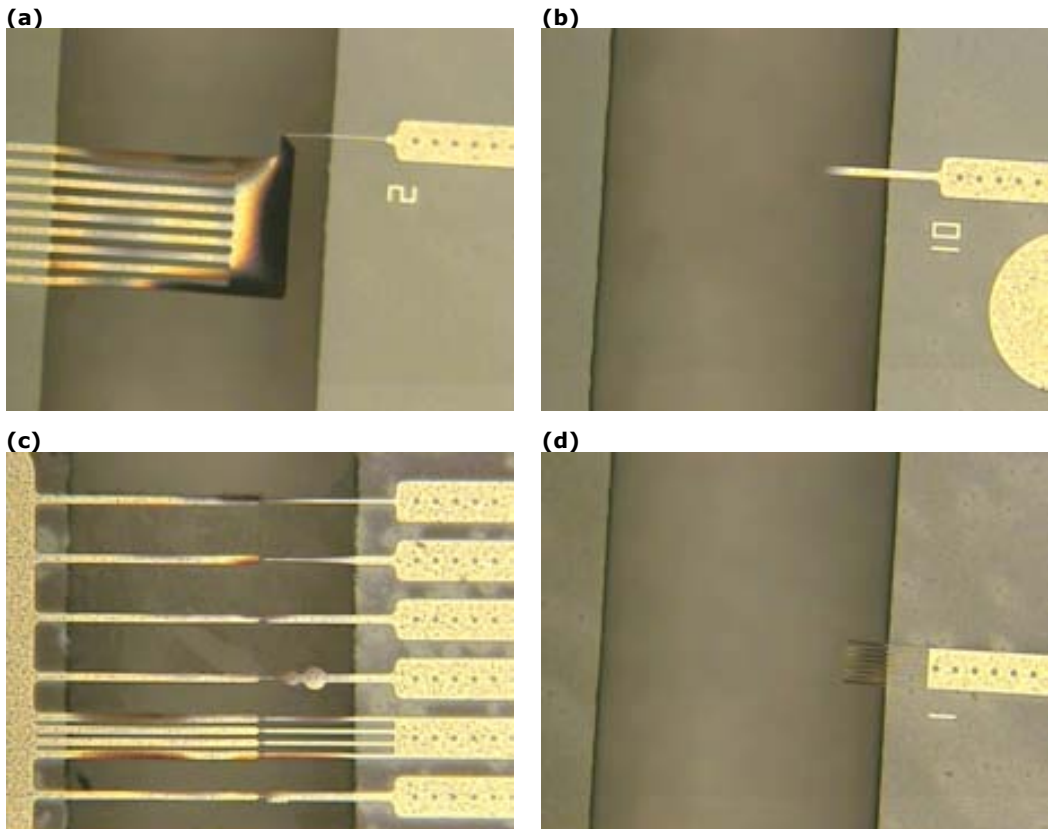


Figura 4.28: Imágenes ópticas de cuatro diseños diferentes de micropuntas de aluminio de (a) 2 μm , (b) 10 μm (c) multipuntas y (d) punta múltiple de 1 μm de anchura

4.4.4.3 Fabricación de los chips de vidrio por *Sand Blasting*

Una vez fabricado el chip de silicio, había que cubrir el depósito fabricado en la cara dorso para evitar que al depositar la capa estructural se sellara la cavidad de entrada. Se escogió un chip de vidrio para que cubriera el depósito y evitara que el óxido de silicio llegara a la cavidad de entrada al soldarlo anódicamente con el chip de silicio. Como se ha comentado, el micromecanizado de la oblea de vidrio se realizó en Little Things Factory GMBH mediante la técnica de *Sand Blasting*. El vidrio utilizado era un vidrio especial ya que debía permitir la soldadura anódica a la oblea mecanizada de silicio.

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

Los parámetros del proceso de *Sand Blasting* se muestra en la Tabla 4.VII. Remarcar que la anchura mínima que se podía procesar era de 300 μm . Los elementos más estrechos de los chips de vidrio diseñados eran los puentes para *Manual Cleaving* y medían 400 μm .

Tabla 4.VII: Parámetros característicos para procesar el vidrio mediante *Sand Blasting* [9]

Proceso	Condiciones Sand Blasting
Relación erosión vertical/lateral	3:1
Ángulo disminución	75°
Forma 3D	Volcan
Anchura mínima	300 μm
Proceso en paralelo	Sí
Cavidades y agujeros	Sí
Anódicamente soldable	Sí

En particular el vidrio elegido fue de la marca Borofloat y con un espesor de 0.7 mm para perder el mínimo de dimensiones debidas al ángulo de disminución de 75° que reducía las dimensiones de la cara inferior respecto a la superior después del *Sand Blasting*. La Figura 4.29a muestra la imagen de una oblea de vidrio tras su mecanización. El vidrio utilizado era un vidrio especial ya que debía permitir la soldadura anódica a la oblea mecanizada de silicio. La Figura 4.29b muestra un detalle de los chips de vidrio mecanizados y la Figura 4.29c enseña en detalle el punto de anclaje del chip de vidrio al marco de la oblea.

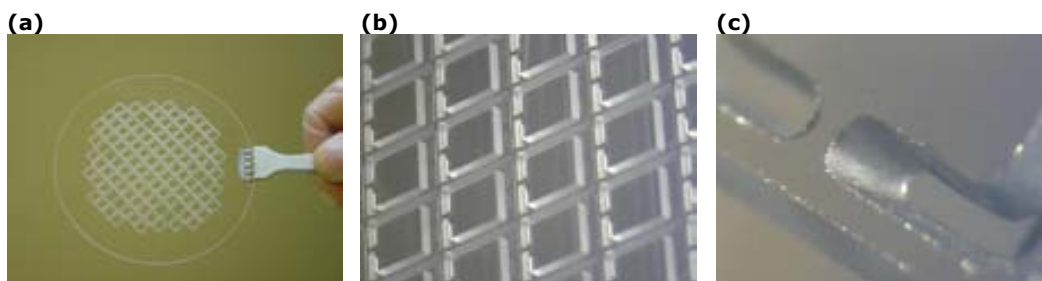
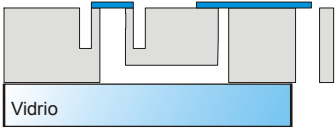


Figura 4.29: Imagen fotográfica (a) de la oblea de vidrio, (b) de un detalle de los chips mecanizados mediante *Sand Blasting* y (c) detalle del puente de unión del chip de vidrio al marco de la oblea de vidrio.

4.4.4.4 Soldadura anódica

Soldadura anódica chip vidrio		
<p>22. Soldar la oblea de silicio a oblea de vidrio mecanizada (FEIN-ESP)</p>	 <p>El diagrama muestra una oblea de vidrio (representada en azul) con un canal grabado que se alinea con una oblea de silicio (representada en gris). El canal del vidrio está etiquetado como 'Vidrio'. Se muestran líneas azules que indican la soldadura anódica que une los chips de vidrio con los chips de silicio.</p>	<p>1 - 4</p>

Después del último grabado profundo seco DRIE, la oblea de silicio había quedado totalmente mecanizada. Se habían definido los chips que contenían las micro/nanopipetas anclados a la oblea por medio de unas estructuras que se habían diseñado para obtener los chips por *Manual Cleaving*. La cara dorso del chip tenía mecanizado un canal-depósito descubierto que se cubriría con los chips de vidrio fabricados por *Sand Blasting*. Los chips de vidrio se soldarían a los chips de silicio (**FEIN-ESP**). La soldadura se realizaría a nivel de oblea.

Al intentar alinear la oblea de silicio y de vidrio mecanizadas, estas no encajaban. Inspeccionando la oblea de vidrio, se observó que las dimensiones de los marcos no eran las adecuadas. Se había dejado una distancia de 400 μm , cuando está debería haber sido de 800 μm , la empresa había errado en las dimensiones de los marcos de los chips al realizar el mecanizado de la oblea. Por este motivo, hubo que realizar la soldadura chip a chip. Hubo que separar los chips de vidrio de la oblea y alinearlos uno a uno sobre los chips de silicio. La distribución de los chips de vidrio soldados anódicamente sobre los de silicio puede observarse en la Figura 4.30.

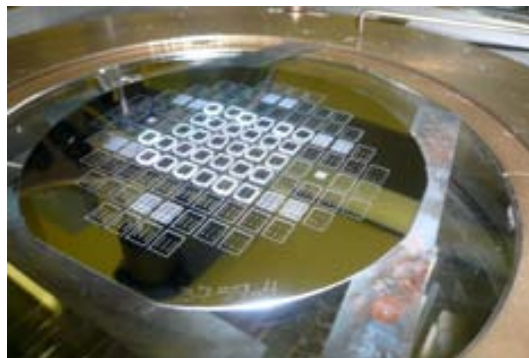
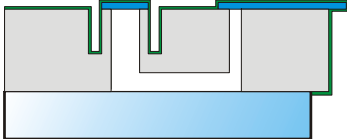


Figura 4.30: Distribución de los chips de vidrio soldados anódicamente a los chips de silicio.

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

No todos los chips de vidrio fueron soldados en el mismo proceso, para evitar que pudieran moverse y quedaran mal soldados, primero se comprobó con 9 chips como quedaba la soldadura. Después de soldar se comprobó que un pequeño número de chips quedaban mal soldados o desplazados, pero se continuó con la soldadura de otros 15 chips. En este caso el número de chips desplazados fue sólo de uno, este dato condujo a aumentar el número de chips a soldar en la tercera soldadura hasta completar la oblea de silicio.

4.4.4.5 Deposición de la capa estructural

Deposición capa estructural		
23. Depositar capa de óxido por la cara componentes y por la cara dorso a baja temperatura (DPLA-ING)		1 - 4

Una vez soldados los chips de vidrio a los chips de la oblea de silicio, se depositó una capa de óxido por ambas caras **(DPLA-ING)**. Se realizaron dos depósitos de $0.25\ \mu\text{m}$ por cada cara y conseguir una capa de óxido de silicio de $0.5\ \mu\text{m}$ menos porosa. Para evitar que se produjeran estreses, se depositaron primero $0.25\ \mu\text{m}$ por la cara componentes, seguido de un depósito $0.25\ \mu\text{m}$ por la cara dorso. A continuación se volvía a depositar óxido por la cara componentes y se completaba finalmente la deposición por la cara dorso. Se realizó una tercera deposición de óxido por la cara componentes porque no se había conseguido el grosor de óxido deseado. Esto probablemente fue debido al chip de vidrio soldado que entraba en contacto con la pared de grafito del horno al colocar la oblea en el horno y disminuía el paso de corriente, hecho que dificultaba la deposición del óxido. Los grosores depositados fueron medidos sobre la oblea de test y se obtuvo un grosor de $0.81\pm 0.12\ \mu\text{m}$ por la cara componentes y $0.61\pm 0.04\ \mu\text{m}$ por la cara dorso. Al encontrar problemas para depositar el grosor deseado de la capa de óxido por la cara componentes, se decidió depositar primero óxido por la cara componentes, soldar los chips de vidrio a los chips de la oblea de silicio a continuación y finalmente depositar el óxido por la cara

dorso. Se realizaron dos deposiciones de $0.25\ \mu\text{m}$ en cada cara y se obtuvo una capa con un grosor de $0.59\pm 0.02\ \mu\text{m}$ por la cara componentes y de $0.65\pm 0.03\ \mu\text{m}$ por la cara dorso. En este punto, el aluminio de la punta quedaba totalmente envuelto por el óxido como muestra las imágenes SEM de las puntas de 2, 4 y $10\ \mu\text{m}$ de anchura de la Figura 4.31.

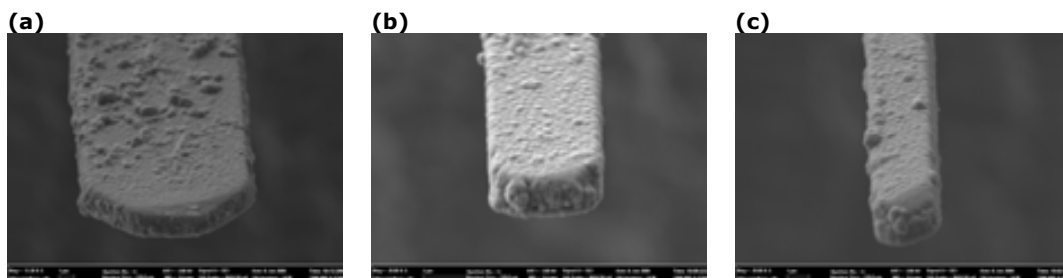


Figura 4.31: Imagen SEM de puntas de micro/nanopipetas de aluminio recubiertas de óxido de (a) 10 (b) 4 y (c) $2\ \mu\text{m}$ de anchura.

Para obtener el microcanal, había que grabar la capa de aluminio que definía el cuerpo de la micro/nanopipeta. A diferencia del proceso de fabricación de la primera generación, esta capa de aluminio era accesible por la cavidad de entrada porque el chip de vidrio de la cara dorso había impedido que se depositara óxido en esta cavidad. A pesar de poder realizar el grabado de la capa sacrificial a nivel de oblea, se optó por separar primero los chips para, de este modo, disponer de muestras en stock y poder realizar un estudio sobre el grabado del aluminio dentro del canal de la micro/nanopipeta.

4.4.4.6 Obtención de los chips individuales: *Manual Cleaving*

Manual Cleaving		
<p>24. Obtención del chip por <i>Manual Cleaving</i></p>		<p>1 - 4</p>

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

El rendimiento de los dispositivos obtenidos en la primera generación había sido bajo, principalmente debido a la etapa de obtención de los chips individuales. La extracción de los chips se había realizado mediante serrado, una técnica utilizada de manera tradicional en microelectrónica. Este método utiliza un chorro de agua para refrigerar el corte. Este chorro y la acción de separar los chips serrados del *blue-tape*, habían aumentado considerablemente la ruptura de muchas puntas de las micro/nanopipetas porque éstas eran frágiles. Para evitar el serrado de los chips, y con ello disminuir la ruptura de las puntas de las micro/nanopipetas, los nuevos chips diseñados incorporaban una estructura que les permitía ser extraídos de la oblea manualmente mediante la fractura de unos puntos de anclaje o pequeños puentes que unían el chip al marco de la oblea.

Este sistema es utilizado ampliamente en el caso de puntas de AFM y la experiencia previa del grupo en el diseño de estos anclajes [10], permitió aplicarlo al diseño de los nuevos chips de las micro/nanopipetas. También se habían incluido en el diseño unas estructuras de protección en el extremo inferior del chip que protegía las puntas de las micro/nanopipetas. Aplicando una ligera presión sobre el chip de silicio soldado al chip de vidrio, el chip se liberaba fácilmente del marco de la oblea. Aunque la oblea de vidrio no se alineaba con la oblea de silicio como se ha comentado en el punto anterior 4.4.4.4. *Soldadura anódica*, se quería estudiar si el chip de silicio se liberaba estando el chip de vidrio soldado al marco de la oblea de vidrio porque no se había probado hasta ahora la técnica de *Manual Cleaving* de un chip de silicio soldado anódicamente a un chip de vidrio. Por este motivo se alineó la oblea de silicio con un chip con la oblea de vidrio. Estos dos chips fueron soldados anódicamente. Las imágenes de la Figura 4.32 muestran la cara componentes y la cara dorso del chip de silicio soldado al chip de vidrio. Los chips que había alrededor del chip de silicio escogido para la prueba de *Manual Cleaving* después de la soldadura fueron extraídos. Este es el motivo por el cual la imagen de la Figura 4.32a muestra los chips de vidrio debajo del marco dejado por los chips extraídos en la oblea de silicio.

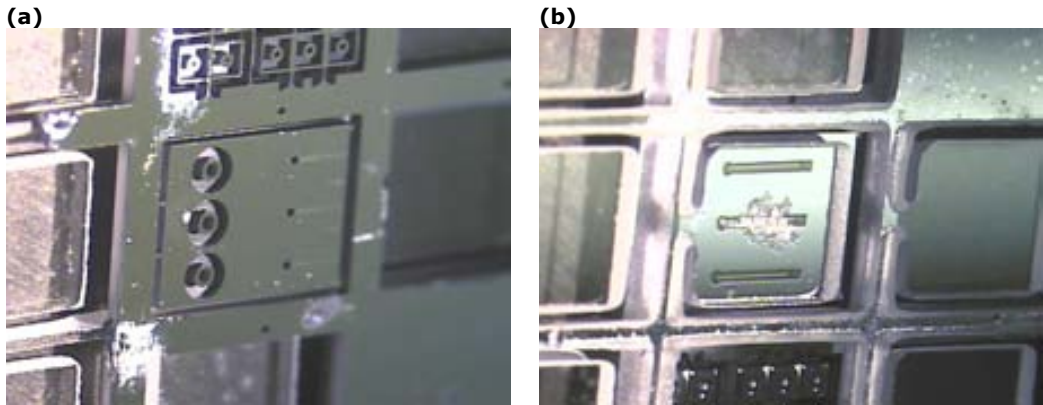


Figura 4.32: Imágenes ópticas de un chip de silicio soldado a un chip de vidrio preparado para la separación de la oblea por *Manual Cleaving* (a) cara componentes y (b) cara dorso.

Una vez unidos, se ejerció un poco de presión sobre la superficie del chip de silicio y se liberó con éxito del marco de la oblea de silicio y de vidrio. Se realizó una grabación en video del experimento. La Figura 4.33a y b corresponden a dos secuencias de película filmada durante el experimento. La Figura 4.33c muestra una imagen óptica del detalle de la zona de corte en el anclaje del chip después de haber sido liberado del marco de las obleas. Se puede observar como el corte producido es limpio.

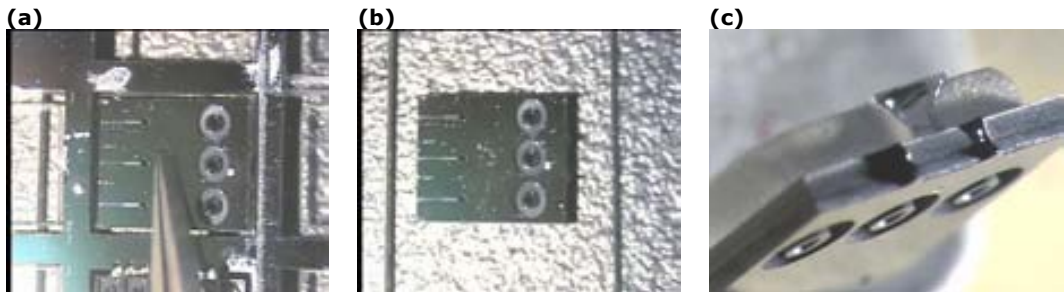
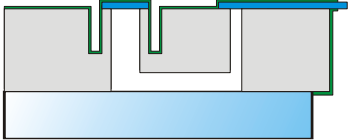


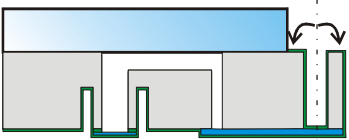
Figura 4.33: (a - b) Secuencia de imágenes de la obtención de un chip de una oblea de silicio soldado a un chip de la oblea de vidrio por *Manual Cleaving* y (c) imagen óptica del corte producido en los puentes de silicio y vidrio después del proceso.

4.4.4.7 Apertura de la punta de las micro/nanopipetas

Apertura de la punta	
<p>25. Apertura de la punta</p>	

La deposición de la capa estructural había envuelto el cuerpo de la punta de la micro/nanopipeta definido por la capa de aluminio. A pesar de haber evitado la etapa de apertura de la cavidad de entrada con la ayuda del chip de vidrio, en este nuevo proceso de fabricación la punta había quedado totalmente recubierta por la capa estructural y había que perforar la capa de óxido de silicio para llegar al aluminio. Para abrir las cavidades de salida en las puntas se utilizaron las aproximaciones estudiadas durante el primer proceso de fabricación. La primera consistió en la ruptura de la punta de manera controlada y la segunda en la nanomecanización con FIB.

4.4.4.7.1 Ruptura controlada

Apertura de la punta de manera controlada	
<p>25a. Ruptura Controlada de la punta</p>	

Tres de los cinco tipos de chips diferentes fueron diseñados para que las puntas se abrieran al romperse de manera controlada en un punto determinado. Dos de estos chips se basaban en los modelos simulados de ruptura controlada de la primera generación, pero mejoraban el diseño de la base. En las puntas simples, se dividió la base en tiras para evitar la aparición de estreses. Para los diseños de puntas múltiples, se depositó todo el cuerpo de la base sobre la superficie de silicio porque se había comprobado en el diseño de la primera generación que de esta

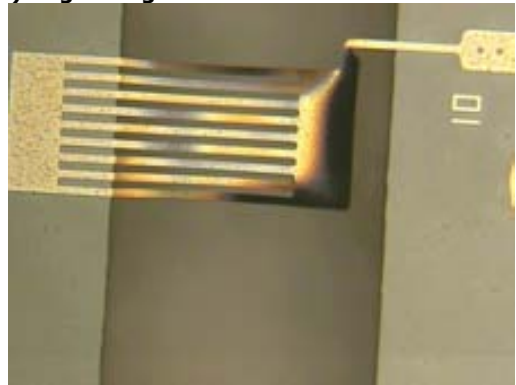
manera se evitaba la aparición de estreses que producían la rotura por una zona no deseada.

La Figura 4.34a muestra el diseño de una punta individual de la primera generación. En ella se observa como gran parte del cuerpo de la base estaba suspendido en el aire y presentaba fractura. La Figura 4.34b muestra el diseño mejorado de esta base para una micro/nanopipeta fabricada en aluminio de la segunda generación. Se puede observar la ausencia de grietas al disminuir la anchura de las estructuras flotantes. La Figura 4.34c muestra como la base de una micro/nanopipeta de puntas múltiples de la primera generación se agrietaba al estar prácticamente entera colgada en el aire. Por el contrario, la Figura 4.34d muestra como esta base se ha depositado sobre la superficie de silicio en una micro/nanopipeta con puntas múltiples con la capa sacrificial de óxido.

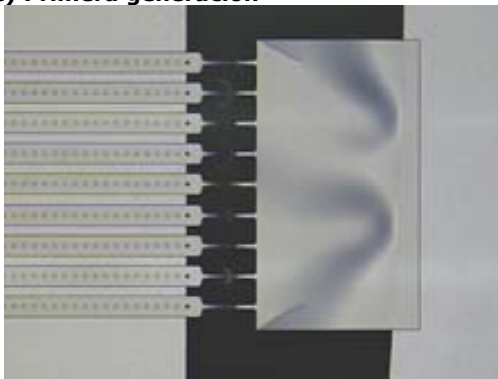
(a) Primera generación



(b) Segunda generación



(c) Primera generación



(d) Segunda generación

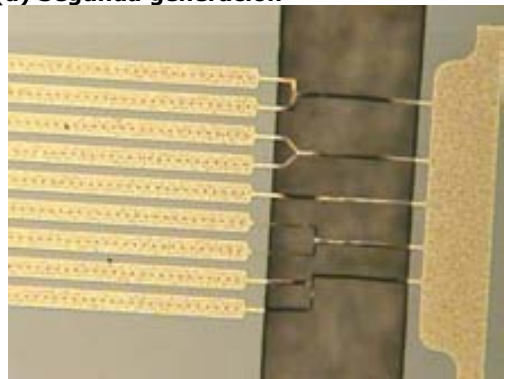


Figura 4.34: Imágenes ópticas de las puntas diseñadas para romperse de manera controlada (a) primera y (b) segunda generación de punta simple, (c) primera y (d) segunda generación de punta múltiple

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

Además de las mejoras realizadas en las bases de la nueva generación de micro/nanopipetas, se introdujeron nuevos diseños para intentar la ruptura controlada de las puntas. La Figura 4.35 muestra tres diseños de puntas diferentes realizados con capa sacrificial de aluminio y óxido de silicio para provocar la ruptura en un punto de manera controlada. Las imágenes de la Figura 4.35a y b pertenecen a un diseño de micropuntas de la segunda generación fabricadas en aluminio y óxido de silicio que había sido probado durante el proceso de fabricación de la primera generación de las micro/nanopipetas. Las imágenes de la Figura 4.35d y e pertenece a este mismo diseño fabricado en óxido de silicio y polisilicio. Las imágenes de la Figura 4.35c y f pertenecen un diseño de punta nuevo del proceso de fabricación de las micro/nanopipeta de la segunda generación, fabricado en aluminio y óxido de silicio y óxido de silicio y polisilicio respectivamente.

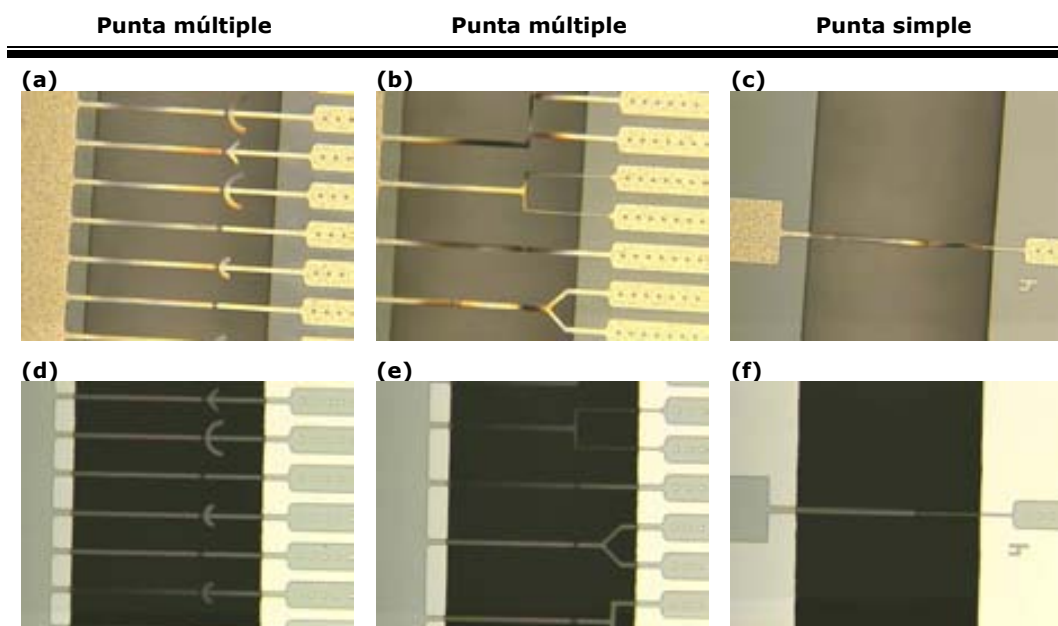


Figura 4.35: Imágenes ópticas de diferentes micropuntas fabricadas en (a, b y c) aluminio y (d, e, f) óxido de silicio.

La ruptura de la punta controlada se producía al liberar el chip de la oblea, es decir, utilizando la técnica de *Manual Cleaving* y evitando el método de serrado. Al ejercer presión sobre el chip para separarlo de la oblea, se producía la ruptura controlada en un punto determinado de la punta y se obtenía el orificio de salida de

la punta. La prueba se realizó inspeccionando un chip debajo de un microscopio óptico para poder filmar el experimento. La Figura 4.36 muestra una secuencia de tres imágenes de la película filmada. La primera muestra la punta unida a la base, la segunda enseña la base una vez liberado el chip y la tercera muestra la punta abierta una vez se ha separado de la base.

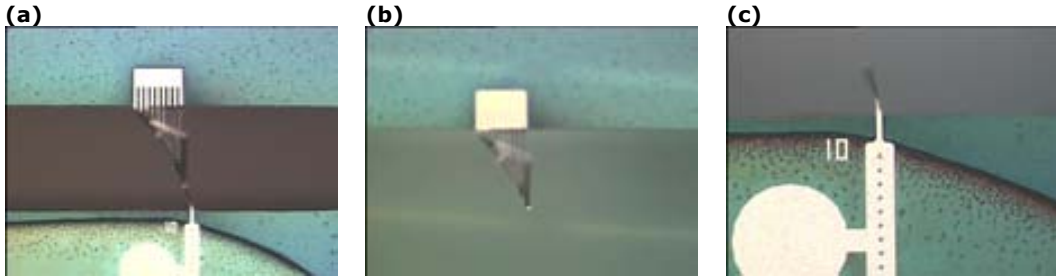


Figura 4.36: Secuencia de imágenes de la ruptura controlada de (a) una punta unida a la base y (b) la misma base y (c) la misma punta una vez separadas por *Manual Cleaving*.

Se detectó en un número reducido de puntas de las micro/nanopipetas de la segunda generación como el aluminio se enrollaba sobre si mismo. Al doblarse la base sobre si misma, hacía que la punta se separase antes de depositar el óxido. Esto significaba que la ruptura controlada no provocaba la apertura del orificio de salida porque al depositar la capa de óxido de silicio recubría toda la punta.

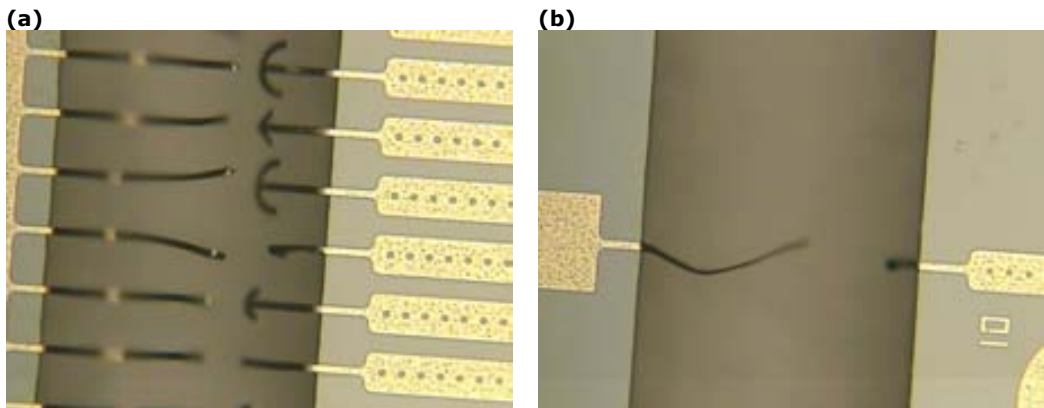
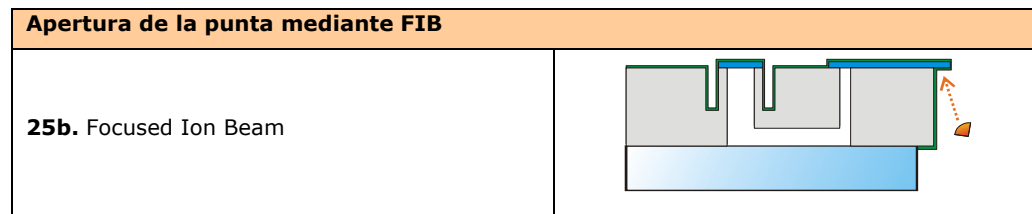


Figura 4.37: Imágenes ópticas de (a) punta múltiple y (b) punta simple separadas de la base antes de haber obtenido el chip mediante manual-cleaving.

4.4.4.7.2 Nanomecanización con FIB



Durante el proceso de fabricación de las micro/nanopipetas de la primera generación se había comprobado la versatilidad que ofrecía la nanomecanización de las puntas de los dispositivos mediante FIB. Se había podido definir diferentes formas a las puntas sin necesidad de una máscara previa.

El equipo utilizado para nanomecanizar las puntas fue un CrossBeam 1560XB FIB (Carl-Zeiss, Germany) situado en la Sala Blanca del IMB-CNM. La ventaja que ofrecía este equipo, respecto a los utilizados en la micromecanización de las puntas de la primera generación, era que se podía observar el grabado en directo y en función de los resultados, pararlo o continuar hasta el final del proceso. El tipo de grabado con el que se trabajó fue por profundidad, fijando este parámetro en $4\ \mu\text{m}$ para asegurar que se eliminaban las tres capas (óxido-aluminio-óxido) de la punta. La intensidad del haz utilizada variaba dependiendo del área a grabar, de este modo se trabajó con intensidades entre 200 pA y 5 nA. La Figura 4.38a muestra una imagen FIB de una punta de $2\ \mu\text{m}$ de una micro/nanopipeta afilada con un ángulo de 5° mientras que la Figura 4.38b muestra la imagen FIB de otra punta de $4\ \mu\text{m}$ afilada en este caso 15° y la (c) muestra una punta de $10\ \mu\text{m}$ con un bisel de 5° . Se obtuvieron puntas extremadamente afiladas para posibles aplicaciones biológicas.

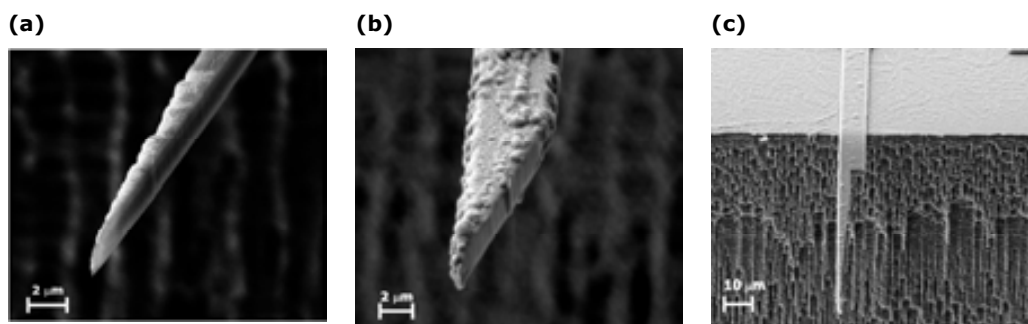
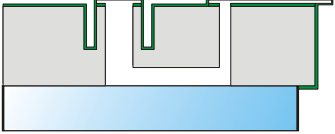


Figura 4.38: Imágenes FIB de una punta de (a) $2\ \mu\text{m}$ afilada 5° , (b) $4\ \mu\text{m}$ afilada 15° y (c) $10\ \mu\text{m}$ afilada 5°

4.4.4.8 Grabado de la capa sacrificial de aluminio para la obtención del microcanal.

Obtención microcanal	
<p>26. Grabado de la capa sacrificial</p>	

Una vez liberados con éxito los chips de la oblea y con las puntas de las micro/nanopipetas conservadas mediante las protecciones diseñadas en el chip, se procedió al grabado de la capa sacrificial de aluminio para definir el microcanal. La solución utilizada para grabar aluminio en el CNM es una solución comercial conocida como DAE (Fujifilms Electronic Materials, Bélgica). Los tiempos de reacción de esta solución eran muy lentos teniendo en cuenta que se quería grabar un microcanal de 50-120 μm de ancho x 2350 μm de largo. Peeni *et al.* y Barber *et al.* [6, 7] utilizan una solución formada por HCl:HNO₃ en proporción 2:1 para grabar aluminio y definir canales. Barber *et al.* presentan un estudio sobre la velocidad de reacción de esta solución con la temperatura. Por las dimensiones de los microcanales diseñados se escogió una temperatura de 80°C para grabar el aluminio.

Para realizar el grabado de la capa sacrificial, no hacía falta que la punta de la micro/nanopipeta estuviera abierta, el chip de vidrio había impedido que la cavidad de entrada quedará sellada al depositar la capa estructural. La cavidad de la zona de conexión se podía abrir fácilmente ejerciendo un poco de presión con una aguja sobre la capa de aluminio depositada en la cara componentes que cerraba la zona central del anillo de conexión. La solución grabadora de aluminio podía acceder a la capa sacrificial entrando por la cavidad de la zona de conexión. Las imágenes SEM de la Figura 4.39 muestran el anillo de conexión antes y después de perforar la zona central mecánicamente.

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

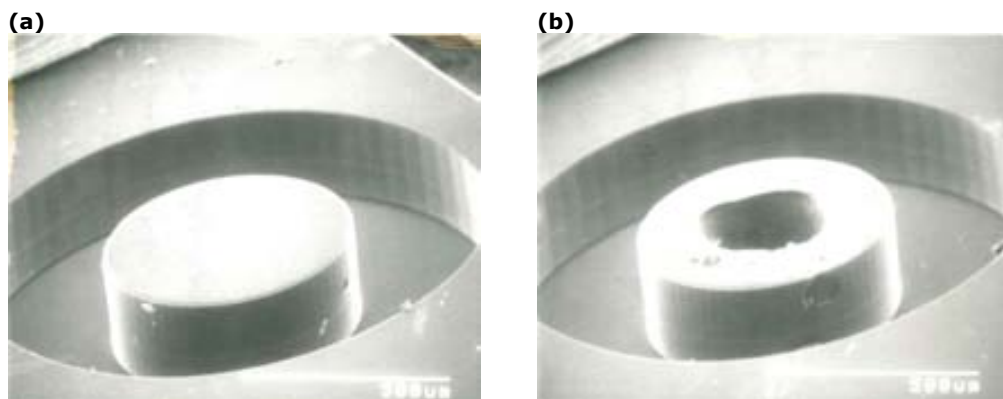


Figura 4.39: Imágenes SEM de un anillo de conexión (a) antes y (d) después de la apertura mecánica de la zona central

Se escogió un chip con el anillo y la cavidad de entrada abiertos y se sumergió durante 10 minutos en la solución de $\text{HCl}:\text{HNO}_3$. Como la capa de óxido de silicio era transparente, la evolución del grabado podía seguirse fácilmente con la ayuda del microscopio óptico como muestran las imágenes de la Figura 4.40.

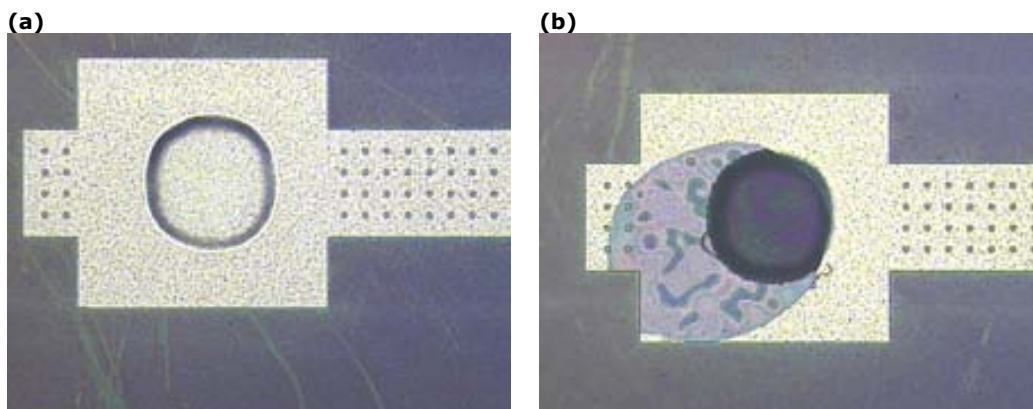
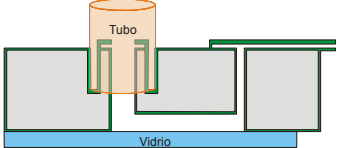


Figura 4.40: Imágenes ópticas del proceso de grabado de la capa de aluminio (a) antes y (b) al inicio del proceso.

4.4.5 Conexión microfluídico integrado monolítico de micro a macro

Conexión tubos	
27. Conexión tubo	

Una vez definido el microcanal, los chips debían de ser unidos a los equipos de medida necesarios para realizar su caracterización. Con los problemas de conexionado detectados durante el proceso de fabricación de la primera generación en esta etapa, se comprobó que éste era uno de los pasos clave [11, 12]. Para facilitar el conexionado de los tubos exteriores se introdujeron unos anillos en el diseño de los nuevos chips de micro/nanopipetas. Estos anillos tendrían dimensiones de diámetro exterior de 1200 μm y de 600 μm de diámetro interno para poder acoplar los tubos de conexión. Estos tubos de conexión encajarían en el anillo después de realizar un rebaje en la superficie [13, 14].

Los anillos fueron diseñados en la máscara CNM231-TUB y transferidos a la superficie del chip en la segunda etapa fotolitográfica realizada por la cara componentes. Corresponde a la etapa 18 (**FOTO-ING**) del proceso de fabricación tanto en las micro/nanopipetas de óxido-polisilicio como en las de aluminio-óxido. El grabado de los anillos (Figura 4.39) se realizó mediante ataque seco profundo, etapa 19 (**A601-ING**).

4.4.5.1 Conexión de los chips con tubos de Nylon

Se realizó una prueba preliminar en un chip formado por un microcanal en la cara dorso y anillos rebajados en la cara componentes pero sin micro/nanopipetas sobre la cara componentes. El proceso seguido para realizar la conexión del tubo de Nylon se muestra en la Figura 4.41, la piscina inicial formada por el rebaje del anillo (a) se llenaba con loctite en gel (b). Una vez distribuido el loctite, se encajaba el tubo en el anillo (c). El tubo no se caía debido a la viscosidad del adhesivo utilizado.

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

El chip se introducía en la estufa durante 10 minutos para asegurar que el loctite se endurecía bien. Una vez curado el loctite, se sellaba la unión del tubo-chip con más loctite en gel (d).

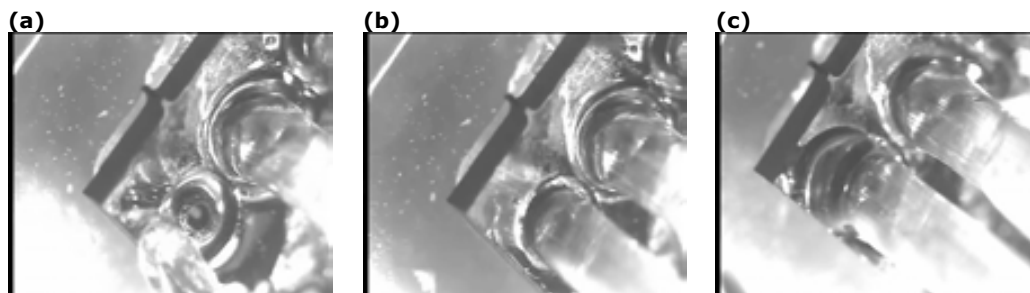


Figura 4.41: Secuencia seguida en el proceso de conexión de los tubos (a) llenado del rebaje del anillo con loctite, (b) colocación del tubo de nylon y (c) sellado con loctite.

4.4.5.2 Conexión de los chips con tubos de poliimida

Para realizar las conexiones de las micro/nanopipetas también se probaron tubos de poliimida (PROFESSIONAL PLASTICS-INC, San Jose, CA) para encajar en los anillos rebajados en los chips. El diámetro externo de los tubos utilizados era de 0.912 mm y un grosor de pared de 0.025 mm. Se siguió el proceso explicado anteriormente, se llenó la piscina rebajada del anillo con loctite, se encajó el tubo y se dejó el chip en la estufa a 100°C para solidificar el loctite. Al intentar poner más adhesivo para sellar la unión, el tubo de poliimida no se había fijado y se movía, el loctite no había curado.

A pesar de la efectividad del reactivo escogido (HCl:HNO₃) para grabar la capa sacrificial, en el momento de realizar las conexiones, se comprobó que dañaba la superficie del chip e impedía que el adhesivo utilizado para fijar los tubos, se curara correctamente. Se realizaron pruebas con diferentes soluciones como H₃PO₄ 85% : IPA (5:2) y DAE [15, 16] o reactivos como el TMAH [17] y el KOH [18]. El TMAH o el KOH no podían ser utilizados porque atacan el silicio y debajo de la capa de aluminio se encontraba el chip de silicio.

Se sumergieron diferentes chips con micro/nanopipetas fabricadas en aluminio y recubiertas con una capa de óxido de silicio en las diferentes soluciones y/o reactivos. La Figura 4.42 muestra el detalle de una membrana de una

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

micro/nanopipeta donde el aluminio se ha empezado a grabar con una solución formada por H_3PO_4 85%:IPA (5:2). La imagen muestra como se grababa el aluminio selectivamente y no se dañaba el silicio, pero era una solución muy viscosa, entraba con dificultad en el canal y los tiempos de grabado eran muy largos. Se realizaron diferentes pruebas variando la composición de esta solución, aumentando la proporción de IPA para disminuir su viscosidad, pero no se consiguió disminuir el tiempo necesario para definir el canal. El ácido ortofosfórico no difundía bien dentro del microcanal y por lo tanto el grabado de la capa de aluminio era muy lento.

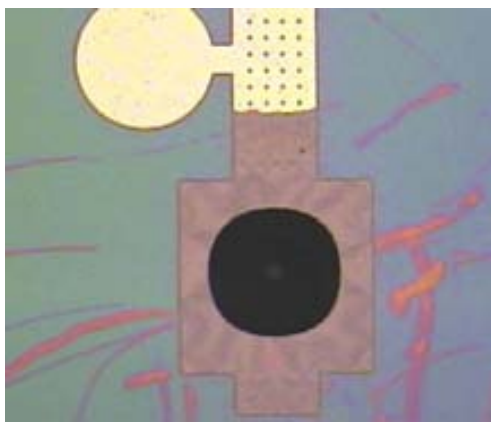


Figura 4.42: Imagen óptica de una membrana de micro/nanopipetas donde se ha grabado el aluminio con una solución de H_3PO_4 85%:IPA (5:2)

Las pruebas realizadas utilizando DAE para grabar el aluminio también mostraron tiempos de grabado demasiado largos, además los tubos tampoco quedaban bien fijados. La última prueba se realizó sumergiendo unos chips en una solución formada por $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$ (80:10:10) a 80°C . El aluminio se grababa en 2h y al realizar las conexiones se comprobó que no había dañado la superficie del chip. Al cambiar este reactivo por la solución $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$ (80:10:10) a 80°C , se habían podido conectar los tubos de poliimida como muestran las imágenes de la Figura 4.43.

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

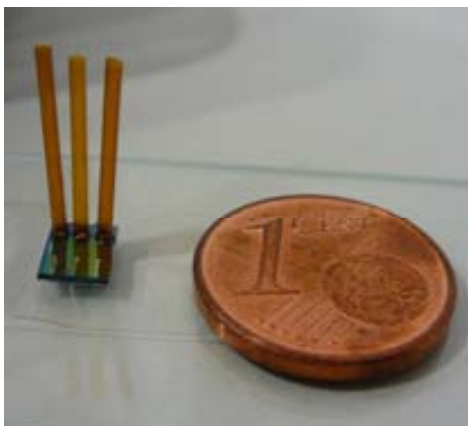


Figura 4.43: Imágenes de un chip con los tres tubos de poliimida fijados

4.5 Caracterización y aplicación de las micro/nanopipetas

Una vez realizadas las conexiones de los chips con las micro/nanopipetas había que proceder a su caracterización. Antes había que comprobar la existencia o ausencia de fugas en las uniones realizadas y la presión que podían soportar sin romperse.

4.5.1 Comprobación de fugas y pruebas de resistencia de presión de las conexiones

Una vez realizada las conexiones, había que comprobar si éstas eran resistentes, que no quedasen obstruidas por el adhesivo y no se produjesen fugas de líquido en las juntas. La primera prueba se realizó con los tubos de nylon conectados al chip de silicio. Para bombear agua en su interior, se acopló una jeringa a uno de los tubos conectados en un extremo. Inyectando y aspirando con el émbolo de la jeringa se consiguió mover agua por los tubos. Las imágenes de Figura 4.44 pertenecen al video grabado durante el experimento y muestran como al llenarse el tubo de agua no se producían pérdidas en los anillos donde se habían encajado los tubos de nylon. Estas pruebas demostraron que el sistema para sellar las conexiones funcionaba correctamente y no se producían pérdidas de líquidos en las juntas.

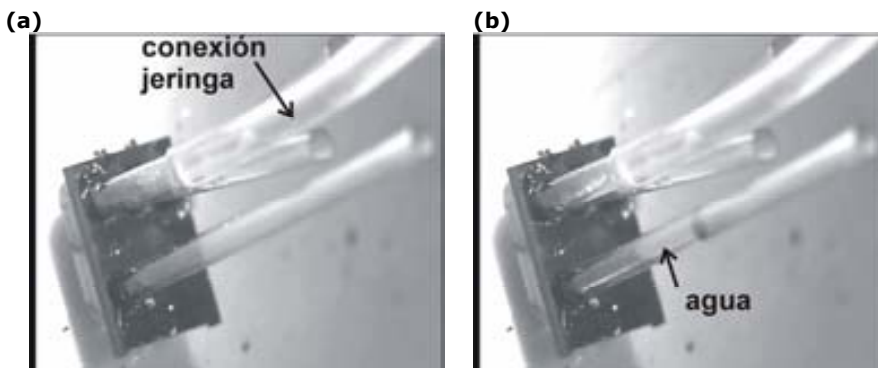


Figura 4.44: Secuencia de imágenes de la prueba realizada con agua para detectar la ausencia de fugas (a) tubo vacío y (b) tubo con agua.

El segundo test realizado fue comprobar la presión que resistían sin provocar fugas en los tubos de poliimida conectados. Los tests se realizaron conectando los tubos a un regulador de presión (Druck DPI 510). El tubo de poliimida se conectaba

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

al tubo del Druck a través de un tubo de silicona. El chip se sumergía en agua para poder observar la aparición de burbujas que indicaran la presencia de fugas. El montaje realizado se muestra en la Figura 4.45. Para comprobar la presión que podían soportar las conexiones debíamos intentar tener un sistema totalmente cerrado, por este motivo las pruebas se realizaron con chips donde no se había atacado el aluminio.

Se aplicaba una presión con el Druck, una vez alcanzada la presión deseada, se paraba el equipo. Si no existían fugas la presión se mantenía fija. Para comprobar que las conexiones no habían quedado obturadas por el adhesivo utilizado para fijarlas, al finalizar la prueba se rompía la membrana de las micro/nanopipetas ejerciendo presión con una aguja. Si al volver a sumergir en líquido el chip y al aplicar presión con el Druck se generaban burbujas en la membrana, significaba que las conexiones no estaban obturadas. La Figura 4.45b muestra la formación de burbujas en la membrana una vez abiertas al finalizar el experimento y la ausencia de ellas en las conexiones de los tubos. Las pruebas mostraron que las conexiones aguantaban más de 1 atm de presión sin la aparición de fugas.

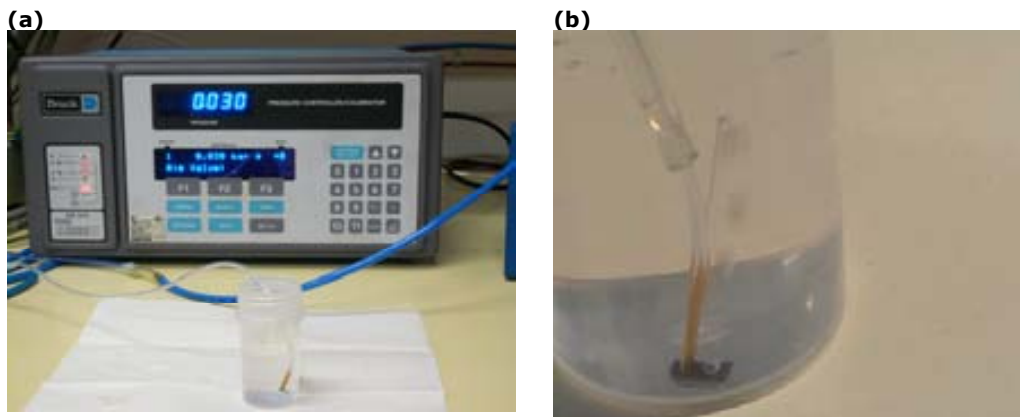
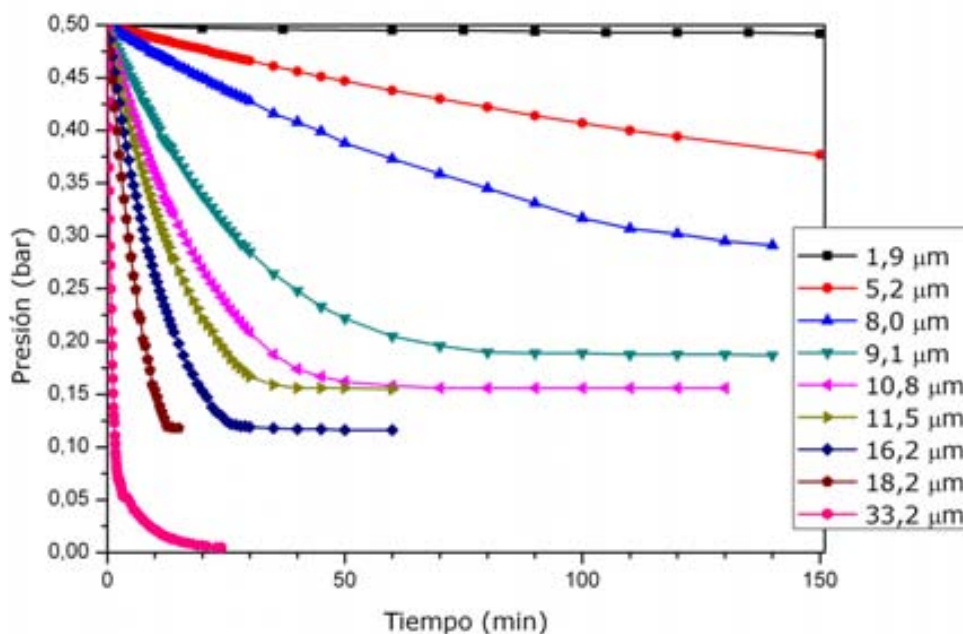


Figura 4.45: Imágenes (a) montaje realizado para los experimentos de resistencia de presión y (b) test final para comprobar que las conexiones no estaban obturadas

Una vez definido el canal de la micro/nanopipeta después de haber grabado la capa sacrificial y haber realizado las conexiones con los tubos, las micro/nanopipetas debían de ser caracterizadas. Se realizaron diferentes pruebas intentando inducir el movimiento de diferentes líquidos dentro del canal de la micro/nanopipeta. Entre otros líquidos se probaron agua, agua con jabón, agua con glicerol, tinta de impresora o tinta de color.

4.5.2 Pruebas realizadas con Fluidos

Se realizaron unas pruebas preliminares con unos capilares de vidrio de diferente tamaño. Se habían conectado a un regulador de presión (Druck DPI 510) y se había aplicado 0.5 bares de presión. Se paraba el Druck y se medía el tiempo empleado para que la presión fuera disminuyendo hasta llegar a 0. Estas pruebas se realizaron con unos capilares de vidrio con orificios de salida entre 1.9 y 33.2 μm de diámetro. La Gráfica 4.1 muestra los resultados obtenidos. En ella se ha acotado el tiempo a los 150 primeros minutos del experimento para disminuir la escala. Se puede observar como aumentaba el tiempo necesario para llegar a 0 bar en el capilar más pequeño. El capilar de 1.9 μm de diámetro tardaba más de cinco horas en conseguirlo. Esto significaba que para diámetros menores del orificio de salida, eran necesarios mayores tiempos de descarga y mayor presión, es decir, su resistencia fluídica aumentaba considerablemente.



Gráfica 4.1: Tiempos de descarga de presión para capilares de diferente diámetro para una $P_0 = 0.5$ bar.

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

En el caso de los líquidos, se podría pensar en un mayor tiempo para conseguir que el líquido llenará el microcanal o en aplicar presiones más elevadas. Para comprobar el comportamiento que tenían los líquidos en el interior del capilar de 1.9 μm , se realizaron diferentes experimentos. El primero consistió en intentar llenar el capilar de vidrio con agua y aplicar presión para desplazar el líquido hasta el orificio de salida. Se observó que se requería ejercer una elevada presión para conseguirlo. El agua debía desplazar el aire hasta el orificio de salida. Por el contrario, una vez lleno de agua el microcanal, no era necesario ejercer tanta presión para producir el movimiento del líquido hacia el orificio de salida.

Las primeras pruebas realizadas con las micro/nanopipetas de la segunda generación, consistieron en comprobar como se llenaba el microcanal de óxido por capilaridad. La Figura 4.46 muestra una secuencia de imágenes ópticas del experimento. Se seleccionó un chip con micro/nanopipetas con las multipuntas abiertas (Figura 4.46a) y se depositó una gota en el extremo del chip, en contacto con las puntas abiertas (Figura 4.46b). En segundos se observó como el agua entraba hasta llenar todos los microcanales de las diferentes puntas (Figura 4.46c).

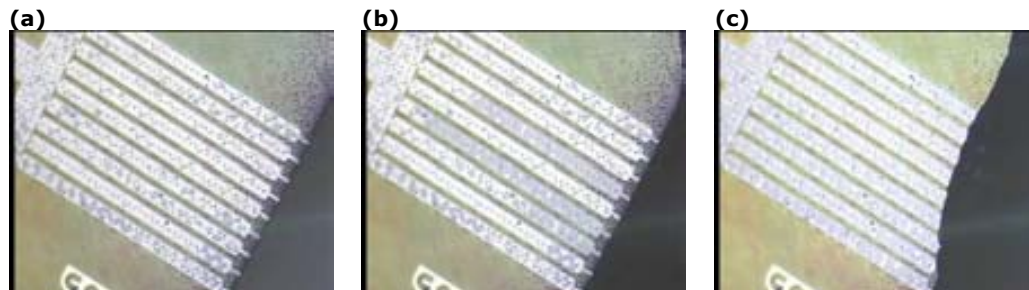


Figura 4.46: Secuencia de imágenes del llenado por capilaridad de los microcanales (a) imagen inicial con los microcanales vacíos, (b) deposición de la gota de agua en el extremo y (c) microcanales llenos de agua.

Una vez comprobado que el agua entraba por capilaridad, se iniciaron los experimentos para intentar bombear el líquido una vez dentro del microcanal. Para realizar las pruebas con líquidos, las micro/nanopipetas fueron conectadas a jeringas de 1 y 10 mL (BD [19]) para poder intentar inyectar y/o bombear los líquidos dentro del canal. La capacidad de la jeringa se seleccionaba en función de la presión requerida para intentar bombear el líquido dentro del microcanal.

La Figura 4.47 (a-e) muestra la secuencia de imágenes correspondiente a la película filmada durante el experimento. Como los experimentos realizados con los capilares de vidrio habían mostrado que la presión necesaria para mover el líquido dentro del microcanal, era menor si éste estaba lleno. Se sumergió el chip en agua para llenar el canal de la micro/nanopipeta por capilaridad. Una vez lleno, se conectó la micro/nanopipeta a una jeringa de 10 mL. Se puede observar como al ejercer presión al mover el émbolo de la jeringa, se produce movimiento del agua dentro del canal de la micro/nanopipeta. Al ejercer más presión para intentar generar una gota en la punta, la membrana de la micro/nanopipeta se rompió y el agua cubrió la superficie del chip como muestra el fotograma de la Figura 4.47f.

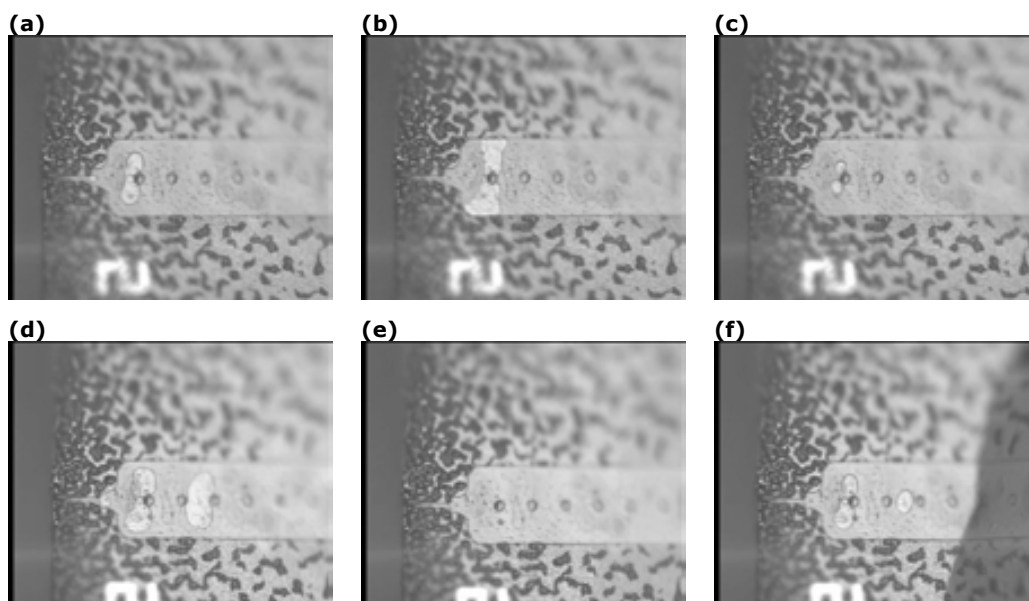


Figura 4.47: Secuencia de imágenes del proceso del (a-e) movimiento del agua dentro del microcanal en la zona situada en la punta al ejercer presión con una jeringa y (f) agua sobre la superficie del chip tras la ruptura de la membrana no mostrada en la imagen.

El agua había llenado el microcanal de la micro/nanopipeta y se había podido bombear el líquido dentro del microcanal ejerciendo presión con una jeringa. Al aumentar la presión para que se formara una gota en la punta, se había producido la rotura de la membrana. Para disminuir la tensión superficial en la punta y facilitar la formación de una gota, se añadió jabón al agua. Al disminuir la tensión superficial del líquido utilizado se introdujo el líquido inyectando con una jeringa en lugar de por capilaridad. La jeringa había sido conectada al tubo de poliimida de una de las

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

micro/nanopipetas. La Figura 4.48a y b muestran dos imágenes ópticas de la zona de la membrana llenándose de agua con jabón.

La Figura 4.48c muestra una imagen óptica de la zona de la punta completamente llena de líquido y ausencia de gotas. La mezcla de agua con jabón no había facilitado la visualización de la formación de gotas.

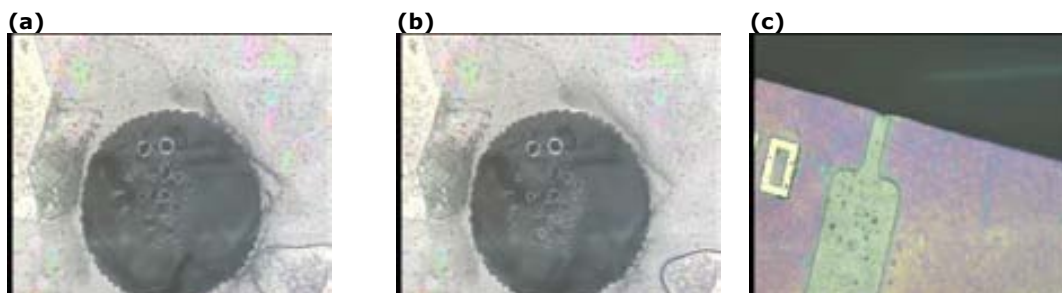


Figura 4.48: Imágenes ópticas del llenado del microcanal con agua y jabón en la zona (a)-(b) la membrana y (c) la punta

Según cálculos aproximados, se podrían estar depositando gotas cuyo volumen era del orden de los femtolitros. Puede que fuese ese el motivo por el que no pudieramos ver su formación, ya que se estarían evaporando nada más generarse y los equipos con los que se disponía en el IMB-CNM no facilitaban la inspección. Saya *et al.* [20] utilizaban una mezcla de glicerol:agua (70:30) para depositar gotas sobre una superficie del orden de los fl y evitar que se evaporasen. Ellos acoplaban las puntas que habían fabricado a un micromanipulador para controlar la posición donde depositaban las gotas. Los chips presentados en este capítulo no podían ser acoplados a un AFM debido a su tamaño. En contra, se disponía de unos cantilevers fabricados en el mismo proyecto que encajaban perfectamente en los cabezales de un AFM. Depositando un chip de micro/nanopipetas con los microcanales llenos de una solución de glicerol:agua (70:30) en el holder, se acercaría de manera controlada con el brazo del AFM el cantilever para intentar depositar gotas de la solución sobre su superficie.

Se sumergió el chip con las micro/nanopipetas en una solución glicerol:agua (70:30) para llenar el canal por capilaridad. El microcanal se llenó rápidamente, pero no así la punta como muestra la imagen óptica de la Figura 4.49a. Para que la solución glicerol:agua llegara a la punta, el chip de las micro/nanopipetas

permaneció sumergido. De esta manera se consiguió que la solución alcanzara el orificio de salida (Figura 4.49b).

Una vez lleno el microcanal, se colocó el chip en el holder de un AFM y el cantilever en el cabezal. Después de varias aproximaciones e inspecciones de la superficie del cantilever no se observó ninguna gota de glicerol:agua. Se comprobó que sobre la superficie de otro chip, la solución glicerol:agua había formado una película. Puede que este fuera el mecanismo para evitar la evaporación de la gota, pero el hecho de haber permanecido sumergido el chip en esta solución, podría haber causado la formación de esta película dentro del canal. También podría ser que el tiempo destinado a la preparación del montaje del experimento en el AFM hubiera hecho que se formara esta película en la punta de la micro/nanopipeta impidiendo la salida de más líquido de su interior, y fuese ese el motivo de no poder depositar gotas en la superficie del cantilever.

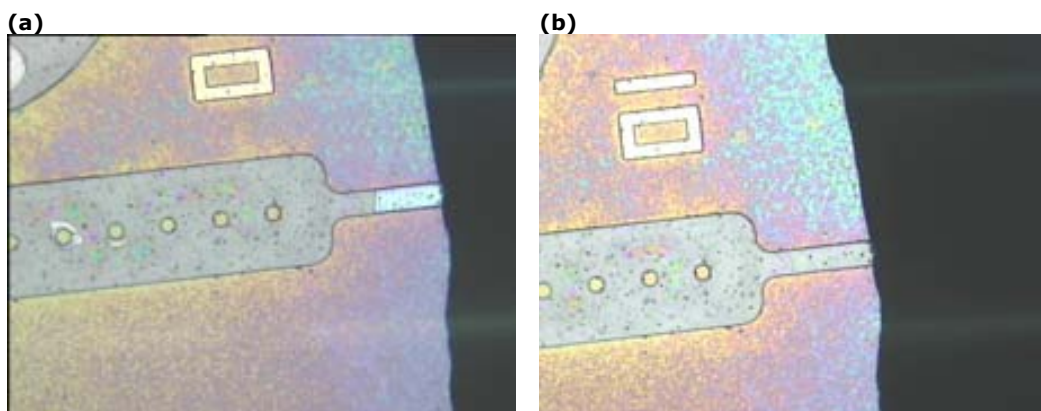


Figura 4.49: Imágenes ópticas del (a) microcanal y (b) microcanal y punta llenos de la solución glicerol:agua (70:30)

Para intentar visualizar la formación de gotas o la salida de líquido por la punta de las micro/nanopipetas, se ideó otro tipo de experimento. Se introduciría tinta de color en el depósito del chip. Una vez lleno, se sumergiría el chip en agua y se ejercería presión para intentar colorear el agua con la tinta que pudiera salir de la punta. La tinta escogida para el experimento había sido utilizada en las pruebas de la primera generación para comprobar la apertura del canal. Se introdujo tinta azul disuelta en agua en el tubo de poliimida y se dejó que llegara hasta la cavidad de entrada. La Figura 4.50a muestra como la tinta de color azul había llegado a la

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

cavidad de entrada. Al ejercer presión para intentar que la tinta llenara el microcanal, se produjo la rotura de la membrana de la micro/nanopipeta (Figura 4.50b). La tinta empezó a colorear el agua, pero no salía por la punta de la micro/nanopipeta. La Figura 4.50c muestra una imagen óptica del detalle de la membrana rota. Se puede observar como la tinta había empezado a llenar el microcanal. También se comprobó que esta tinta, cuando se secaba, obturaba el microcanal y los dispositivos utilizados tenían que ser desechados.

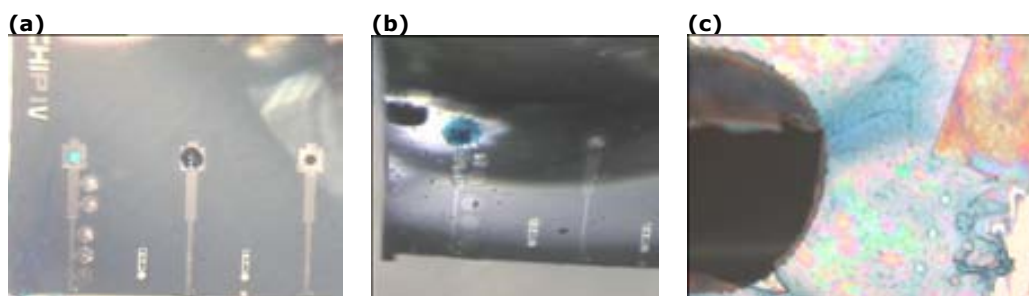


Figura 4.50: Imágenes ópticas de (a) llenado del depósito hasta membrana con tinta azul, (b) rotura de la membrana y (c) detalle de la zona de la membrana rota.

Se escogió tinta de impresora para evitar que se secase dentro del canal y lo obstruyera. Como su nombre indica es la tinta comúnmente utilizada en las impresoras de inyección por tinta. Al utilizar tinta diseñada para fluir por microcanales, podría facilitar la inspección de las micro/nanopipetas y la formación de burbujas en la punta. La tinta de impresora alcanzaba la zona de la cavidad de entrada y entraba en el microcanal. Al ejercer presión para generar la gota, la membrana se rompía y la tinta salía por ella.

Otra alternativa a introducir tinta por presión o por capilaridad, sería introducirla mediante la aplicación de campos magnéticos. Existiría la posibilidad que mediante ese mismo campo magnético aplicado se pudiesen generar gotas. Los ferrofluidos son unos líquidos magnéticos, concretamente son una suspensión coloidal de partículas ferromagnéticas. La aplicación de un campo magnético, induce el movimiento del líquido. Para probar si el ferrofluido podría moverse a través de unos canales tan pequeños, se realizó una prueba con unos capilares de vidrio.

El movimiento de estos fluidos en los canales de las micro/nanopipetas se había probado en la primera generación pero el polisilicio de las paredes había dificultado su inspección y no se había demostrado el movimiento del ferrofluido en su interior.

La Figura 4.51a muestra una imagen de un capilar de vidrio con ferrofluido en su interior. Se puede observar como se genera una gota de ferrofluido en la punta al acercar un imán. En el caso de las micro/nanopipetas, al generar un campo magnético al aproximar un imán, el ferrofluido sólo llegaba hasta la cavidad de entrada (Figura 4.51b), pero el campo magnético no era lo suficientemente grande como para conducir al ferrofluido al interior del microcanal.

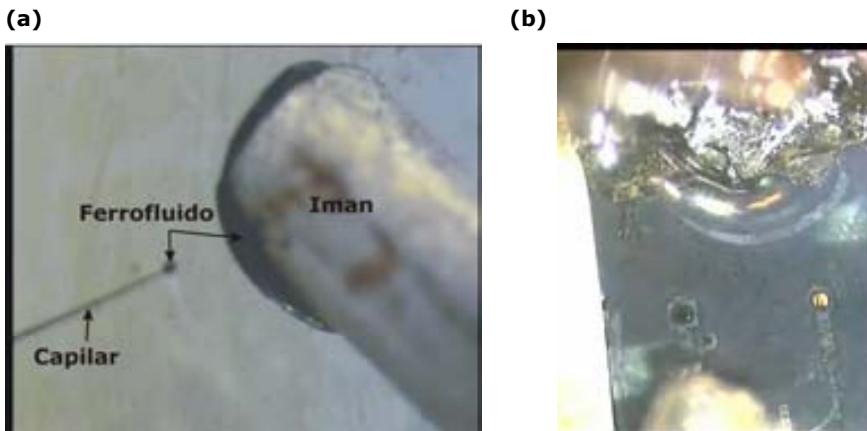


Figura 4.51: Imágenes ópticas de (a) ferrofluido dentro de un capilar de vidrio y (b) en la cavidad de entrada de la micro/nanopipeta.

En las pruebas realizadas hasta el momento se habían utilizado micro/nanopipetas con las paredes fabricadas en óxido de silicio para poder ver que sucedía dentro del microcanal. Este óxido había sido depositado por la cara componentes y por la cara dorso para definir la punta, pero este oxido no había entrado en la cavidad de entrada porque el chip de vidrio soldado lo había impedido. Las paredes de la cavidad de entrada eran de silicio y por tanto hidrofóbicas. Puede que esta fuera la causa que dificultaba la entrada de líquido en el microcanal de la pipeta ejerciendo presión o campos magnéticos. Para comprobar esta teoría, utilizaron chips con micro/nanopipetas fabricadas en polisilicio y oxidadas posteriormente. El hecho de introducir todo el chip en un horno para la oxidación del polisilicio haría que también se oxidaran las paredes de la cavidad de entrada.

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

Una vez oxidado el polisilicio se pegó con adhesivo el chip de vidrio para cubrir el canal-depósito de la cara dorso. No se podía realizar la soldadura anódica porque había crecido una capa de óxido en la cara dorso. Finalmente se realizaron las conexiones con los tubos de poliimida y se conectó el chip a una microbomba (New Era Pump Systems Inc, Wantagh, NY [21]) para tener mayor control de la presión aplicada. Al inyectar agua con un poco de tinta de color, se comprobó que entraba fácilmente por la cavidad de entrada como muestra la secuencia de imágenes de la Figura 4.52. El microcanal estaba vacío y su llenado con el agua a presión se producía lentamente. Este hecho concordaba perfectamente con los experimentos realizados con los capilares de vidrio, donde se había comprobado que para desplazar líquido dentro de un capilar de dimensiones reducidas, había que ejercer más presión cuando el líquido tenía que desplazar aire. En el caso de las micro/nanopipetas no se podía ejercer una mayor presión para introducir el líquido porque el aumento de la presión de inyección implicaba la rotura de la membrana. En su defecto, el líquido entraba lentamente llenando el microcanal. Se necesitó un largo periodo de tiempo para llenar el canal de la micro/nanopipeta. Esto concordaba con los resultados obtenidos en las pruebas realizadas con capilares de vidrio de diferente diámetro.

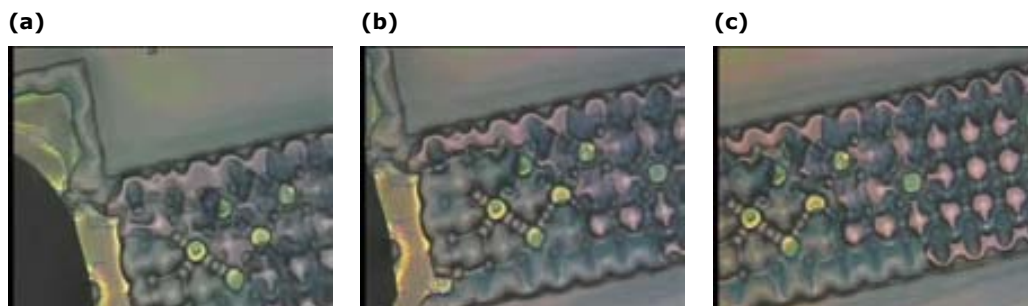


Figura 4.52: Secuencia de imágenes del llenado de la micro/nanopipeta inyectando líquido por la membrana.

Se inspeccionó la punta pero no se observó la formación de gota. Podría darse el caso que el volumen de gota formado en la punta fuera tan pequeño que se estuviera evaporando a medida que se formase, pero no se podía aumentar la presión ejercida para generarla porque se producía la rotura de la membrana.

En las pruebas realizadas con capilares de vidrio se había observado la formación de gotas para diámetros pequeños y esto era debido al diseño cónico que presentaban. Para poder observar la formación de gotas en las puntas de las micro/nanopipetas habría que mejorar su diseño en futuros dispositivos porque la sección rectangular de 1.5 μm de altura del canal era demasiado larga y provocaba pérdida de presión desde la cavidad de entrada hasta el orificio de salida de la punta. Estos nuevos diseños deberían tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- La cavidad de entrada a poca distancia de la punta.
- Sección cónica en el plano del microcanal.

4.5.3 Aplicación de las micro/nanopipetas en biología celular

Por otra parte, estas micro/nanopipetas habían sido diseñadas según los objetivos del proyecto MINAHE II para valorar su posible aplicación en experimentos biológicos con células vivas. En el caso de las micro/nanopipetas se realizaron unas primeras pruebas que consistieron en comprobar si la punta de las micro/nanopipetas podía atravesar o no la zona pelúcida y la membrana de ovocitos y embriones de ratón. Los capilares de vidrio utilizados normalmente atraviesan la zona y la membrana de una célula y se utilizan, entre algunos ejemplos, para la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en un ovocito [22] o la inyección de DNA en un embrión para la obtención de animales transgénicos [23]. El proceso de inyección requiere de dos capilares de vidrio, uno funciona como *holder* del ovocito o embrión a inyectar, sujetándolo. El segundo capilar actúa como pipeta para inyectar el espermatozoide, el DNA o partícula dependiendo del experimento a realizar. Una imagen de los dos capilares utilizados durante el proceso de inyección se muestra en la Figura 4.53.

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación



Figura 4.53: Imagen óptica de un embrión de ratón sujetado con el *holder* (izquierda) y con el capilar preparado para inyectar (derecha).

Cuando se trabaja con ovocitos humanos o con embriones de ratón, el capilar de inyección utilizado tiene la punta afilada para poder atravesar la zona pelúcida y la membrana sin lisar la célula. Para obtener el capilar con esta punta fina, se estira y divide en dos un capilar de borosilicato utilizando un *puller*. Este equipo calienta el capilar y lo estira produciendo la fracción del capilar en la zona estirada. Al estirar el vidrio se produce la reducción del diámetro del capilar. Para obtener el diámetro deseado, estira una determinada distancia y se aplica un golpe seco sobre la punta, aunque este método es poco preciso para diámetros inferiores a 5 μm . Este método no controla la forma de la punta obtenida. La micro/nanomecanización en FIB de las puntas de las micro/nanopipetas presenta una solución a este problema, ya que permite el control del tamaño y de la forma de las puntas sin la necesidad de ninguna máscara adicional.

En el caso de trabajar con ovocitos de ratón, como estos son delicados, la punta del capilar de inyección es plana. Para conseguir que atravesase la zona pelúcida y la membrana, este capilar va acoplado a un piezodrill que genera unas vibraciones que hacen que el capilar vaya golpeando la zona pelúcida y la membrana de la célula hasta que la punta se introduce a través de la zona pelúcida y la membrana del embrión. Para que estos golpes sean efectivos, el capilar suele contener mercurio en su interior [24, 25]. El mercurio utilizado no entra en ningún momento en contacto con la célula a inyectar, pero la contaminación producida por el mercurio es altamente conocida y es recomendable evitar su uso [26].

Kometani *et al.* han modificado capilares de vidrio utilizados en ICSI mediante deposición química en fase vapor en FIB (FIB-CVD) [27, 28]. La obtención de micro/nanopipetas utilizando la tecnología MEMS puede permitir la obtención de una gran variedad de microdispensadores con diferente número y forma de puntas. Además facilitará la implementación de sensores en su interior que podrían realizar medidas durante la inyección. Las ventajas de la nanomecanización en FIB se demostraron realizando las aperturas de la punta y la cavidad de entrada en los dispositivos de la primera generación [29]. En el apartado 4.4.4.7.2. *Nanomecanización con FIB* se explicó como se obtuvieron las aperturas de las puntas de las micro/nanopipetas afiladas con FIB de la segunda generación y como se obtuvieron puntas afiladas con ángulos de 5° y 15° . La Figura 4.54 muestra las puntas micromecanizadas con FIB y el ángulo con el que fueron afiladas. En cada chip había tres micro/nanopipetas, con un ancho de punta de 2, 4 y $10\ \mu\text{m}$ respectivamente. Los ángulos escogidos para afilar las puntas y realizar las pruebas intentando atravesar la zona pelucida y la membrana de oocitos y embriones fueron de 5° y 10° .

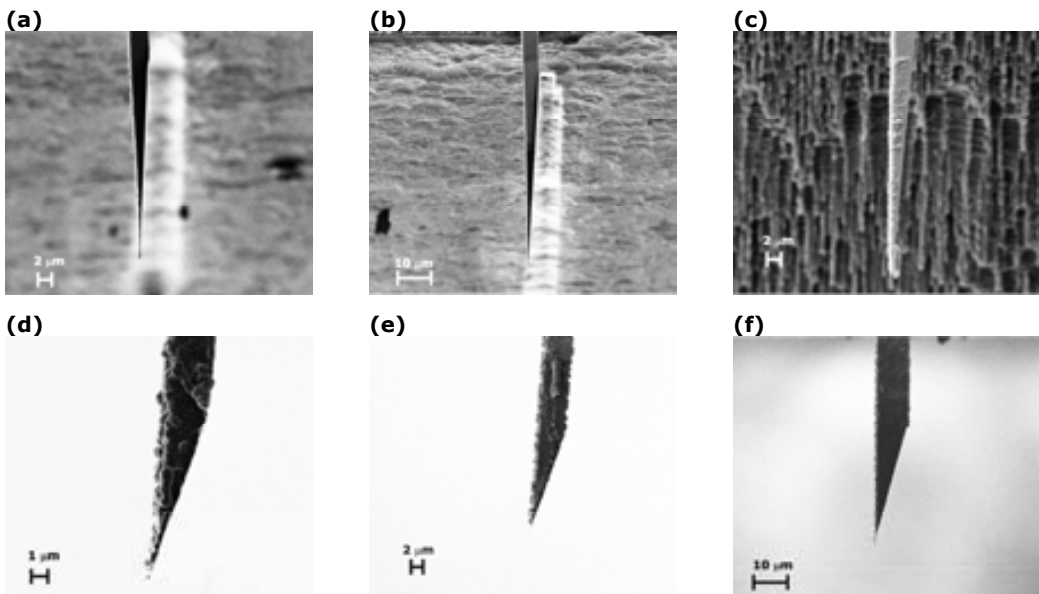


Figura 4.54: Imágenes SEM de puntas de micro/nanopipetas de 2, 4 y $10\ \mu\text{m}$ de ancho afiladas con FIB con ángulos nanomecanizados de (a – c) 5° y (d – e) 15° .

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

Se realizaron pruebas para comprobar si la punta de la micro/nanopipeta podía atravesar con éxito la zona pelúcida y la membrana de un ovocito y/o un embrión sin lisar la célula y sin el uso del piezodrill con el mercurio.

Fue posible realizar estas pruebas gracias a la colaboración en el proyecto de la *Unitat de Biologia Cel·lular* del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad Autónoma de Barcelona. El chip que contenía las tres micro/nanopipetas se acopló a un micromanipulador Cell Tram Vario (Eppendorf Ibérica S.L., San Sebastián de los Reyes-Madrid [30]) mediante un capilar de vidrio como muestra la imagen de la Figura 4.55.

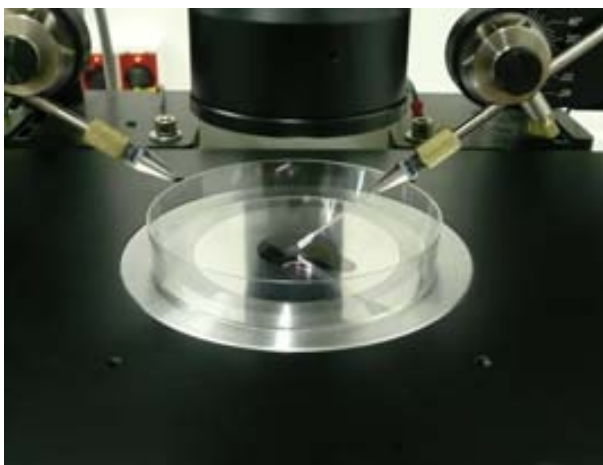


Figura 4.55: Fotografía del montaje realizado para los experimentos realizados con las micro/nanopipetas atravesando la zona pelúcida y la membrana de un ovocito y/o embrión.

4.5.3.1 Test inserción de puntas de micro/nanopipetas de aluminio y óxido de silicio

Una vez afiladas las puntas con ayuda del FIB, se realizaron las primeras pruebas sin grabar la capa de aluminio de las micro/nanopipetas para dotar la punta de una mayor rigidez y menor fragilidad. El proceso de inserción se muestra en los fotogramas de la Figura 4.56. El primer fotograma muestra una punta de micro/nanopipeta al lado de un embrión de ratón, el segundo muestra como esta punta intenta acceder al interior de la membrana del embrión sin éxito y el tercero muestra como ha conseguido atravesar la zona pelúcida y la membrana sin lisar de la célula. Comentar que los experimentos de inserción se realizaron sobre un mismo ovocito.



Figura 4.56: Fotogramas mostrando la secuencia del proceso de inserción seguido, (a) micro/nanopipeta en el exterior del embrión, (b) punta de la micro/nanopipeta intentando atravesar la zona pelúcida y la membrana de la célula y (c) punta en el interior del embrión.

La primera prueba consistió en comprobar si las puntas afiladas un ángulo de 5° con 4 y 10 μm de ancho atravesaban la zona pelúcida y la membrana de un ovocito de ratón sin lisar la célula. La punta de 4 μm consiguió atravesar con éxito la zona pelúcida y la membrana del ovocito sin lisarlo sin la ayuda del piezo. La punta de 10 μm no logró atravesar la zona pelúcida como se puede observar en la Figura 4.57.

(a) 4 μm – 5°



(b) 10 μm – 5°



Figura 4.57: Imágenes ópticas de un ovocito (a) punta de 4 μm afilada 5° en su interior y (b) punta de 10 μm afilada 5° intentando atravesar la zona pelúcida y la membrana sin éxito.

La siguiente prueba consistió en intentar atravesar la zona pelúcida de un embrión de ratón. Los experimentos se realizaron en un único embrión. Los resultados obtenidos se han esquematizado en la Tabla 4.VIII. Las puntas de 2 μm afiladas 5° y 15° respectivamente atravesaron con facilidad la zona pelúcida y la membrana de un embrión.

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

Las pruebas realizadas con la punta de 4 y 10 μm ofrecieron otros resultados. La punta de 4 μm afilada con un bisel de 5° atravesó con éxito la zona pelúcida y la membrana de la célula. Por el contrario, la punta con un bisel de 15° sólo traspasó la zona pelúcida, pero no la membrana.

La punta de 10 μm afilada 5° sólo consiguió traspasar la zona pelúcida con la parte biselada, pero no la membrana. Como los experimentos con las diferentes puntas se habían realizado sobre el mismo embrión, se comprobó que la inserción se había producido por el hueco que había dejado la punta de 2 μm al atravesar la zona pelúcida en una prueba anterior.

Tabla 4.VIII: Resultados obtenidos en los experimentos realizados con las micro/nanopipetas de aluminio para atravesar la zona pelúcida y la membrana de un embrión. Los experimentos se realizaron sobre el mismo embrión.

	2 μm	4 μm	10 μm
5°	✓	✓	~ Entra sólo parte biselada por donde había entrado la punta de 2 μm en una prueba anterior
15°	✓	~ zona pelúcida	*

La Figura 4.58 muestra imágenes ópticas de las inserciones realizadas. La Figura 4.58(a) muestra la imagen de la punta de 4 μm afilada 5° atravesando con éxito la zona pelúcida y la membrana, la Figura 4.58b muestra como atravesaba la zona pelúcida, pero no la membrana con la zona biselada de 15° de la punta de 4 μm . La punta de 2 μm afilada con un bisel de 15° atravesaba con facilidad la zona pelúcida y la membrana del embrión (Figura 4.58c). Por el contrario, la punta de 10 μm afilada con un bisel de 15° (Figura 4.58d) no atravesó ni la zona pelúcida ni la membrana del embrión (Figura 4.58e).

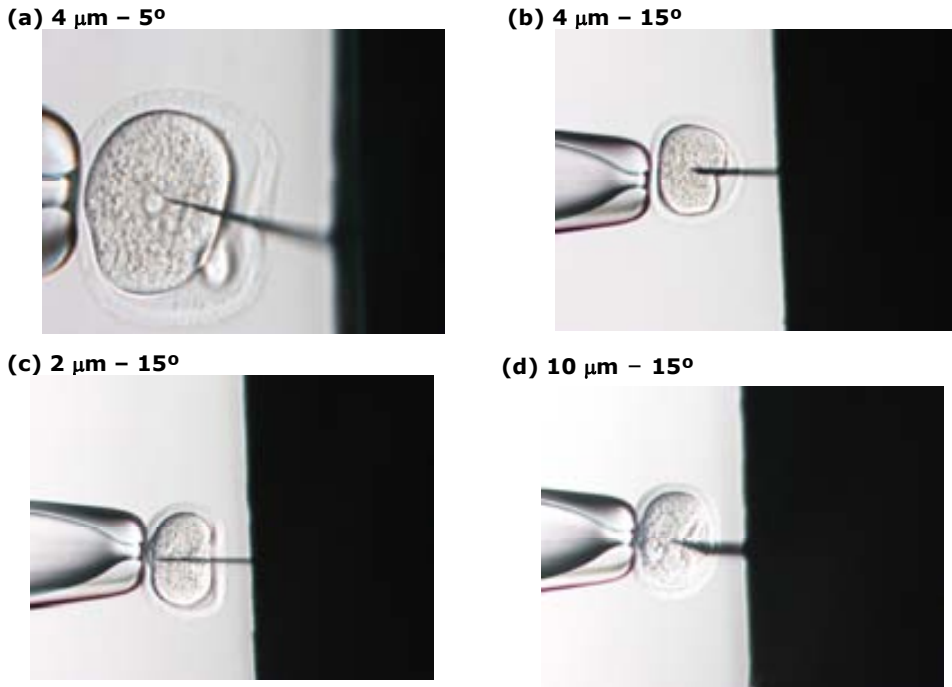


Figura 4.58: Imágenes tomadas durante los test de inserción en un mismo embrión para puntas de aluminio y óxido de silicio de 4 μm afiladas (a) 5° y (b) 15° , (c) de 2 μm con 15° y (d) de 10 μm con 15° . Las puntas que atravesaron sin dificultad la zona pelúcida y la membrana de los embriones fueron la de 2 μm con 5° y 15° y de 4 μm con 5° .

4.5.3.2 Test inserción de puntas de micro/nanopipetas de óxido de silicio

Una vez comprobadas qué puntas con aluminio atravesaban con éxito la zona pelúcida y la membrana de un embrión y de un ovocito, se procedió al grabado de esta capa para definir el canal y obtener las micro/nanopipetas de óxido. Este tipo de puntas se corresponderían a su uso real. El canal estaría definido por unas paredes con un grosor máximo de 0.5 μm de óxido de silicio que podían no aguantar la presión necesaria para traspasar la zona pelúcida y la membrana. Para la punta de 10 μm afilada 5° , se intentó suavizar el escalón producido cuando la punta pasaba de la zona biselada a la no biselada pero la longitud del voladizo de 10 μm no fue suficiente para realizar ese tipo de corte. La imagen SEM de la Figura 4.59 muestra el escalón producido al realizar la zona biselada de 5° en la punta de 10 μm de aluminio.

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

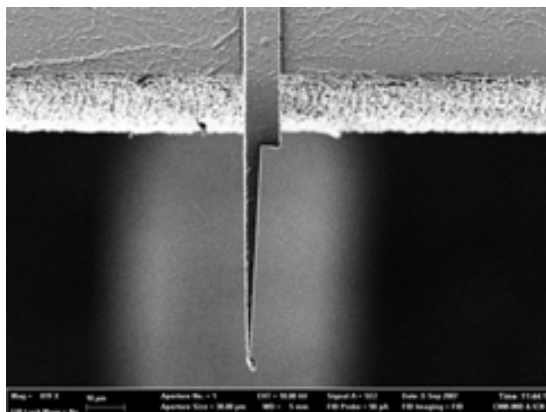


Figura 4.59: Imagen SEM de la punta de 10 µm afilada 5°

La Tabla 4.IX muestra los resultados obtenidos con los experimentos realizados con las puntas de óxido de silicio. Las puntas de 2 y 4 µm con un bisel afilado de 5° y 15° atravesaban fácilmente la zona pelúcida y la membrana del embrión sin lisar la célula. La punta de 10 µm con un bisel de 15° no consiguió atravesar la zona pelúcida y el bisel de 5°, como ya se ha comentado, no había podido ser fabricado.

Tabla 4.IX: Resultados obtenidos en los experimentos realizados con las micro/nanopipetas de óxido de silicio para atravesar la zona pelúcida y la membrana de un embrión. Los experimentos se realizaron sobre el mismo embrión.

	2 µm	4 µm	10 µm
5°	✓	✓	No tiene suficiente longitud el voladizo para afilar la punta
15°	✓	✓	*

Las imágenes de la Figura 4.60 nos muestran algunas de las inserciones realizadas con las puntas de óxido de silicio. Las puntas de 4 µm afiladas con un bisel de 5° y 15° respectivamente atraviesan con éxito la zona pelúcida y la membrana del embrión (Figura 4.60a y b) sin lisar la célula. La imagen de la Figura 4.60c muestran como las puntas de óxido de silicio de 2 µm de ancho afilada con un bisel de 15° también atraviesan la zona pelúcida y la membrana del embrión evitando el lisado de la célula y la rotura de la punta. Por el contrario, la punta de óxido de 10 µm afilada con un bisel de 15° no consigue atravesar la zona pelúcida del embrión (Figura 4.60d).

(a) 4 μm - 5°



(b) 4 μm - 15°



(c) 2 μm - 15°



(d) 10 μm - 15°



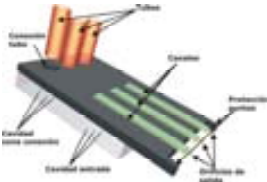
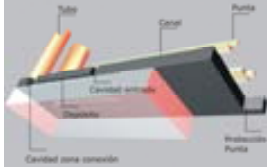
Figura 4.60: Imágenes ópticas tomadas durante los test de inserción realizados para puntas de micro/nanopipetas de óxido para la punta de 4 mm de ancho afilada (a) 5°, (b) 15°, y las puntas afiladas 15° de (c) 2 μm y (d) 10 μm . Las puntas que atravesaron sin dificultad la zona pelúcida y la membrana de los embriones fueron la de 2 μm con 15° y de 4 μm con 5°.

Los experimentos realizados han mostrado como la nanomecanización de la punta con FIB ha ofrecido un mayor control sobre la forma de la punta de las micro/nanopipetas fabricadas para atravesar fácilmente la zona pelúcida y la membrana de un ovocito y un embrión de ratón sin lisar las células. No se ha producido la rotura de la punta en ninguno de los experimentos realizados. El siguiente paso, actualmente en fase de desarrollo, consistirá en poder inyectar dentro del embrión con las micro/nanopipetas fabricadas.

La fabricación de estas micro/nanopipetas con tecnología MEMS facilitará en un futuro la integración de sensores en el microcanal para realizar medidas eléctricas o electroquímicas. También ofrece la posibilidad de poder fabricar en un futuro la pipeta *holder* y la de inyección en una única pieza, evitando de esta manera el proceso de alineamiento entre el capilar *holder* y el de inyección.

4.6 Conclusiones

A continuación se expondrán las conclusiones generales que se pueden extraer de los resultados obtenidos y discutidos en este capítulo:



- ✓ Se ha diseñado una segunda tecnología de micro/nanopipetas mejorando el diseño de la primera generación y solucionando los problemas detectados. Se han implementado las conexiones a los tubos externos con unos anillos, protecciones para las puntas en voladizo con unos salientes en la parte inferior del chip para evitar que reciban impactos durante el proceso de fabricación, extracción de la oblea o manipulación.

Se ha diseñado un depósito transparente por debajo del chip de silicio y se ha evitado la deposición de capa estructural en la cavidad de entrada al canal de la micro/nanopipeta con el chip de vidrio que cubría el depósito.

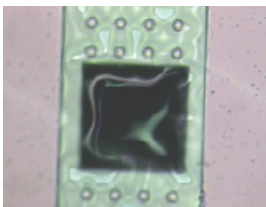


- ✓ Se ha conseguido un mayor control en la fabricación de las cavidades realizando grabados DRIE de silicio. Los chips han sido dotados de una cavidad de test para verificar el fin del DRIE realizado desde la cara posterior de la oblea de silicio hasta la cara componentes.



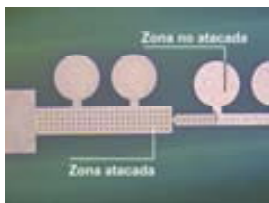
- ✓ Se han diseñado y fabricado por *Sand Blasting* chips de vidrio para cubrir el depósito fabricado en la cara dorso del chip de silicio.

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación



Después de definir el canal se ha oxidado la capa de polisilicio para convertirla en un material transparente.

- ✓ Se han diseñado micro/nanopipetas, con capa estructural transparente para aplicaciones biológicas, utilizando polisilicio como capa estructural y óxido de silicio como sacrificial.



- ✓ Se han obtenido micro/nanopipetas transparentes utilizando óxido de silicio como capa estructural y aluminio como capa sacrificial. Se ha definido el microcanal para micro/nanopipetas grabando la capa de aluminio.



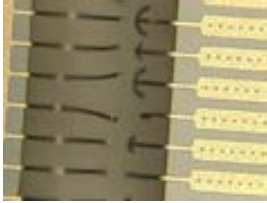
- ✓ Se ha evitado la etapa del serrado de las obleas incorporando unas estructuras para extraer los chips por Manual Cleaving. Tanto en el chip de vidrio como en el de silicio.



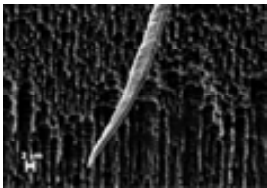
- ✓ Se han diseñado estructuras de test para indicar la evolución del grabado de la capa sacrificial para las micro/nanopipetas con capa estructural de polisilicio.



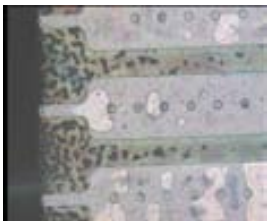
- ✓ Se han conectado con éxito los dispositivos a diferentes equipos gracias a los anillos mecanizados en la cara componentes del chip. Se ha comprobado que las conexiones eran resistentes y que no se producían fugas.



- ✓ La ruptura controlada de las puntas ha permitido obtener aperturas en las puntas sin necesidad de utilizar máscaras o procesos adicionales. Los puntos de anclaje y las partes en voladizo de la base y la punta han sido mejorados evitando la fractura en puntos no deseados.



- ✓ La micromecanización con FIB ha permitido obtener puntas extremadamente afiladas fabricando un bisel de 5° y 15° que han definido puntas de dimensiones nanométricas



- ✓ Se ha conseguido introducir líquido dentro del microcanal por capilaridad y por inyección, pero la dificultad se ha hallado al ejercer presión para generar una gota en la punta porque se producía la rotura de la membrana.



- ✓ Se ha comprobado la resistencia de la punta para atravesar la zona pelúcida y la membrana de una célula debido a su afilado nanométrico.



- ✓ Se ha realizado un estudio sobre la inserción de las puntas de micro/nanopipetas con diferentes ángulos. Se ha demostrado la viabilidad de las puntas de óxido de silicio para ser utilizadas en células. Las puntas de óxido de silicio que han atravesado la zona pelúcida y la membrana de la célula han sido de 2 y 4 μm afilada con ángulos de 5° y 15°.

4.7 Referencias

- [1] Grayson AC, Shawgo RS, Johnson AM, Flynn NT, Li YW, Cima MJ, and Langer R, *A Biomems Review: MEMS Technology for Physiologically Integrated Devices*, Proceedings of the IEEE, 92, 2004, 6-21.
- [2] Williams DF, *Williams Dictionary of Biomaterials*, Liverpool Univ. Press, Editor. 1999: Liverpool.
- [3] Kotzar G, Freas M, Abel P, Fleischman A, Roy S, Zorman C, Moran JM, and Melzak J, *Evaluation of MEMS Materials of Construction for Implantable Medical Devices*, Biomaterials, 23, 2002, 2737-2750.
- [4] *Little Things Factory GMBH* Available from: <http://www.ltf-gmbh.de/de/>.
- [5] Bridget A, Peeni M, *Sacrificial Layer Microfluidic Device Fabrication Methods*, Electrophoresis, 27, 2006, 4888-4895.
- [6] Peeni BA, Conkey DB, Barber JP, Kelly RT, Lee ML, Woolley AT, and Hawkins AR, *Planar Thin Film Device for Capillary Electrophoresis*, Lab on a Chip, 5, 2005, 501-505.
- [7] Barber JP, Conkey DB, Lee JR, Hubbard NB, Howell LL, Yin DL, Schmidt H, and Hawkins AR, *Fabrication of Hollow Waveguides with Sacrificial Aluminum Cores*, IEEE Photonics Technology Letters, 17, 2005, 363-365.
- [8] Kang SM, Park B, Nam IS, Lim CH, Ju H, and Lee SB, *Fabrication of on-Chip Nanofluidic Channels by Using Sacrificial Photoresist Ternplated Sio₂ Sputter Deposition*, Journal of the Korean Physical Society, 48, 2006, 883-887.
- [9] Plaza JA, Lopez MJ, Moreno A, Duch M, and Cané C, *Definition of High Aspect Ratio Glass Columns*, Sensors and Actuators A: Physical, 105, 2003, 305-310.
- [10] Villanueva G, Plaza JA, Sanchez A, Zinoviev K, Perez-Murano F, and Bausells J, *DRIE Based Novel Technique for AFM Probes Fabrication*, Microelectronic Engineering, 84, 2007, 1132-1135.
- [11] Fredrickson CK and Fan ZH, *Macro-to-Micro Interfaces for Microfluidic Devices*, Lab on a Chip, 4, 2004, 526-533.
- [12] Szekely L and Guttman A, *Simple Approaches to Close the Open Structure of Microfluidic Chips and Connecting Them to the Macro-World*, Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 841, 2006, 123-128.
- [13] Pan T, Baldi A, and Ziaie B, *A Reworkable Adhesive-Free Interconnection Technology for Microfluidic Systems*, Journal of Microelectromechanical Systems, 15, 2006, 267-272.
- [14] Gray BL, Jaeggi D, Mourlas NJ, Van Driehhuizen BP, Williams KR, Maluf NI, and Kovacs G, *Novel Interconnection Technologies for Integrated Microfluidic Systems*, Sensors and Actuators A-Physical, 77, 1999, 57-65.
- [15] Westberg D, Paul O, Andersson GI, and Baltes H, *A CMOS-Compatible Device for Fluid Density Measurements Fabricated by Sacrificial Aluminium Etching*, Sensors and Actuators A-Physical, 73, 1999, 243-251.

4. Micro/nanopipetas: Segunda generación

- [16] Westberg D, Paul O, Andersson GI, and Baltes H, *Surface Micromachining by Sacrificial Aluminium Etching*, Journal of Micromechanics and Microengineering, 6, 1996, 376-384.
- [17] Biswas K, Das S, Maurya DK, Kal S, and Lahiri SK, *Bulk Micromachining of Silicon in TMAH-Based Etchants for Aluminum Passivation and Smooth Surface*, Microelectronics Journal, 37, 2006, 321-327.
- [18] Biswas K and Kal S, *Etch Characteristics of KOH, TMAH and Dual Doped Tmah for Bulk Micromachining of Silicon*, Microelectronics Journal, 37, 2006, 519-525.
- [19] *Bd Medical - Diabetes Care* Available from: http://www.bddiabetes.es/cgi-bin/bd/bdweb/eservices/content/show.bd?Program=BDES.BDM_DC_PHOM&B_D_SID=UWtSRIV5NUNSRtFmUkVnPTpNQT09Ojo%3d.
- [20] Saya D, Leichle T, Pourciel J, Bergaud C, and Nicu L, *Collective Fabrication of an in-Plane Silicon Nanotip for Parallel Femtoliter Droplet Deposition*, Journal of micromechanics and microengineering, 17, 2007, N1-N5.
- [21] *New Era Pump Systems, Inc.*, Available from: <http://www.syringepump.com/>.
- [22] Devroey P and Van Steirteghem A, *A Review of Ten Years Experience of ICSI*, Human Reproduction Update, 10, 2004, 19-28.
- [23] Nagy A, Behringer K, *Manipulating the Mouse Embryo, a Laboratory Manual*, 2003, Cold Spring Harbor Laboratoy Press.
- [24] Ediz K and Olgac N, *Effect of Mercury Column on the Microdynamics of the Piezo-Driven Pipettes*, Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the ASME, 127, 2005, 531-535.
- [25] Ediz K and Olgac N, *Microdynamics of the Piezo-Driven Pipettes in ICSI*, IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 51, 2004, 1262-1268.
- [26] *La Evaluación Mundial Sobre El Mercurio Esta Disponible En*, Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, 2002, Ginebra
- [27] Kometani R, Morita T, Watanabe K, Kanda K, Haruyama Y, Kaito T, Fujita J, Ishida M, Ochiai Y, and Matsui S, *Nozzle-Nanostructure Fabrication on Glass Capillary by Focused-Ion-Beam Chemical Vapor Deposition and Etching*, Japanese Journal of Applied Physics Part 1-Regular Papers Short Notes & Review Papers, 42, 2003, 4107-4110.
- [28] Kometani R, Koike H, Kanda K, Haruyama Y, Kaito T, and Matsui S, *Evaluation of a Bio Nano-Sensing Probe Fabricated by Focused-Ion-Beam Chemical Vapor Deposition for Single Organelle Analyses*, Japanese Journal of Applied Physics Part 1-Regular Papers Brief Communications & Review Papers, 46, 2007, 7963-7965.
- [29] Lopez MJ, Caballero D, Campo EM, Perez-Castillejos R, Errachid A, Esteve J, Plaza JA, *FIB Assisted Technology in Sub-Picolitter Micro-Dispenser Fabrication*, Journal of Micromechanics and Microengineering, 18 (2008) 075021
- [30] *Eppendorf*, Available from: <http://www.eppendorf.com/es/>.

Dispositivos adicionales obtenidos con la tecnología de segunda generación



En los capítulos anteriores se han explicado dos procesos tecnológicos diferentes para la fabricación de micro/nanopipetas. La detección de problemas durante la primera generación condujo a una búsqueda de posibles soluciones y al diseño de un nuevo proceso tecnológico. Uno de los objetivos de la segunda tecnología desarrollada era la versatilidad que podía ofrecer para fabricar otro tipo de dispositivos. Por este motivo, se incorporaron en el diseño de la máscara otro tipo de dispositivos microfluídicos diferentes a las micro/nanopipetas. Son estos dispositivos ofrecían la posibilidad de ser integrados monolítica o híbridamente. La tendencia a trabajar con pequeñas cantidades de líquidos fue la que condujo a intentar reducir el tamaño de los dispositivos utilizados para su manipulación como las micro/nanopipetas. Pero normalmente estos líquidos necesitan un tratamiento previo como puede ser el filtrado de partículas que podrían obturar los microcanales o la posibilidad de poder dispensar dos líquidos mezclados. Por este motivo, se creyó conveniente fabricar chips en silicio que contuvieran filtros y chips que contuvieran mezcladores. Para conseguirlo no se buscaba el diseño de un nuevo proceso de fabricación, el objetivo era conseguirlo sin modificar las etapas definidas para la fabricación de la segunda generación de micro/nanopipetas para demostrar la versatilidad que ofrece la tecnología desarrollada en silicio.

5.1 Micromezcladores

Un mezclador es un elemento importante dentro un sistema de microfluídica. Conseguir una mezcla rápida de sustancias o reactivos es un factor clave para análisis bioquímicos, dispensar fármacos o secuenciar y sintetizar ácidos nucleicos [1]. Esta mezcla es conseguida fácilmente en el mundo macro produciendo turbulencias en el flujo de los líquidos. Por el contrario, en la microescala resulta ser un proceso difícil [2]. A pesar de existir una rápida difusión, los flujos son laminares con números de Reynolds bajos. Con la ausencia de turbulencias, es difícil aumentar el área de contactos para que las moléculas se difundan y conseguir que se mezclen. Para intentar producir turbulencias en un canal de microfluídica se diseñaron unos microcanales que incorporaban lazos a lo largo de su recorrido. Estos lazos producían un aumento de las "turbulencias" y facilitaban el mezclado de los fluidos porque desviaban en punto el fluido del canal central y lo volvían a incorporar [3].

5.1.1 Proceso de fabricación de los micromezcladores

La Figura.5.1a muestra el diseño de la máscara utilizada para fabricar el chip que contenía el micromezclador. En el dibujo se han señalado las dimensiones de los canales fabricados. El canal del lazo tenía una anchura de 50 μm estrechándose en la salida hasta 15 μm para intentar crear turbulencias en el canal principal. El aspecto que ofrecía un lazo en el microcanal puede observarse en la Figura.5.1b. El chip que incluía el micromezclador fue intercalado en la misma oblea donde se iban a fabricar las micronanopipetas de la segunda generación. Destacar que en el diseño del chip mezclador se habían incluido el motivo de test del grabado DRIE, los anillos para poder encajar los tubos de poliimida y de esta manera conectar el microcanal a los sistemas adecuados de bombeo de líquido. También se habían incorporado los anclajes para poder separar fácilmente el chip de la oblea evitando la etapa de serrado.

5. Dispositivos adicionales

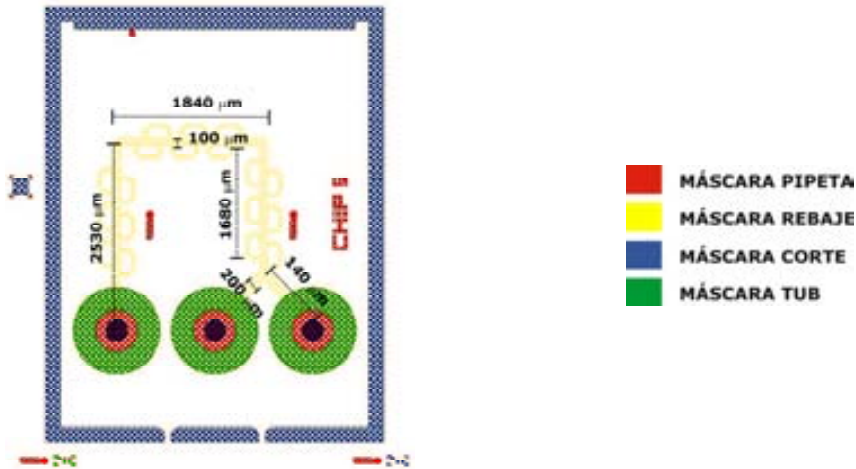


Figura.5.1: Dibujo de la superposición de máscaras para el chip con los micromezcladores,

Estos dispositivos se fabricaron simultáneamente y en la misma oblea que las micro/nanopipetas de la segunda generación y explicadas en el capítulo anterior 4. *Micro/nanopipetas: Segunda generación*. La Figura 5.2 muestra un resumen de la tecnología desarrollada. El material inicial fue una oblea de silicio de 500 μm pulida por las dos caras (Figura 5.2a). Sobre la cara componentes, se depositó y se estructuró la capa sacrificial (Figura 5.2b). Esta capa era la que definía el cuerpo de las micro/nanopipetas. En los chips de los micromezcladores esta capa definía la zona donde se abriría el silicio por el ataque profundo seco desde la cara dorso y definirían la entrada y la salida del micromezclador. Un proceso fotolitográfico por la cara dorso de la oblea (Figura 5.2c), seguido de un ataque seco RIE, estructuraba la capa de óxido que se había depositado en esa misma cara. En el caso de los micromezcladores, se utilizó para transferir la forma del microcanal y los lazos a la capa de óxido. Esta capa se utilizaría como máscara para el último ataque DRIE que se realizaría por la cara dorso. Éste fue el ataque que abriría la zona de entrada y de salida del microcanal. Tras el ataque de la capa de óxido, se quitó la fotoresina y se realizó otro proceso fotolitográfico por la cara dorso (Figura 5.2d). Esta fotoresina se utilizó para realizar un ataque seco profundo DRIE de casi todo el espesor de la oblea (Figura 5.2e). Este ataque no podía realizarse hasta el final de la oblea. Se dejaron entre 50-100 μm para poder realizar por la cara componentes un proceso fotolitográfico adicional seguido del segundo ataque seco profundo DRIE. Este ataque por la cara componentes definiría el anillo de dimensiones determinadas para acoplar el tubo de poliimida y poder realizar las conexiones del chip (Figura 5.2f).

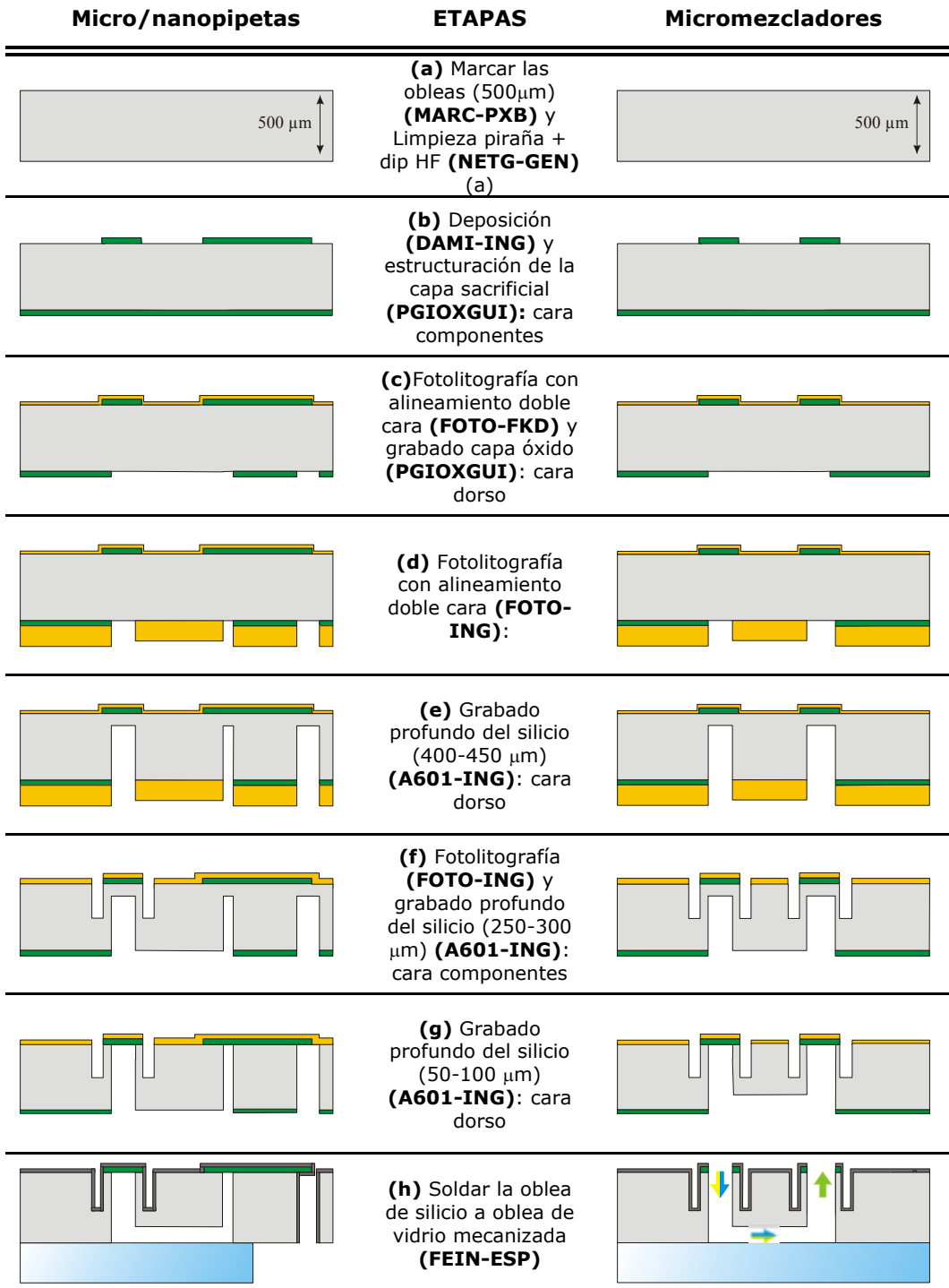
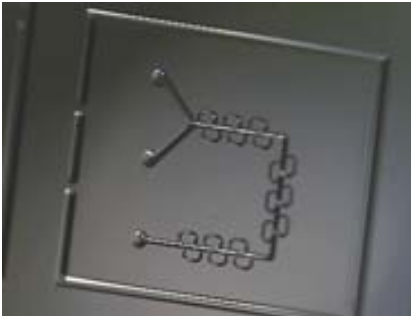


Figura 5.2: Proceso de fabricación de los micromezcladores simultáneo al proceso de fabricación de la segunda generación de las micro/nanopipetas

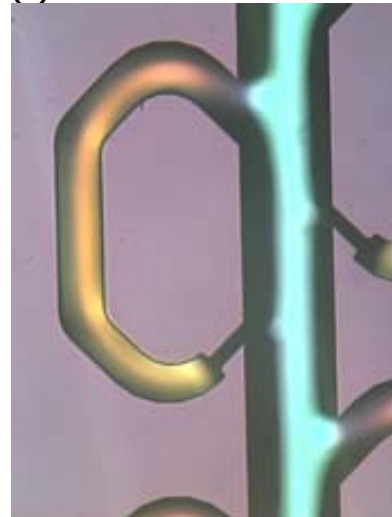
5. Dispositivos adicionales

A continuación se realizaría el último ataque seco profundo por la cara dorso de la oblea. Este ataque llegaría hasta la cara componentes y define la profundidad del microcanal y de los lazos de los micromezcladores. (Figura 5.2g). También dejará el chip individual anclado a la oblea por dos puntos. Utilizando el *Manual-cleaving* se evitaría el proceso de serrado para la obtención de los chips. Una vez realizados los ataques secos profundos, se elimina la capa de óxido de la cara dorso de la oblea. De esta manera se puede soldar anódicamente la oblea de silicio a una oblea de vidrio para cubrir el micromezclador por la cara dorso (Figura 5.2h). Con la oblea soldada, se deposita la capa estructural que definirá las paredes de la micronanopipeta. Aunque para los micromezcladores esta capa no era necesaria, como el proceso se realizaba a nivel de oblea, también se depositaba sobre los chips micromezcladores. Ejerciendo un poco de presión se liberará el chip de la oblea. La Figura 5.3a muestra una imagen óptica de la cara dorso de un chip con el microcanal y los lazos antes de soldar un chip de vidrio para cubrirlos y de liberar mediante pequeña presión el chip de la oblea de silicio. Un detalle del lazo diseñado puede observarse en la imagen de la Figura 5.3b. El aspecto final del chip micromezclador con el chip de vidrio soldado y los tubos de poliimida conectados puede observarse en la imagen óptica de la Figura 5.3b.

(a)



(b)



(c)



Figura 5.3: Imágenes ópticas (a) aspecto del micromezclador antes de soldar el chip de vidrio, (b) detalle del lazo diseñado para mezclar y (c) chip micromezclador soldado y con las conexiones realizadas.

5.1.2 Caracterización de los micromezcladores

Los primeros experimentos se realizaron conectando dos jeringas a los canales de entrada en forma de Y. La prueba consistía en introducir tinta de color azul por un canal y amarillo por el otro. Cuando estas tintas se mezclasen, se debería observar un color verde. Las jeringas se acoplaron a un microposicionador para intentar que las tintas entrasen al mismo tiempo en el microcanal.

La Figura 5.4 muestra una secuencia de imágenes con el resultado de una de las pruebas. Se puede observar como la tinta amarilla entraba por una de las entradas del microcanal y la tinta azul por la otra. A medida que avanzaba por el micromezclador se puede observar como tanto la tinta amarilla como la azul se desviaban por los lazos y volvían a incorporarse al microcanal. Este movimiento provocaba la aparición de tinta verde como resultado del proceso de mezcla que realizaban los lazos.

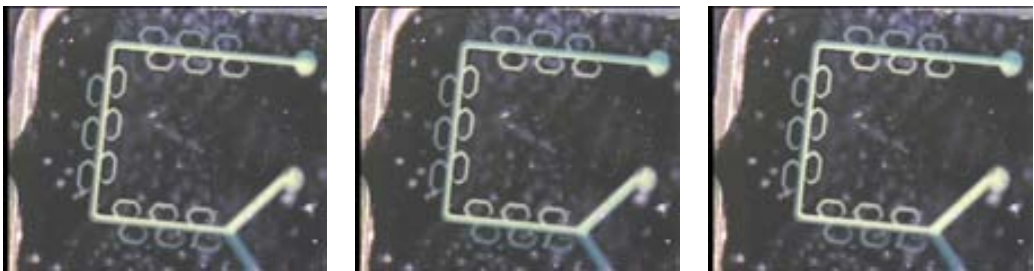


Figura 5.4: Secuencia de imágenes del experimento realizado con el micromezclador para conseguir mezclar tinta azul y tinta amarilla.

El montaje realizado no facilitaba la entrada simultánea de las tintas al microcanal y a veces favorecía únicamente la entrada de una de ellas. Con la ayuda del *Grup de Sensors i Biosensors* de la Universitat Autònoma de Barcelona se tuvo acceso a una microbureta XP3000 *Modular Digital Pump* Cavro (Tecan, Zurich) que permitió la entrada al micromezclador de las dos tintas de colores paralelamente. La Figura 5.5a muestra una fotografía con el nuevo montaje. El tubo de salida del micromezclador fue conectado a la microbureta. Los experimentos se realizaron aspirando líquido desde la salida en lugar de bombearlos desde las entradas. Cada uno de los tubos de entrada al micromezclador estaba sumergido en el recipiente que contenía la tinta de color correspondiente. Al aspirar con la microbureta, se producía el movimiento de las tintas y estas entraban en el canal. Los lazos del micromezclador conseguían mezclar las tintas como se muestra en la Figura 5.5b. Se

5. Dispositivos adicionales

observó que si se dejaba de aspirar durante un tiempo, la tinta utilizada se secaba dentro del canal y aunque no producía su obturación, si que impedía la entrada simultanea de las tintas.

(a)



(b)



Figura 5.5: Imágenes ópticas de (a) el montaje experimental mostrando la conexión entre el chip, la microbureta y las tintas de colores y (b) detalle del experimento realizado con el micromezclador.

5.2 Microfiltros

Los microfiltros son dispositivos cuya función principal es separar partículas que pueda contener un fluido según su tamaño. Se pueden utilizar para eliminar residuos que no interesan, y que si entrasen al canal, producirían su obturación o para obtener las partículas a estudiar y derivarlas al siguiente paso del estudio[4]. Estos microfiltros encuentran un amplio campo de aplicación en la biomedicina donde se utilizan por ejemplo para separar los glóbulos rojos de los blancos en muestras de sangre [5] o preparación de muestras de DNA [6].

5.2.1 Proceso de fabricación de los microfiltros

Se diseñaron y fabricaron tres tipos de microfiltros. El primero se basó en los microfiltros utilizados para separar biomoléculas [7] y consistían en la distribución de pilares rectangulares a lo largo de un microcanal como se muestra en la Figura 5.6a. Para el segundo y tercer diseño se distribuyeron una serie de pilares que iban aumentando en número a medida que avanzaba el canal, de esta manera se conseguía reducir la distancia entre columnas y por tanto reducir el tamaño de las partículas que tendrían acceso al canal. Estos dos diseños únicamente diferían en la forma de la sección de los pilares: cuadrados (Figura 5.6b) o redondos (Figura 5.6c). El uso de procesos microelectrónicos facilitaba el control del tamaño y la forma a escala micrométrica de los pilares que definían los microfiltros.

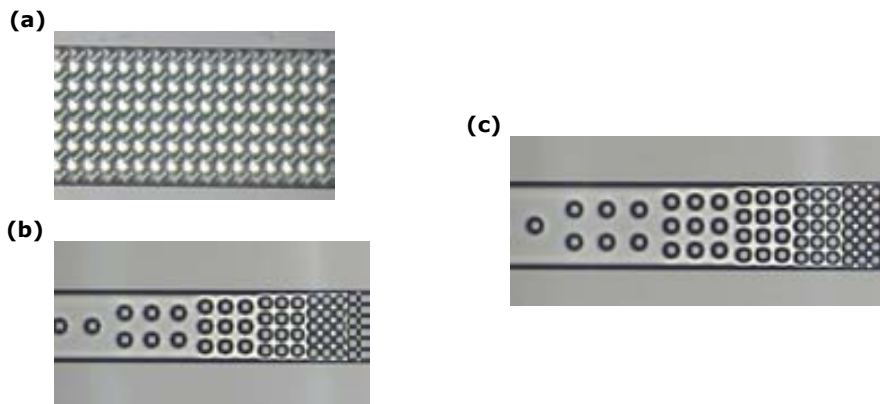


Figura 5.6: Imágenes ópticas de los tres tipos de filtro diseñados, (a) basados en separación ADN, exclusión partículas (b) cuadrado y (c) redondo.

5. Dispositivos adicionales

Los tres microfiltros fueron diseñados sobre un mismo chip que fue incorporado a la oblea que contenía las micronanopipetas. La Figura 5.7 muestra un dibujo de la superposición de máscaras utilizadas para la fabricación de este chip. Se distribuyeron tres canales correspondientes a los tres diseños realizados, el canal de la derecha representaría el primer diseño. El central y el de la izquierda se ajustaban al segundo y tercer diseño. Destacar del diseño que, además de incluir los motivos de alineamiento y de test del grabado profundo, se habían implementado los anillos para poder realizar las conexiones correspondientes con los tubos de poliimida y el sistema de extracción de los chips basados en el *Manual Cleaving*. Sobre la figura se han señalado las dimensiones de los canales. Los pilares rectangulares eran de $7 \times 21 \mu\text{m}^2$ distribuidos en filas de 7. Los pilares cuadrados y redondos habían sido distribuidos en grupos de tres filas con mayor número de columnas a medida que avanzaba el canal. Se inició la serie con filas de una columna, siguiendo con dos columnas separadas $54 \mu\text{m}$ cada una, tres columnas con una separación de $35 \mu\text{m}$, 4 columnas separadas $24 \mu\text{m}$, 5 separadas $16 \mu\text{m}$ y 6 con una distancia entre ellas de $10.5 \mu\text{m}$. La longitud de cada lado de los cuadrados de las columnas era de $20 \mu\text{m}$, igual que el radio de las columnas redondas que también era de $20 \mu\text{m}$.

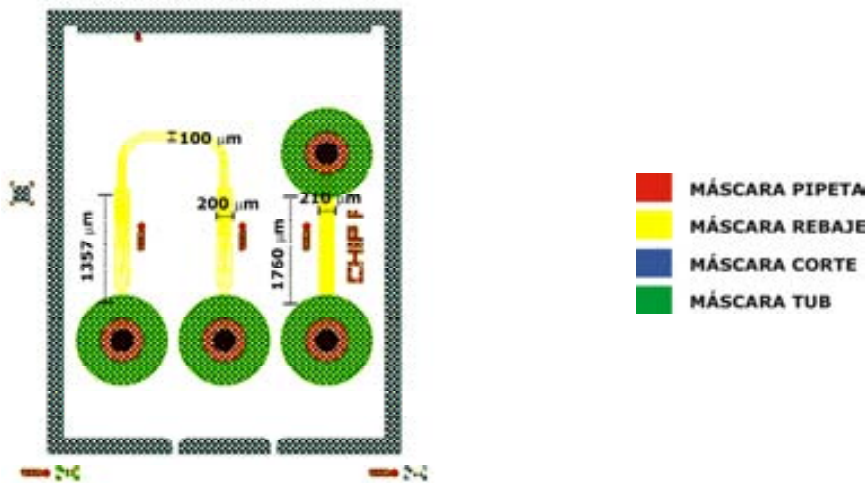


Figura 5.7: Dibujo de la superposición de máscaras para el chip con los microfiltros.

Los microfiltros se fabricaron simultáneamente con las micro/nanopipetas de la segunda generación y los micromezcladores. La Figura 5.8 muestra un resumen de la tecnología desarrollada, comparando el proceso de fabricación de los microfiltros con el de las micro/nanopipetas.

Partiendo de una oblea de silicio de 500 μm pulida por las dos caras (Figura 5.8a), se depositó y estructuró la capa sacrificial por la cara componentes (Figura 5.8b) que definiría la entrada y la salida de los microfiltros. El proceso fotolitográfico realizado por la cara dorso de la oblea (Figura 5.8c), seguido de un ataque seco RIE, estructuraría la capa de óxido depositado previamente en esa misma cara. Esta capa se utilizaría como máscara para realizar las columnas que compondrían los microfiltros. Éste sería el ataque que abriría la zona de entrada y de salida de los microfiltros. Tras estructurar la capa de óxido depositada en la cara dorso, se eliminó la fotoresina y se realizó otro proceso fotolitográfico por la misma cara (Figura 5.8d). Esta fotoresina se utilizaría para realizar un ataque seco profundo DRIE de prácticamente todo el espesor de la oblea (Figura 5.8e). Se debían dejar entre 50-100 μm para poder realizar un proceso fotolitográfico por la cara componentes y el consiguiente ataque seco profundo DRIE que definiría el anillo para encajar los tubos de conexión por la cara componentes (Figura 5.8f).

5. Dispositivos adicionales

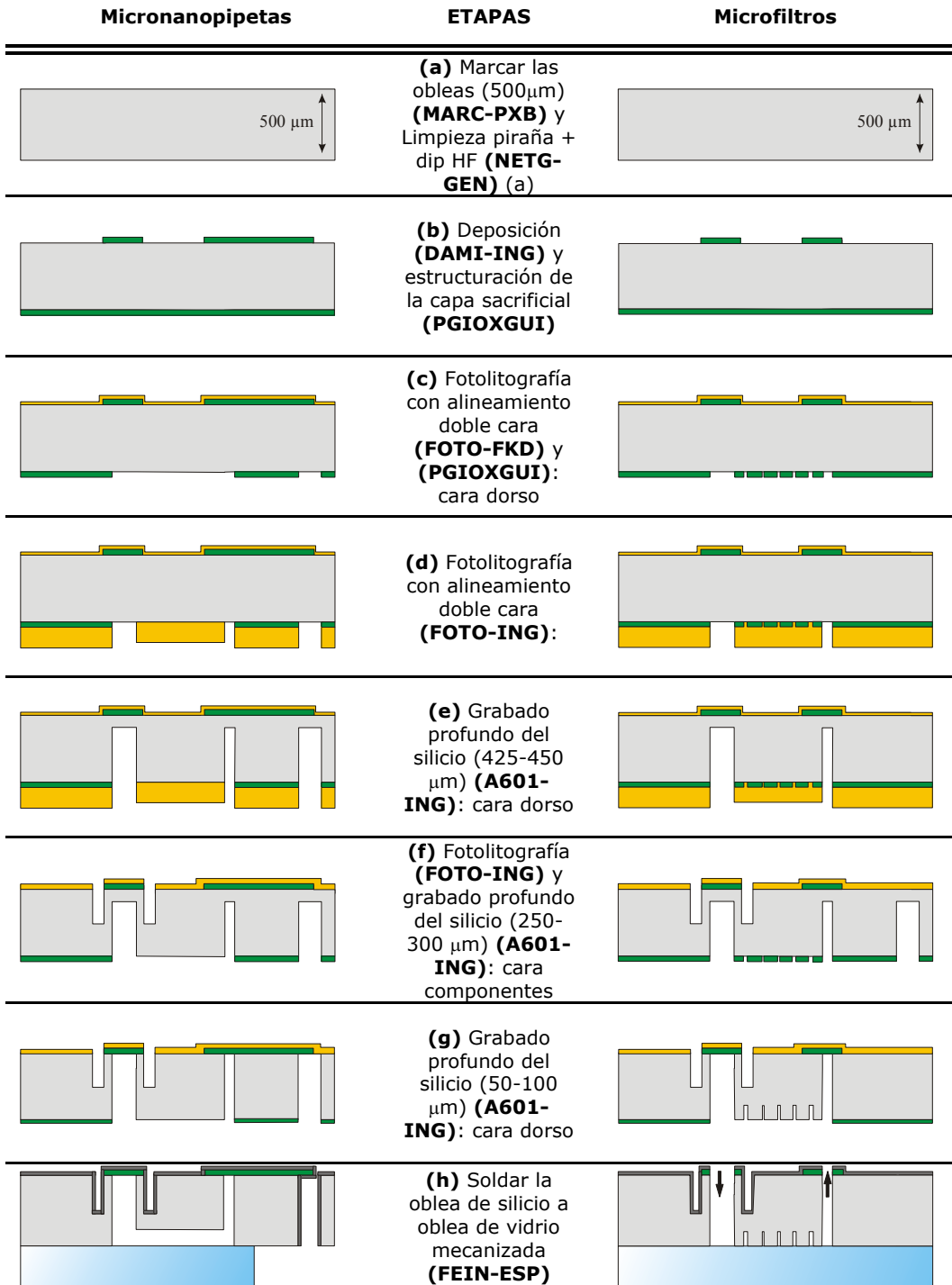


Figura 5.8: Proceso de fabricación de los microfiltros simultáneo al proceso de fabricación de la segunda generación de las micro/nanopipetas.

Para obtener el chip individual anclado al marco de la oblea de silicio y definir la altura de las columnas del microfiltro, se realizaría el último ataque seco profundo por la cara dorso de la oblea (Figura 5.8g). A continuación, se eliminaría la capa de óxido de la cara dorso de la oblea. De esta manera se podría soldar anódicamente la oblea de silicio a la oblea de vidrio para cubrir el canal del microfiltro por la cara dorso (Figura 5.8h). La experiencia previa del grupo [8] demostraba que se podía realizar la soldadura anódica de motivos extremadamente pequeños. Las imágenes SEM de la Figura 5.9 son una muestra de ello.

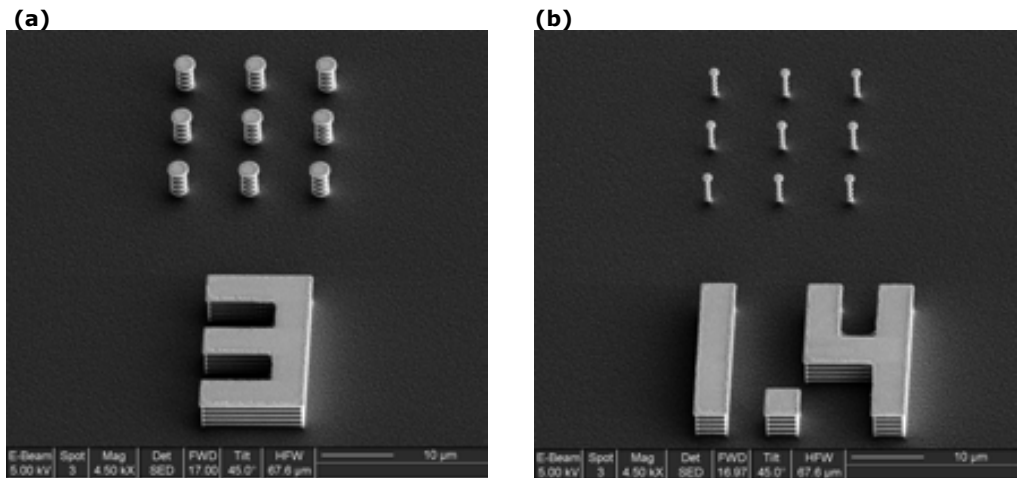


Figura 5.9: Imágenes SEM de motivos de (a) 3 y (b) 1.4 μm de silicio soldados anódicamente a vidrio [8]

Con la oblea soldada, en el proceso de fabricación de las micro/nanopipetas, se depositaría la capa estructural que definiría las paredes de la micro/nanopipeta. Esta capa también se depositaría en los chips microfiltros que estaban anclados a la oblea de silicio, aunque no era necesaria. Ejerciendo un poco de presión se liberaría el chip del marco de la oblea. La Figura 5.10a muestra una imagen óptica de la cara dorso de un chip microfiltro soldado a un chip de vidrio. El aspecto final del chip microfiltro con el chip de vidrio soldado y los tubos de políimida conectados puede observarse en la imagen de la Figura 5.10b.

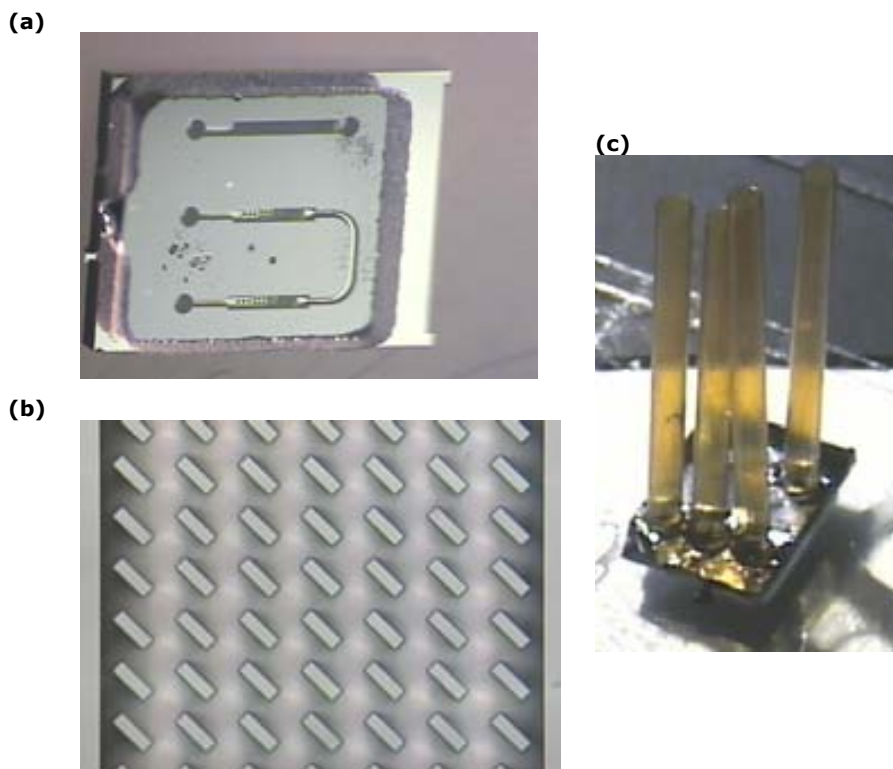


Figura 5.10: Imágenes ópticas (a) aspecto cara dorso de un chip microfiltro soldado a un chip de vidrio, (b) detalle del filtro rectangular y (c) chip microfiltro con las conexiones a los tubos de poliimida realizadas.

5.2.2 Caracterización de los microfiltros

Para comprobar si se podían separar partículas de diferentes tamaño se preparó una suspensión de agua que contuviera partículas de Zeolita entre 40-60 μm y partículas de carbón activo triturado con un diámetro de partícula inferior a 10 μm . El diámetro de las zeolitas era de 100 μm pero fueron trituradas hasta que pasaban por un tamiz de 40-60 μm , es decir, las partículas con dimensiones superiores al tamaño del tamiz, no pasaban a través de él. La Figura 5.11 muestra el resultado del experimento. Se puede observar en la Figura 5.11a como los filtros paraban las partículas de zeolita a medida que disminuía la distancia que separaba las columnas. Como la profundidad del microcanal era de unas 100 μm , hubo que mover el foco del microscopio para observar como el carbono activo pasaba entre las columnas del filtro. La Figura 5.11b muestra el carbón activo a la salida del microfiltro.

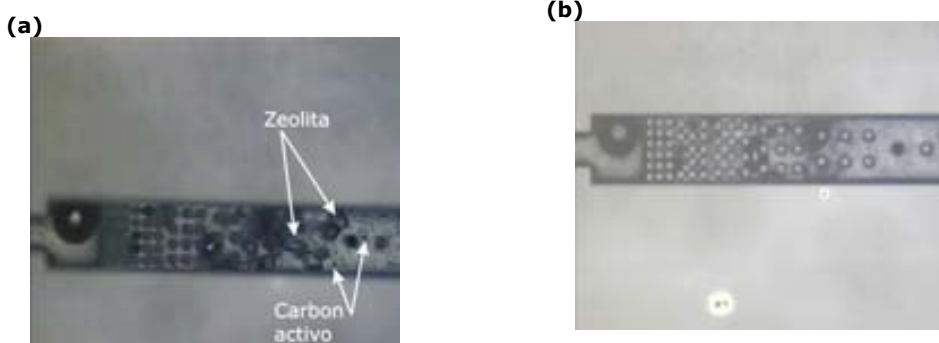


Figura 5.11: Imágenes ópticas de un microfiltro (a) enfocando las partículas de zeolita y (b) enfocando el carbono activo.

El filtro formado por columnas en forma de rectángulo no pudo ser utilizado, se observó que todas las columnas estaban caídas a lo largo del microcanal. Para comprender porque no habían sobrevivido este tipo de columnas, se realizó un run con tres obleas para realizar un ataque seco profundo DRIE de diferentes profundidades: 10, 50 y 100 μm .

5.2.3 Caracterización altura columnas microfiltros

Caracterización altura columnas microfiltros		
1. INICIO		1 - 3
2. Marcar las obleas (MARC-PAA)		1 - 3
3. Limpieza general simple (NETG-SIM)		1 - 3
4. Fotolitografía Especial (FOTO-ESP) Máscara: CNM231 - REBAJE		1 - 3
5. Grabado profundo del silicio (50, 100, 150 μm) (A601-ING)		1 - 3
6. Decapado de la resina (DEC-RES)		1 - 3
7. FINAL		1 - 3

5. Dispositivos adicionales

Después de marcar (**MARC-PAA**) y limpiar 3 obleas (**NETG-SIM**) se realizó una etapa de fotolitografía (**FOTO-ESP**) depositando $2\ \mu\text{m}$ de fotoresina. Esta capa ejercería de máscara en el posterior grabado seco profundo del silicio (**A601-ING**). Para realizar el estudio de la altura máxima de columnas de microfiltro que se podía obtener, se definieron diferentes profundidades de ataque: 10 , 50 y $100\ \mu\text{m}$ para las obleas 1, 2 y 3 respectivamente.

Inspeccionando las obleas después del grabado, se observó que los microfiltros con una altura de columna de $10\ \mu\text{m}$ correspondientes a la primera oblea procesada estaban intactos. Las imágenes SEM de la Figura 5.12 muestran el aspecto que presentaban las columnas de $10\ \mu\text{m}$.

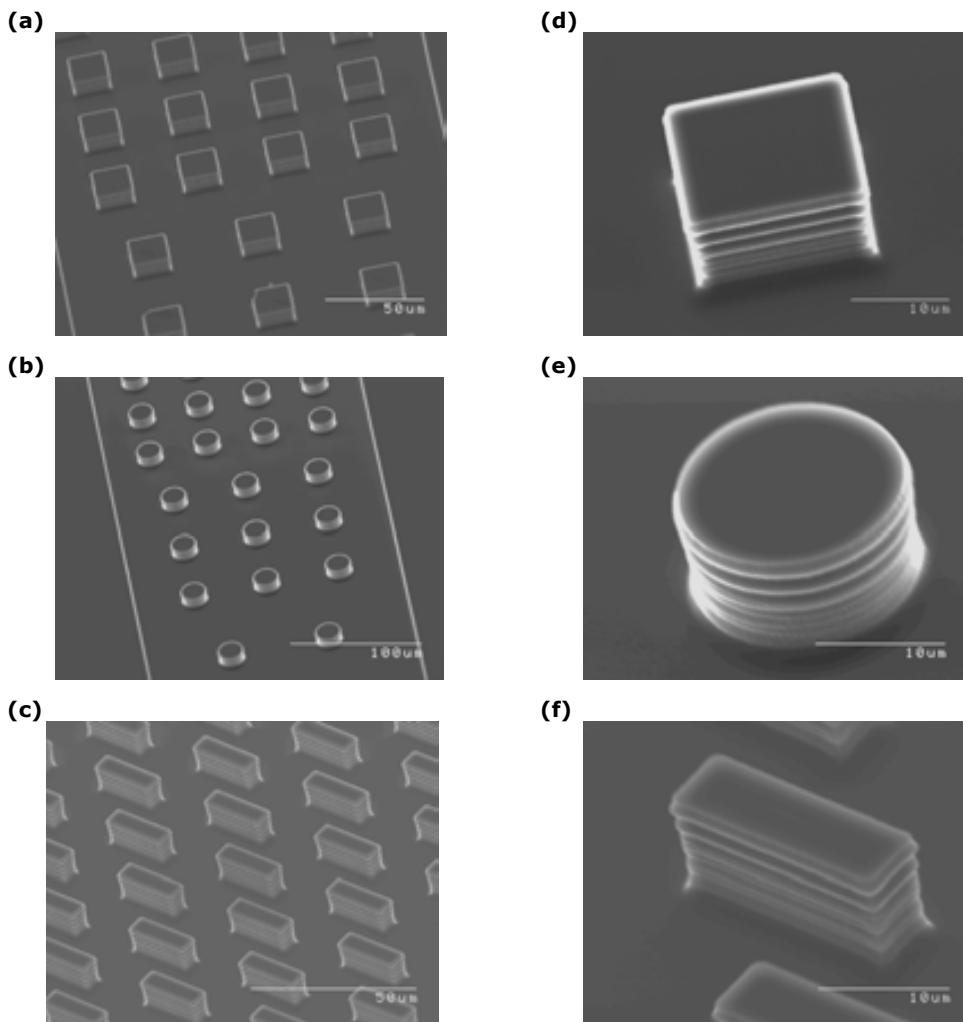


Figura 5.12: Imágenes SEM de los microfiltros de $10\ \mu\text{m}$ de altura en forma de (a) cuadrada, (b) redonda, (c) rectangular y (d-f) detalle de una columna de cada diseño.

El grabado profundo seco que grabó 50 μm de profundidad en el silicio de la oblea 2 definió filtros con columnas de 50 μm de altura. Las columnas cuadradas, redondas y rectangulares obtenidas se muestran en las imágenes SEM de la Figura 5.13. En las imágenes SEM que muestran las columnas en detalle se observa como los tres tipos de columna han quedado bien definidos.

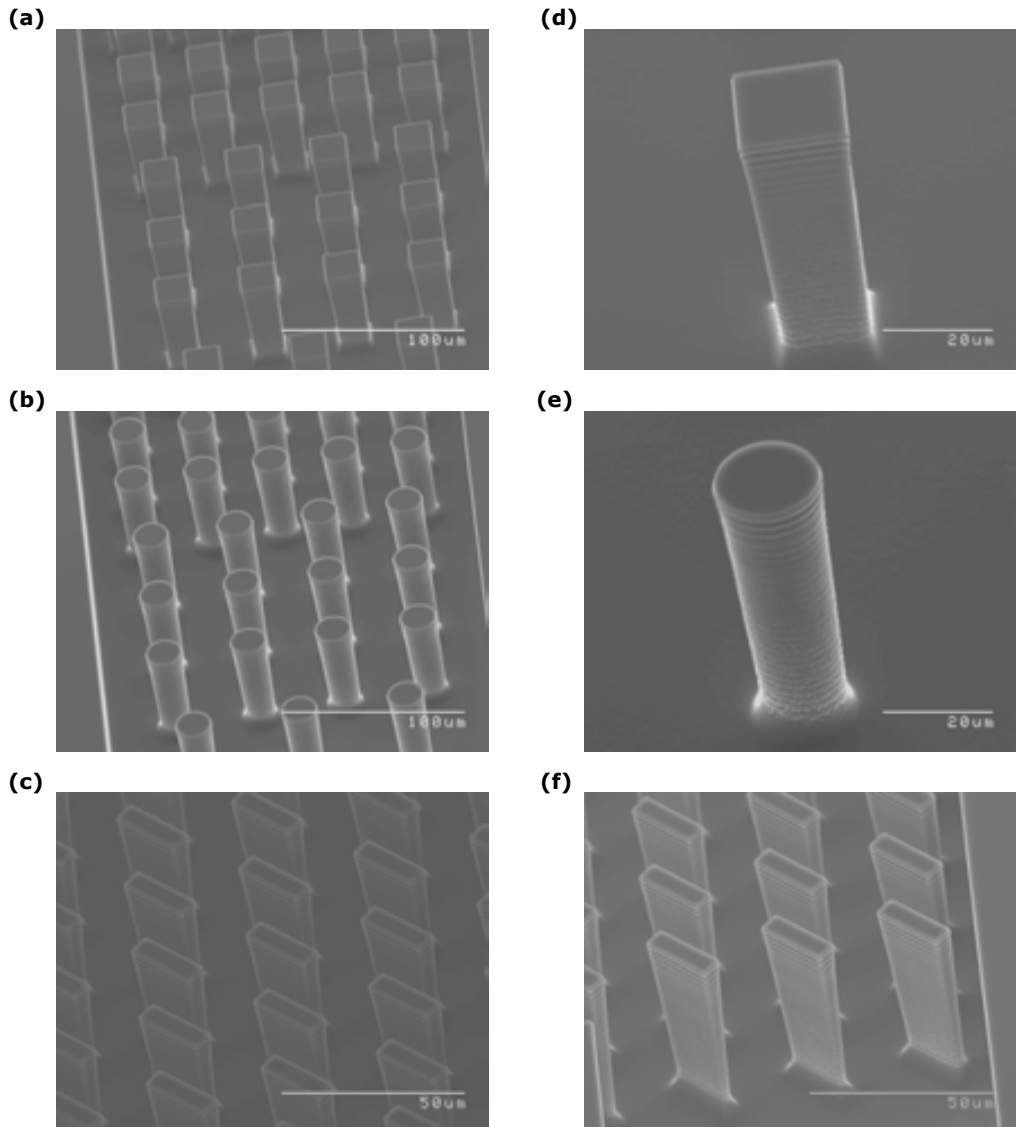


Figura 5.13: Imágenes SEM de los microfiltros de 50 μm de altura en forma (a) cuadrada, (b) redonda, (c) rectangular y (d-f) detalle de cada tipo de columna para cada forma diseñada.

5. Dispositivos adicionales

La inspección en SEM realizada para las columnas de 100 μm de altura mostró dos resultados diferentes. Las columnas con diseño cuadrado y redondo habían quedado perfectamente definidas (Figura 5.14a, b, d, e), no siendo el caso de todas las columnas rectangulares (Figura 5.14c) donde se encontraron motivos donde la base que quedaba después del ataque era prácticamente nula (Figura 5.14f). Debido a las dimensiones de este tipo de columna, las condiciones utilizadas para el DRIE habían grabado el silicio de la base disminuyendo el área, por el contrario la base de las columnas cuadradas (Figura 5.14d) o redondas (Figura 5.14e) era suficiente para mantener verticales las columnas de estos filtros.

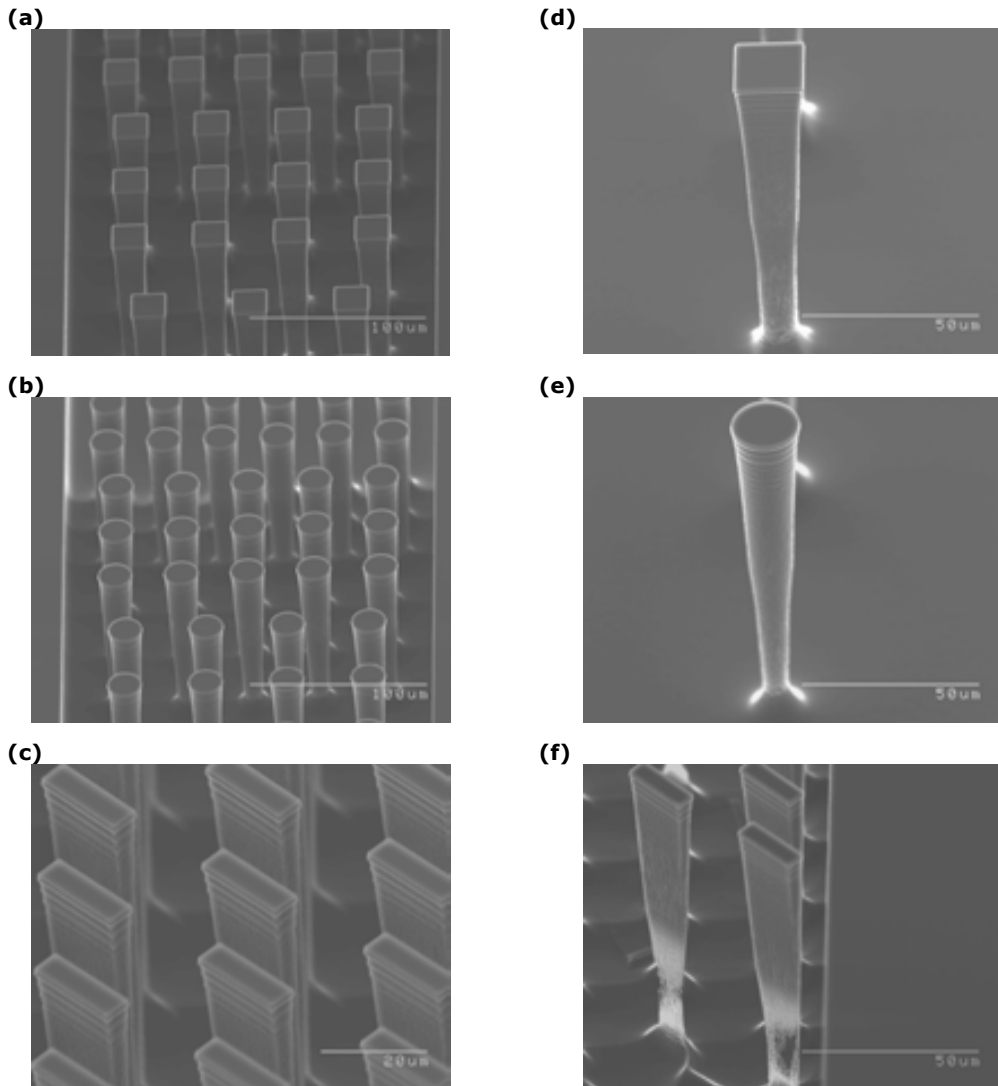


Figura 5.14: Imágenes SEM de los microfiltros de 100 μm de altura en forma (a) cuadrada, (b) redonda, (c) rectangular y (d-f) detalle de cada tipo de columna para cada forma diseñada.

Los grabados mostraron que podía controlarse la altura de las columnas con facilidad definiendo la profundidad de ataque del DRIE. Además si la etapa de fotolitografía permite la definición de motivos nanométricos, el posterior grabado profundo del silicio definirá nanocolumnas después de un trabajo de puesta a punto del proceso.

Los grabados de 10, 50 y 100 μm de profundidad también se realizaron con los micromezcladores ya que recordemos que se obtenían utilizando el mismo proceso de fabricación. Las imágenes SEM de la Figura 5.15 muestran los micromezcladores perfectamente definidos obtenido con los tres grabados diferentes.



Figura 5.15: Imágenes SEM de los micromezcladores fabricados con una profundidad de (a) 10, (b) 50 y (c) 100 μm .

5.3 Electroodos

Uno de los objetivos más interesantes de la capacidad de reducir el tamaño de los instrumentos de medida es poder realizar medidas eléctricas o electroquímicas a nivel celular [9-12]. Durante el proceso de fabricación de la segunda generación de micromanopipetas se habían modificado los materiales que definían el cuerpo y las paredes de las micromanopipetas para conseguir que estas fueran transparentes. Los materiales escogidos fueron aluminio y óxido. Se comprobó como el óxido envolvía todo el voladizo de aluminio para definir la punta de la micromanopipeta. El hecho de haber utilizado aluminio como capa sacrificial rodeado de una capa de óxido de silicio planteó la siguiente pregunta, ¿Qué ocurriría si no se grabara esta capa de aluminio? El aluminio es un material conductor, que además, en el caso de las micromanopipetas, estaba aislado por una capa de óxido. Si se pudiera descubrir el aluminio en determinados puntos, se podrían conseguir puntos de contacto para realizar medidas eléctricas y puntos donde realizar conexiones para obtener la lectura de esas medidas. En el capítulo 4. *Micro/nanopipetas: Segunda generación*, se ha demostrado como las puntas de aluminio traspasaban fácilmente la zona y la membrana de una célula por lo tanto, estas medidas eléctricas se podrían realizar en el interior de una célula. ¿Y si se pudieran realizar medidas electroquímicas? El aluminio al no ser un metal noble, no es un buen material para realizar este tipo de medidas. En este sentido, surgió la necesidad de desarrollar un proceso para depositar una capa de oro sobre el aluminio y conseguir de esta manera un microelectrodo para realizar medidas eléctricas o electroquímicas.

La tecnología para la fabricación de estas herramientas se ha basado en la de fabricación de micro/nanopipetas utilizando las mismas máscaras y runes para reducir el coste de desarrollo. Únicamente se han introducido unas etapas al final del proceso para descubrir la capa de aluminio. La Figura 5.16 muestra un resumen de la tecnología desarrollada para su fabricación. El material inicial es una oblea de silicio de 500 μm pulida por las dos caras (Figura 5.16a). En la cara componentes se deposita y estructura una capa de aluminio de 0.7-1.5 μm de espesor (Figura 5.16b). Ésta será la capa que se utilizará como material conductor para definir el microelectrodo. Un proceso fotolitográfico por la cara dorso de la oblea y un grabado seco estructuran una capa de óxido de silicio depositada en esa cara (Figura 5.16c). Este óxido será utilizado como máscara para el ataque seco DRIE del silicio por la cara dorso.

El grabado de la oblea de silicio por la cara dorso, realizado con el DRIE, consigue liberar el voladizo del electrodo del chip (Figura 5.16d) y se detiene al alcanzar la capa de aluminio y de fotorresina depositada en la cara componentes.

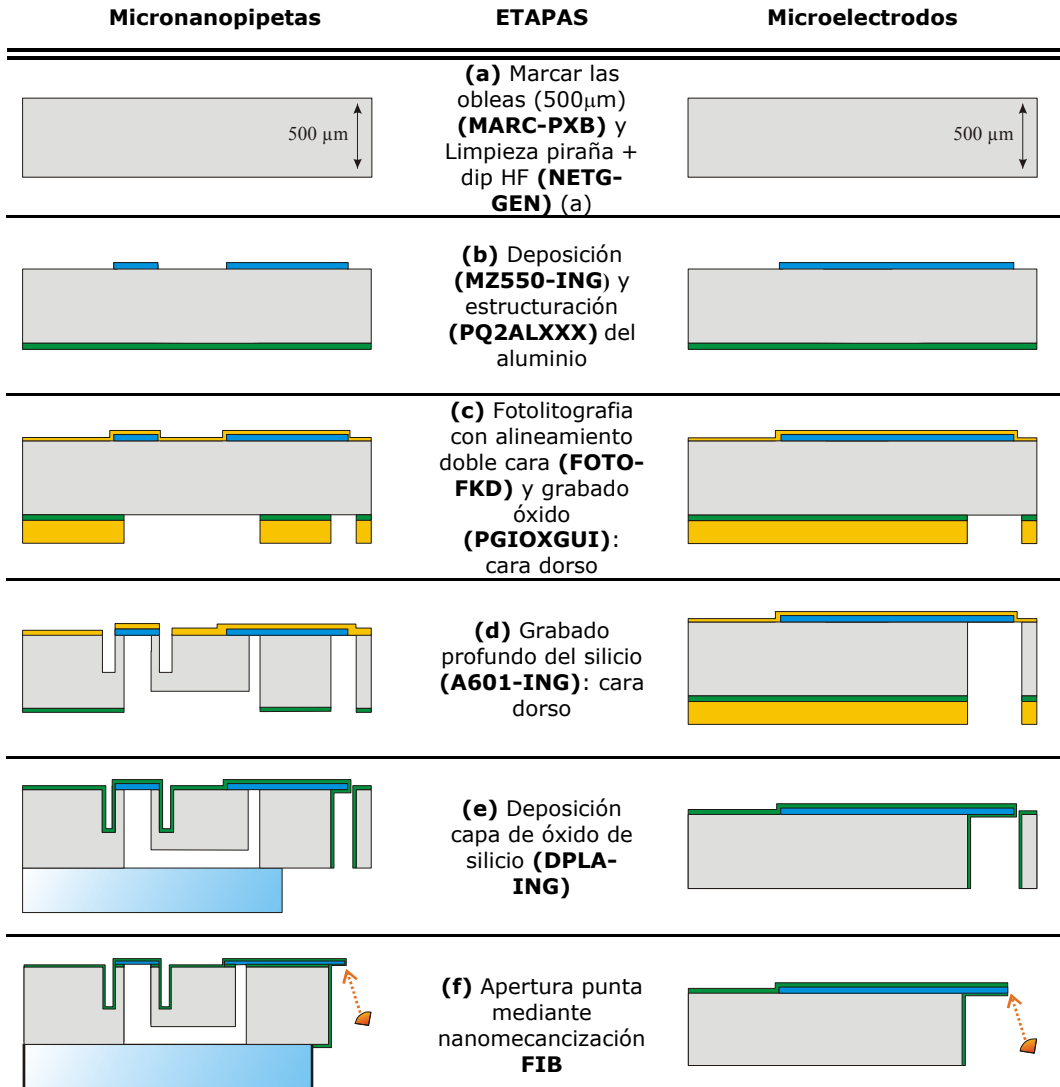


Figura 5.16: Proceso de fabricación de los electrodos simultaneo al proceso de fabricación de la segunda generación de las micro/nanopipetas.

El siguiente paso en el proceso de fabricación de las micronanopipetas hubiera sido la realización de la soldadura anódica para cubrir el canal-deposito de la cara dorso, pero en el caso de los microelectrodos no era necesario, por este motivo se

5. Dispositivos adicionales

depositó una capa de óxido por la cara componentes y otra por cara dorso (Figura 5.16e). Se consigue de esta manera envolver la capa estructurada de aluminio con la capa de óxido que servirá para aislar el electrodo. Se realizaron dos deposiciones por cada cara de la capa aislante para evitar fugas.

En este punto, todo el electrodo se encuentra forrado por la capa de óxido aislante, por lo tanto, hay que descubrir el aluminio en la zona del voladizo para definir la punta y en la parte opuesta de la capa de aluminio, que se encuentra sobre el chip de silicio, para conseguir realizar contactos eléctricos. Para la apertura de la punta del electrodo, se trabajó utilizando FIB (Figura 5.16f). El FIB había demostrado ser una herramienta muy útil y versátil abriendo y dando forma a las puntas de las micronanopipetas. La Figura 5.17 muestra imágenes SEM del aspecto de tres electrodos en voladizo de 2, 4 y 10 μm con el aluminio descubierto en la punta.

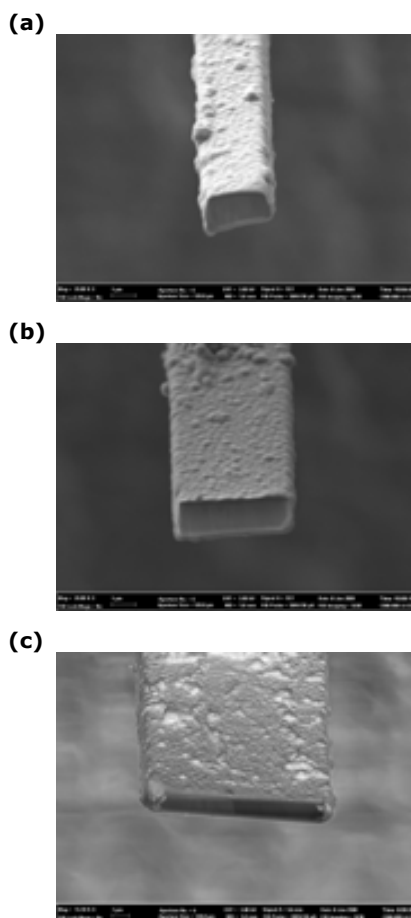


Figura 5.17: Imágenes SEM de tres electrodos en voladizo de (a) 2, (b) 4 y (c) 10 μm .

Para acceder a la capa de aluminio y poder realizar la posterior soldadura de hilos y obtener las conexiones eléctricas del chip al exterior se protege todo el chip con fotorresina y se ataca el mismo en SiO-Etch (Figura 5.18a). De esta manera se elimina el óxido que recubre el aluminio en la zona expuesta (Figura 5.18b).

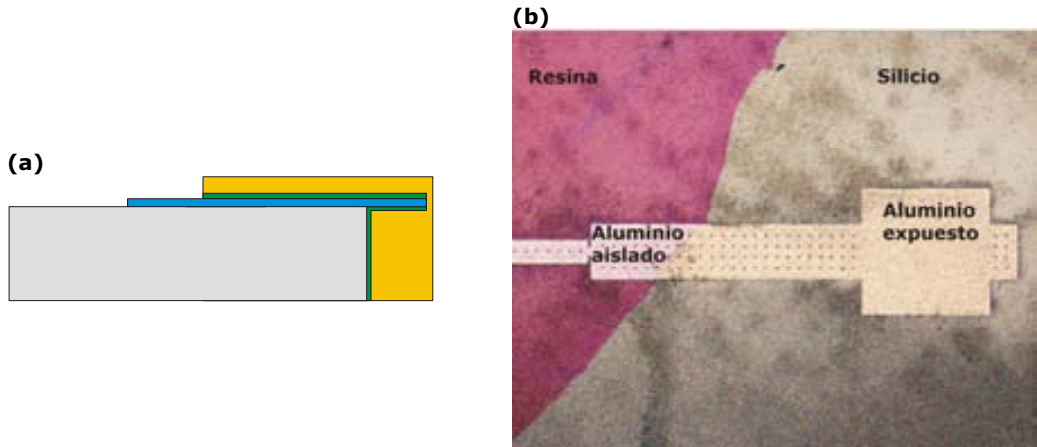


Figura 5.18: (a) Dibujo esquemático de la protección del electrodo con fotorresina y ataque en SiO-Etch para descubrir el aluminio en la zona de contacto y (b) imagen óptica del aluminio descubierto obtenido.

El Dr Miquel Vellvehí del IMB-CNM realizó una prueba para saber si se podía descubrir la capa de aluminio de manera selectiva y confirmar que conducía cuando estaba expuesta y que la capa de óxido la aislaba totalmente. Se realizaron medidas de conducción en una mesa de puntas (Semi-Automatic Preber WentWorth AWP-1050-HR) y se comprobó como las zonas abiertas presentaban un buen nivel de conducción, (Figura 5.19a) al contrario de las zonas donde todavía el óxido recubría el aluminio, se mostraban aisladas eléctricamente del exterior (Figura 5.19b).

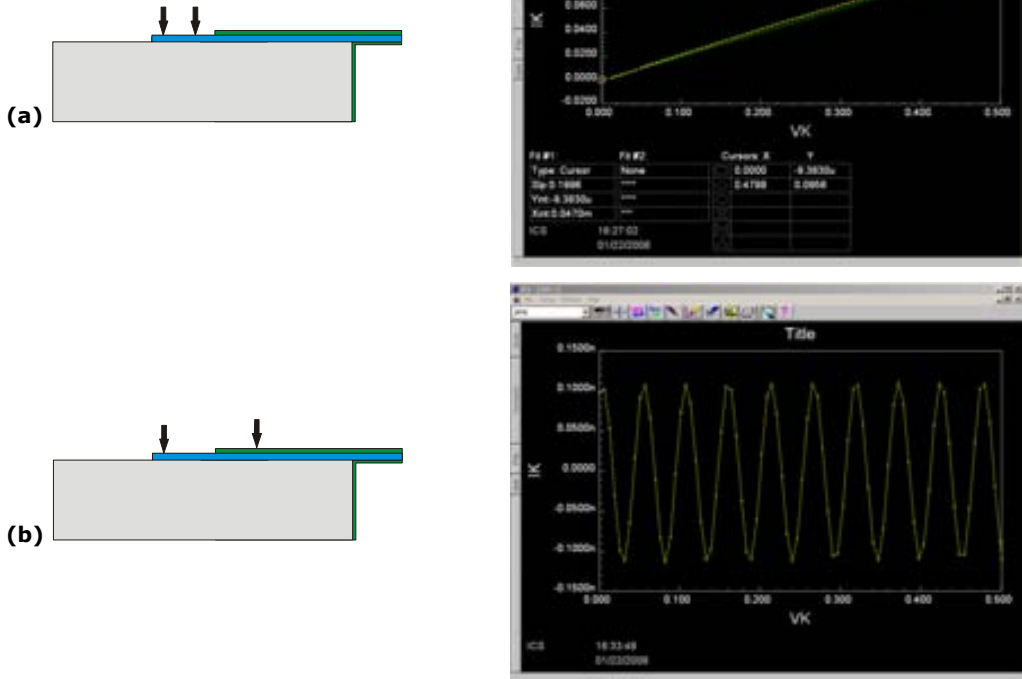


Figura 5.19: Medidas de conducción (Intensidad versus Voltaje): (a) Aluminio - Aluminio y (b) Aluminio - Oxido de silicio.

5.3.1 Deposición de oro por electroless

El aluminio no es un metal noble, además de ser tóxico para las células [13]. Esto significa que no es buen material para realizar medidas electroquímicas y por lo tanto para fabricar microelectrodos. El siguiente paso consistió en depositar oro [14]. Este material sí que presenta buenas condiciones para ser utilizado como electrodo en medidas electroquímicas. Al no haber realizado todavía los contactos eléctricos, esta capa de oro debía de ser depositada por electroless [15].

Este proceso había sido realizado sobre superficies expuestas de aluminio, pero no se conocía el comportamiento que podía tener sobre una superficie de aluminio en voladizo y recubierta de una capa de óxido. Para poder realizar medidas eléctricas o electroquímicas era necesario que la capa de oro estuviese en contacto con el aluminio. Por este motivo se realizaron una serie de experimentos, realizando deposición de oro por electroless.

Para poder observar el aspecto que ofrecía la capa, se realizaron cortes en la capa de oro depositada por electroless mediante mecanización en FIB. Los cortes en la capa depositada se realizaron en un CrossBeam 1560XB FIB (Carl-Zeiss, Germany) ubicado en la Sala Blanca del IMB-CNM. Las condiciones del grabado fueron una intensidad del haz de 2 nA y se definió una profundidad de corte de 3 μm para realizar el grabado en el modo de *Milling per Depth*.

5.3.1.1 Deposición directa de oro en las puntas de los microelectrodos

La primera prueba realizada consistió en intentar depositar oro directamente sobre la superficie de aluminio. Se sumergió un chip con los electrodos durante 90 s en el baño de oro a 80°C. Las imágenes SEM de la Figura 5.20 muestran como no se deposita ninguna capa de oro.

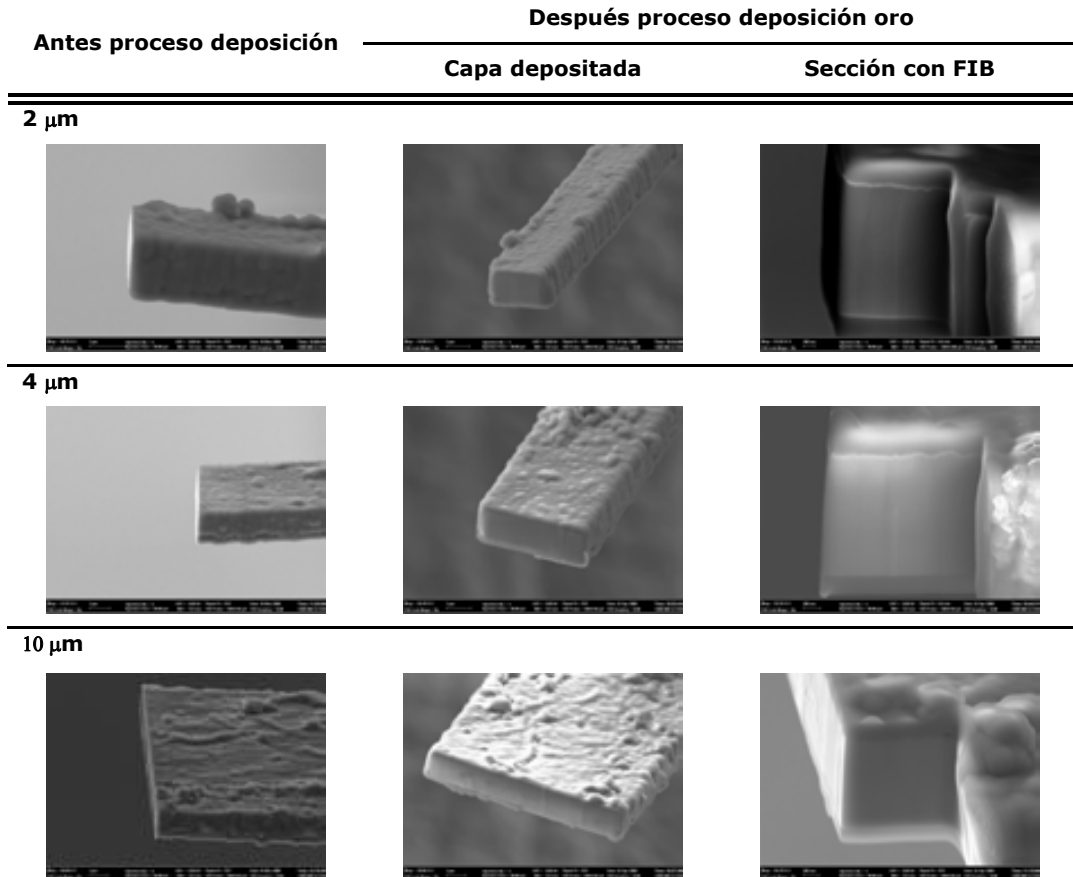


Figura 5.20: Imágenes SEM de los electrodos de 2, 4 y 10 μm después de intentar depositar oro sin éxito directamente sobre el aluminio (a) antes y (b) después de realizar un corte con FIB.

5.3.1.2 Estudio del proceso del electroless de oro en las puntas de los microelectrodos

Al no depositarse el oro directamente sobre el aluminio, el proceso para mejorar la deposición de esta capa fue el siguiente. Se empezó con una limpieza en ácido clorhídrico (HCl) seguida de una en H₂O durante 60 s. Se sumergió en la solución de zincado (solución de sales de Zinc, Panreac) durante 60 s. Esta solución redissuelve el posible óxido de aluminio que pueda haber en la superficie y la deja preparada para depositar Níquel. Si quedan restos de óxido de aluminio, el Níquel no se deposita. Después de aclarar en H₂O durante 60 s, se sumergió el chip en la solución de Níquel (Ni) durante 1.5 min a 90°C.

El baño de Níquel se encuentra a un pH de 4.5 Esta reacción es autocatalítica y redissuelve el compuesto formado por el zincado con el aluminio. Pasado este tiempo, se aclaró en agua y se sumergió en el baño de oro (Au) durante 1h. Las condiciones del baño de Au eran 80°C de temperatura y un pH de 11. En estas condiciones se debería depositar una capa de Au con un grosor de 0.5 μm. La Figura 5.21 muestra imágenes SEM de los electrodos en voladizo de 2, 4 y 10 μm con la capa de Au depositada.

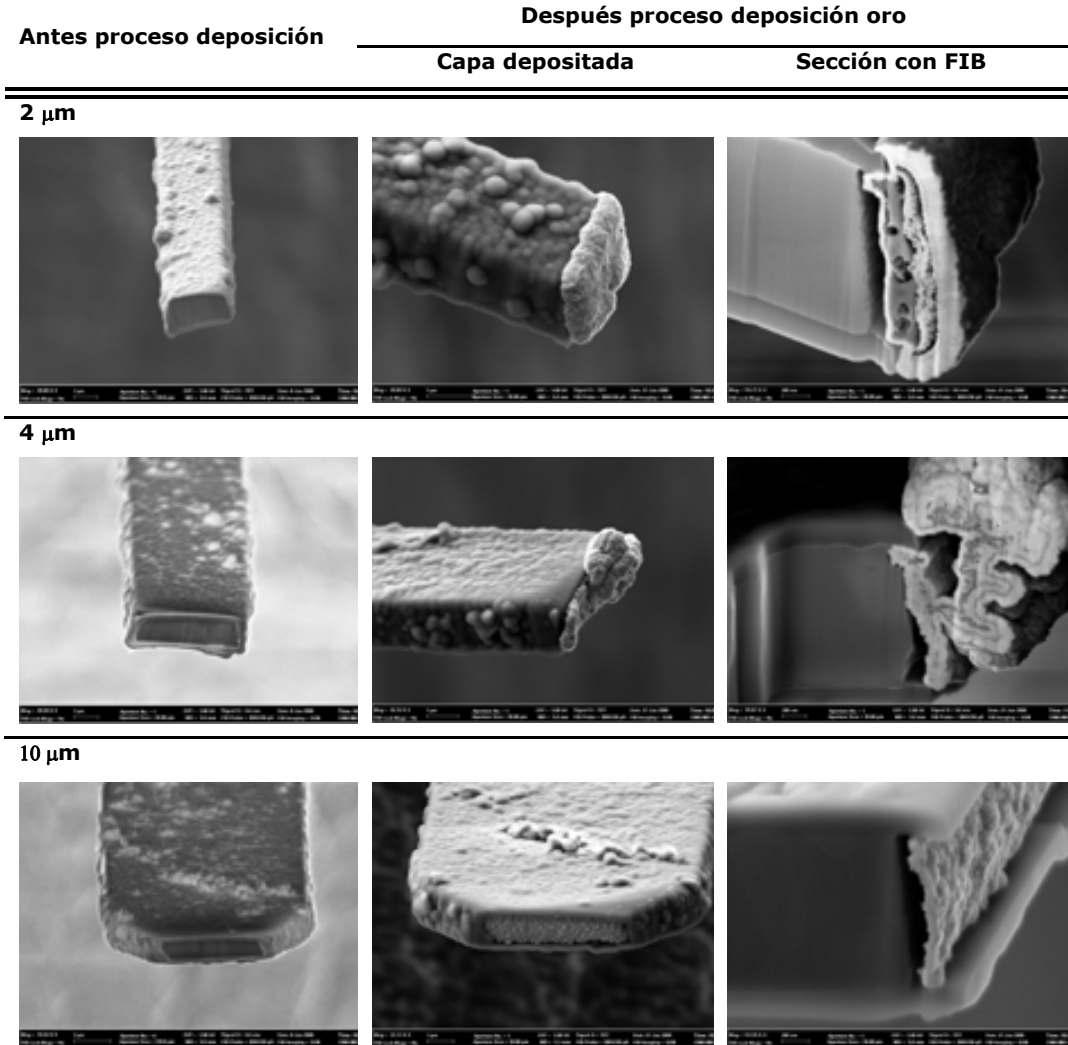


Figura 5.21: Imágenes SEM de los electrodos en voladizo con la capa de Au depositada para la punta de 2, 4 y 10 μm . Proceso seguido: HCl 60s + H₂O 60s + Zincado 60s + H₂O 60s + Ni 90s + H₂O + Au 1h

Esta capa parecía haberse depositado uniformemente en los electrodos de 2 y 10 μm . Para el electrodo de 4 μm se había concentrado la deposición en un punto probablemente debido a la existencia de algún resto que había favorecido la nucleación en ese punto. Al realizar el corte se observó que la capa depositada no estaba totalmente en contacto con la superficie de aluminio como muestran las imágenes anteriores. También se observó que el proceso debía haber sido diferente para cada punta porque el aspecto final que presentaban era totalmente diferente para cada electrodo, podría ser que dependiera del área de aluminio expuesta a la solución. Otro aspecto a resaltar fue que parecía que la capa de aluminio había

5. Dispositivos adicionales

retrocedido respecto la capa de óxido y que el proceso de electrodeposición la eliminaba, en pequeña proporción, pero suficiente para obtener unas capas depositadas que no entraban en contacto directo con el aluminio.

Para estudiar donde la capa depositada dejaba de estar en contacto con el aluminio, se realizaron diferentes pruebas para observar que aspecto tenía el electrodo en los pasos intermedios del proceso electroless seguido para depositar la capa de oro sobre el aluminio. El primer experimento consistió en sumergir un chip durante 1 min en la solución de Zincado después del proceso de limpieza. El aspecto de la capa depositada se muestra en las imágenes SEM de la Figura 5.22. Las imágenes mostraban una deposición irregular del compuesto formado entre el aluminio y el zincado.

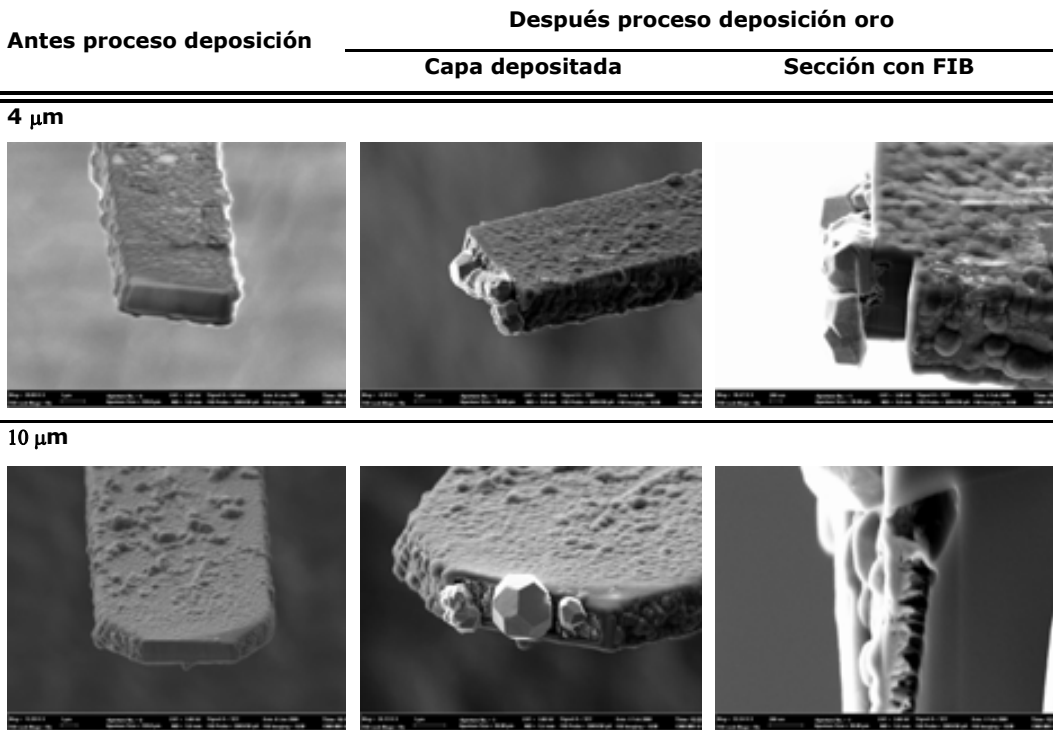


Figura 5.22: Imágenes SEM de los electrodos en voladizo con la capa formada después del zincado para las puntas de 4 y 10 μm . Proceso seguido: HCl + H₂O₂ + zincado 1min

Otro experimento, consistió en realizar una limpieza, sumergir el chip un minuto en la solución de zincado y por último un dip de 5 s en el baño de Níquel. El aspecto que mostraba la capa antes y después del corte en el FIB se muestra en la Figura 5.23. Parecía que el Níquel no había podido disolver la capa formada durante el proceso de zincado en tan poco tiempo.

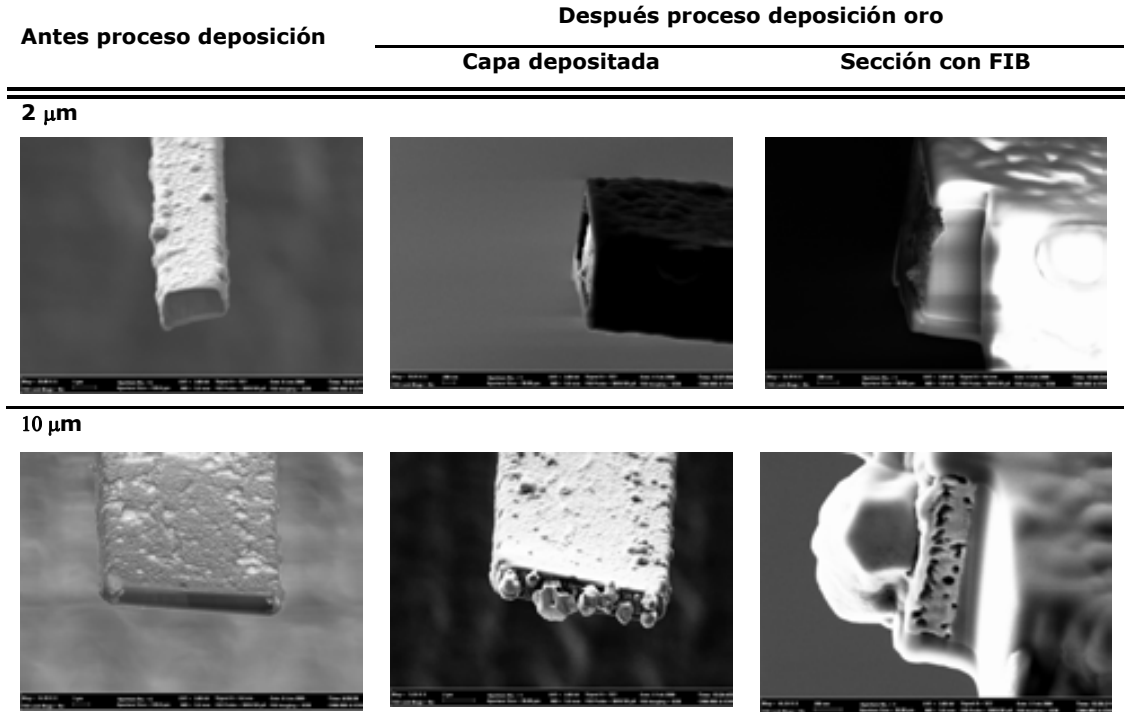


Figura 5.23: Imágenes SEM de los electrodos en voladizo con la capa formada después del baño de Ni para las puntas de 2 y 10 μm . Proceso seguido: HCl + H₂O₂ + zincado 1 min + Ni 5 s

Chai *et al.* habían demostrado que realizar un doble zincado suavizaba el aspecto de la capa formada sobre el aluminio [13]. Ese fue el siguiente paso a seguir, realizar un doble zincado e inspeccionar con la ayuda del FIB la capa depositada. Se realizó una limpieza en HCl y agua seguido del zincado durante 90 s como en los procesos descritos anteriormente. A continuación se eliminó la capa formada sumergiendo el chip en ácido nítrico (HNO₃) durante 30 s y se realizó un segundo zincado durante 45 s. El aspecto de la capa en los electrodos se muestra en las imágenes SEM de la Figura 5.24. Se puede observar como la capa depositada durante el proceso de doble zincado es más homogénea que cuando se realizaba sólo uno. Se observa como la diferencia de nivel entre el extremo de la capa de aluminio y la de óxido es mayor.

5. Dispositivos adicionales

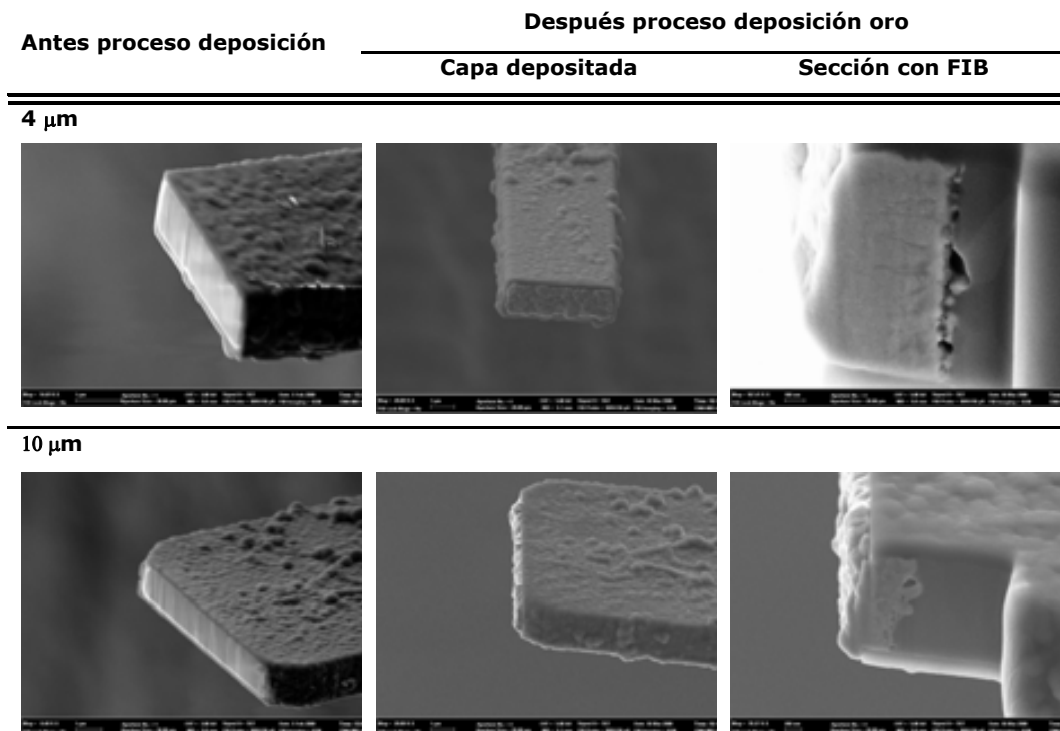


Figura 5.24: Imágenes SEM de los electrodos en voladizo con la capa formada después del doble zincado para las puntas de 4 y 10 μm . Proceso seguido: HCl + H₂O₂ + zincado 90 s + HNO₃ 30 s + zincado 45 s + H₂O 60 s

Conseguida una capa de zincado más homogénea, el siguiente paso es repetir el proceso anterior y continuar con la deposición, sumergiendo el chip durante 1 min en el baño de Ni. El aspecto que ofrecía la capa de Ni en un electrodo de 4 μm después de este proceso se muestra en la Figura 5.25. Antes de realizar el corte ya se observaba que el aspecto de la capa no era homogéneo. Al realizar el corte se comprobó que la capa de Ni no contactaba con el aluminio. El doble zincado eliminaba suficiente espesor de aluminio como para impedir que el Ni contactará con él.

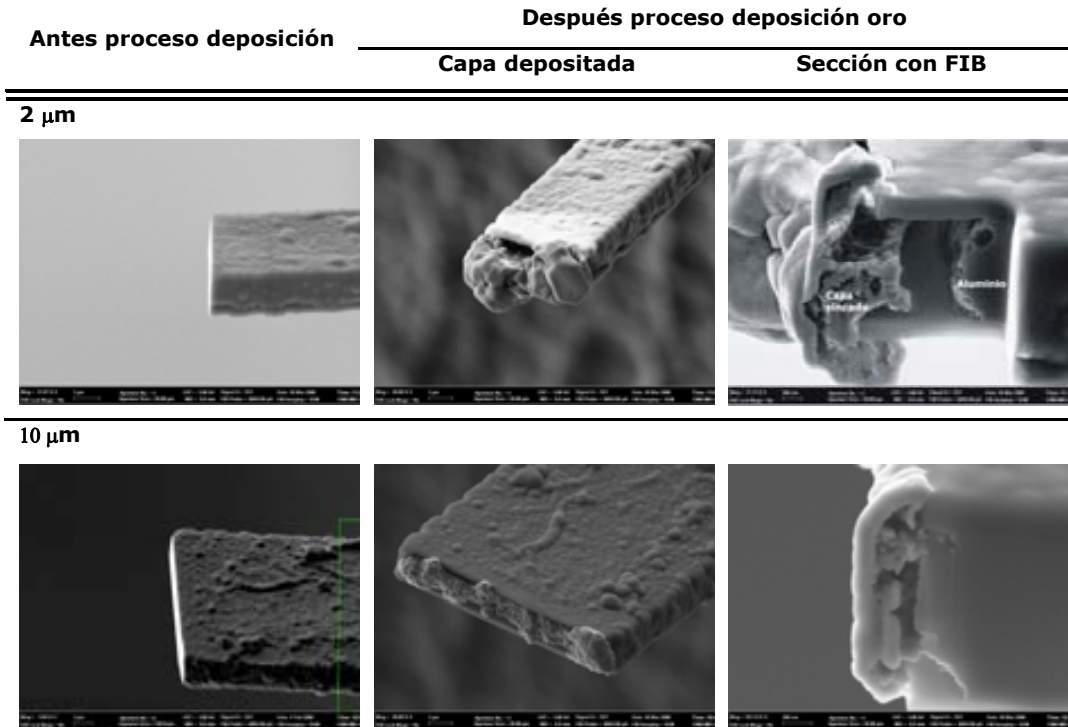


Figura 5.25: Imágenes SEM de los electrodos en voladizo con la capa formada después del doble zincado para las puntas de 2 y 10 μm . Proceso seguido: HCl + H₂O₂ + zincado 90 s + HNO₃ 30 s + zincado 45 s + H₂O 60 s + Ni 1 min + H₂O

Intentando disminuir el grosor de la capa de aluminio grabada por la solución de Zincado, se redujeron los tiempos en los que el chip permanecía sumergido en dicha solución. De este modo, después de realizar la limpieza en HCl y agua, se sumergía el chip durante 45 s en la solución de zincado. Pasado este tiempo se eliminaba la capa formada sumergiendo el chip durante 30 s en HNO₃ y se realizaba el segundo zincado sumergiendo el chip durante 22 s en la solución. Las imágenes SEM de la Figura 5.26 muestran como se consiguió disminuir el grosor de aluminio grabado por la solución de zincado.

5. Dispositivos adicionales

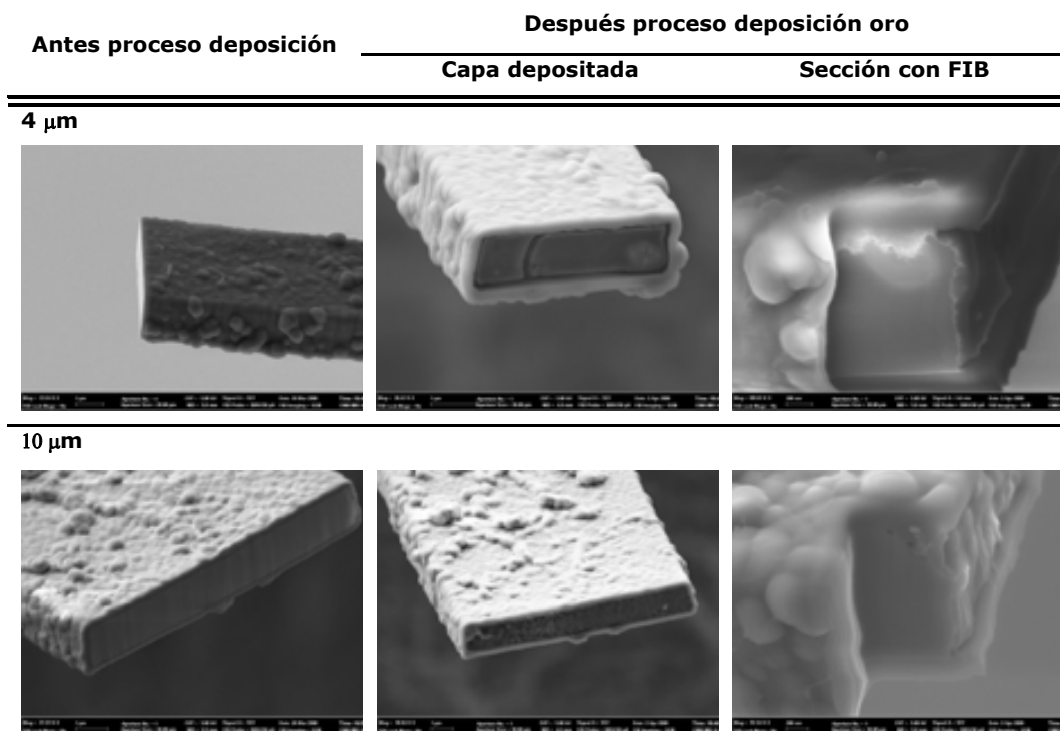


Figura 5.26: Imágenes SEM de los electrodos en voladizo con la capa formada después del doble zincado reduciendo el tiempo para las puntas de 4 y 10 μm . Proceso seguido: HCl + H₂O₂ + zincado 45 s + HNO₃ 30 s + zincado 22 s + H₂O 60 s + Ni 1 min + H₂O

Para depositar el oro se decidió disminuir el tiempo que el chip estaba sumergido en la solución de zincado. Se realizó una prueba donde se limpió un chip sumergiéndolo en HCl antes de su inmersión en la solución de Zincado durante 45 s. A continuación se sumergió en HNO₃ para eliminar la capa formada y después en el baño de Au durante 90 s. En este tiempo, el grosor de la capa depositada debería de ser de 12.5 nm. Las imágenes SEM de la Figura 5.27 muestran que se ha depositado una capa con un grosor de 27 nm para la punta de 2 μm , 21 nm para la punta de 4 μm y 29 nm para la de 10 μm . La capa depositada parece homogénea, pero no queda al mismo nivel que el final de las paredes de óxido de silicio debido al proceso de zincado.

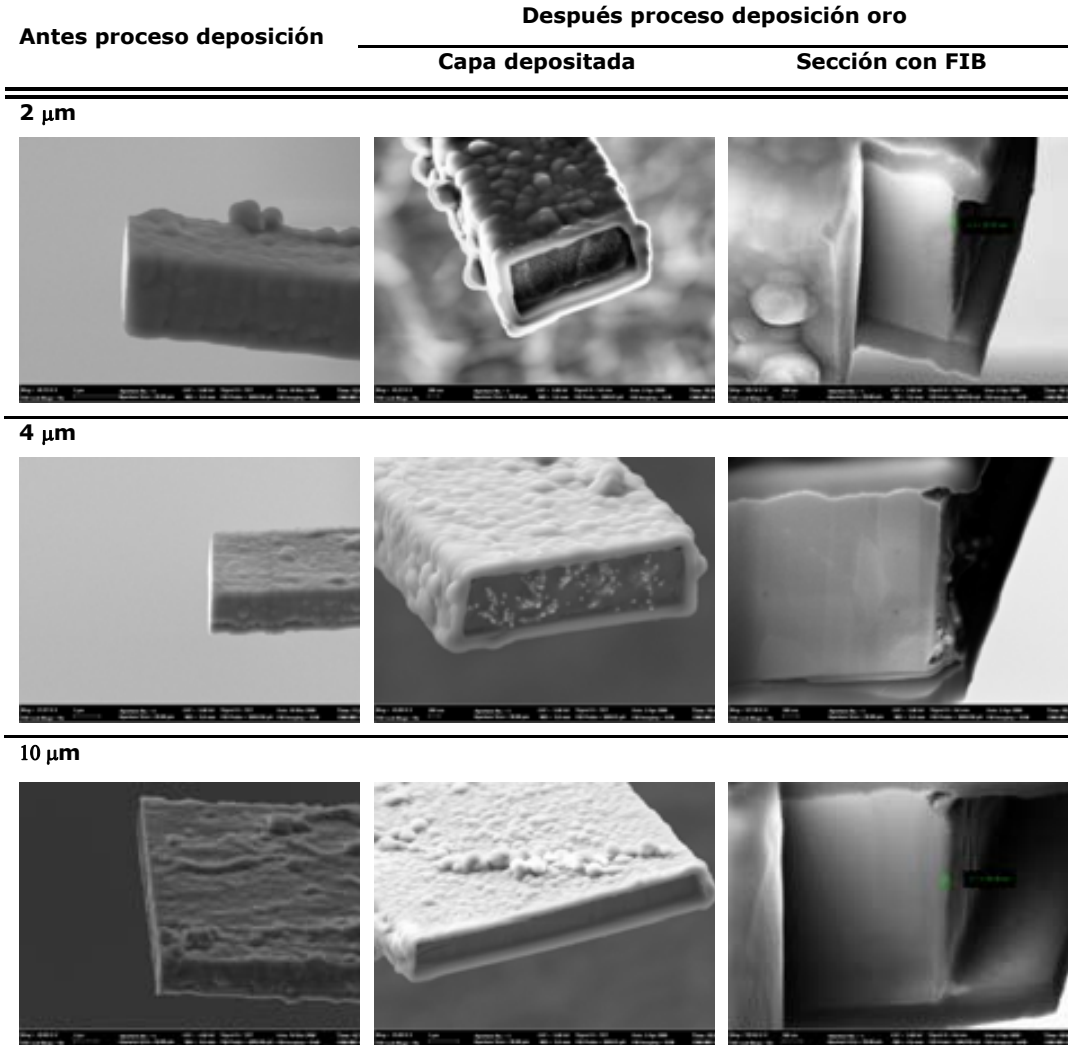


Figura 5.27: Imágenes SEM de los electrodos en voladizo con la capa de Au depositada para la punta de 2, 4 y 10 μm . Proceso seguido: HCl 60 s + Zincado 45 s + HNO₃ 30 s + H₂O 60 s + H₂O + Au 90 s

Actualmente se ha encapsulado el chip que contiene los tres microelectrodos en una tira de PCB donde se han realizado las conexiones eléctricas para poder realizar las primeras medidas eléctricas del interior de una célula y obtener información de las propiedades eléctricas de una única célula [16]. La imagen de dos chips encapsulados así como el detalle de uno de ellos es mostrado en la Figura 5.28.

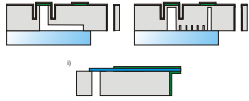
5. Dispositivos adicionales



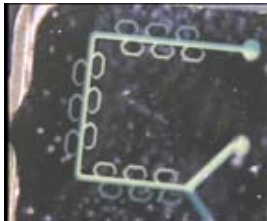
Figura 5.28: (a) Imagen de dos chips con microelectrodos encapsulados a dos tiras de PCB y (b) imagen óptica obtenida con una lupa del detalle de uno de los chips encapsulados.

5.4 Conclusiones

Las conclusiones que se pueden extraer de los resultados obtenidos y discutidos en este capítulo son las siguientes:



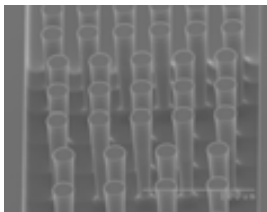
✓ Se ha desarrollado una tecnología versátil que ha permitido la fabricación simultáneamente al proceso de fabricación de la micro/nanopipetas segunda generación, micromezcladores, microfiltros y microelectrodos. Además ofrece la posibilidad de integración monolítica o híbrida de los dispositivos fabricados.



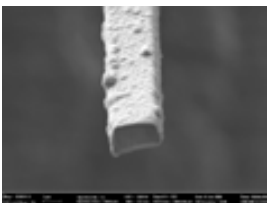
✓ Se ha fabricado un micromezclador, utilizando la misma tecnología de fabricación que las micro/nanopipetas de la segunda generación, con el que se ha mezclado dos tintas de diferente color



✓ Se ha fabricado un microfiltro, utilizando la misma tecnología de fabricación que las micro/nanopipetas de la segunda generación, con que se han separado partículas de diferente diámetro.



✓ Se ha comprobado que el grabado profundo seco DRIE permite obtener diferentes formas así como alturas de columna en los microfiltros, ofreciendo la posibilidad de fabricar una amplia variedad de ellos, ofreciendo la opción de fabricar nanofiltros.

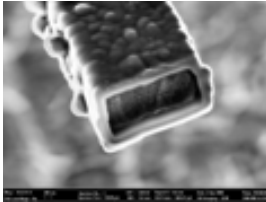


✓ Se han fabricado electrodos con punta micrométrica en cantilever.

5. Dispositivos adicionales



- ✓ Se ha conseguido acceso a las pistas de metal para realizar las conexiones



- ✓ Se ha trabajado en la deposición de una capa de oro sobre el aluminio para aplicaciones biológicas.



- ✓ Se han encapsulado chips con microelectrodos sobre tiras de PCB y se han realizado las conexiones para realizar las primeras medidas eléctricas.

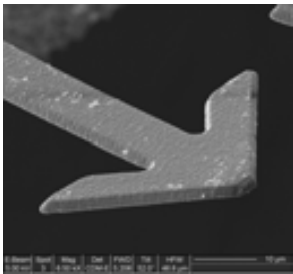
5.5 Referencias

- [1] Nguyen N and Wu Z, *Micromixers - a Review, Journal of Micromechanics and microengineering*, 15, 2005, R1-R16.
- [2] Campbell CJ and Grzybowski BA, *Microfluidic Mixers: From Microfabricated to Self-Assembling Devices*, Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 362, 2004, 1069-1086.
- [3] José Sotero Fr, Santiago-Avilés, JJ, *On the Relation between Geometric and Flow Properties of a Miniaturized Fluid Oscillator*, in Computational Methods and Experimental Measurements XIII. 2007, Eds. WIT Press,: Southampton, UK. p. 297-317.
- [4] Nguyen N T W, *Fundamentals and Applications of Microfluidics* 2002, Norwood, MA: Artech house, Inc.
- [5] Ji H, Samper V, Chen Y, Heng C, Lim T, and Yobas L, *Silicon-Based Microfilters for Whole Blood Cell Separation*, Biomedical Microdevices, 10, 2008, 251-257.
- [6] Chou CF, Bakajin O, Turner SWP, Duke TAJ, Chan SS, Cox EC, Craighead HG, and Austin RH, *Sorting by Diffusion: An Asymmetric Obstacle Course for Continuous Molecular Separation*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96, 1999, 13762-13765.
- [7] Cabodi M, Chen YF, Turner SWP, Craighead HG, and Austin RH, *Continuous Separation of Biomolecules by the Laterally Asymmetric Diffusion Array with out-of-Plane Sample Injection*, Electrophoresis, 23, 2002, 3496-3503.
- [8] G. Villanueva, Plaza JA, Gonzalez E and Bausells J, *Small Structures Transfer by Bonding, Journal Microsystem Technologies - Special Issue on Waferbonding for MEMS technologies*, Materials Science and Engineering C, 26, 2006, 2-3.
- [9] Muthuswamy J, Muthuswamy J, Okandan M, Gilletti A, Baker MS, and Jain TA, *An Array of Microactuated Microelectrodes for Monitoring Single-Neuronal Activity in Rodents*, Biomedical Engineering, IEEE Transactions on, 52, 2005, 1470-1477.
- [10] Park IY, Li ZY, Li XM, Pisano AP, and Williams RS, *Towards the Silicon Nanowire-Based Sensor for Intracellular Biochemical Detection*, Biosensors & Bioelectronics, 22, 2007, 2065-2070.
- [11] Lehnert T, Gijs M, Netzer R, and Bischoff U, *Realization of Hollow SiO₂ Micronozzles for Electrical Measurements on Living Cells*, Applied Physics Letters, 81, 2002, 5063-5065.
- [12] Guenat OT, Xiao Jie W, Dufour JF, Van Der Wal P, Morf W, De Rooij N, and Koudelka-Hep Mak-HM, *Ion-Selective Microelectrode Array for Intracellular Detection on Chip*, in TRANSDUCERS, Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems, 12th International Conference on, 2003. 2003.
- [13] Chai K, Hammond PA, and Cumming DRS, *Modification of a CMOS Microelectrode Array for a Bioimpedance Imaging System*, Sensors and Actuators B-Chemical, 111, 2005, 305-309.

5. Dispositivos adicionales

- [14] Berdondini L, Van Der Wal Pd, De Rooij Nf, and Koudelka-Hep A, *Development of an Electroless Post-Processing Technique for Depositing Gold as Electrode Material on CMOS Devices, Sensors and Actuators B-Chemical*, 99, 2004, 505-510.
- [15] Hutt DA, Liu CQ, Conway P, Whalley DC, and Mannan SH, *Electroless Nickel Bumping of Aluminum Bondpads - Part II: Electroless Nickel Plating*, IEEE Transactions on Components and Packaging Technologies, 25, 2002, 98-105.
- [16] Hanein Y, Schabmueller C, Holman G, Lucke P, Denton D, and Bohringer KF, *High-Aspect Ratio Submicrometer Needles for Intracellular Applications*, Journal of Micromechanics and Microengineering, 13, 2003, S91-S95.

6.



Conclusión final y Líneas de trabajo futuro

Las conclusiones relativas a cada uno de los dispositivos diseñados y fabricados presentados en esta memoria se han ido presentando al final del capítulo correspondiente. En ellos se han detallado los problemas encontrados durante el desarrollo de la primera tecnología y como estos fueron resueltos en el diseño de la segunda. Por este motivo, en este capítulo se presenta la conclusión final, así como las líneas de trabajo futuro.

Las tecnologías presentadas ofrecen la posibilidad de integración híbrida o monolítica. También han demostrado la efectividad de la combinación de la tecnología de microsistemas con la nanomecanización en FIB para obtener partes funcionales del orden de los nanómetros para aplicaciones biológicas. Las ventajas de los dispositivos propuestos se encuentran en la tecnología MEMS utilizada para su fabricación. Esta tecnología facilita la definición con una gran precisión de diferentes diseños y dimensiones de la punta de la micro/nanopipeta y ofrece la posibilidad futura de integrar sensores y/o circuitería en el diseño del dispositivo.

Los dispositivos fabricados con la primera tecnología han sido utilizados para formar monocapas de oro sobre superficies de oro de manera controlada y localizada. Este es un primer paso que conducirá en un futuro a la biofuncionalización con componentes biológicos (DNA entre otros) de una superficie. Además las micro/nanopipetas fabricadas tiene el canal cubierto y esto evita la evaporación en su interior de la solución utilizada para la funcionalización. La posibilidad de fabricar una micro/nanopipeta con más de una punta y/o microcanal abre la puerta a la creación de *microarrays*, idénticos, si se utiliza un microcanal con varias puntas, o diferentes, si se utilizan varios microcanales.

Los dispositivos fabricados con la segunda tecnología han sido utilizados para test de inserción en células. Asimismo, resulta de gran interés la posibilidad de combinar la pipeta para sujetar la célula con la de inyección. Este diseño evitaría la dificultad de los equipos comerciales que requieren dos manipuladores y tener que cazar la célula dos veces. Además, mediante tecnología similar, se podrían diseñar en un futuro micro/nanopipetas para dosificar partículas y/o líquidos dentro de las células mediante microinyección, otra técnica común en biología. Por otro lado, se pueden fabricar geometrías que faciliten el control de la distancia de penetración del dosificador en el interior de la célula.

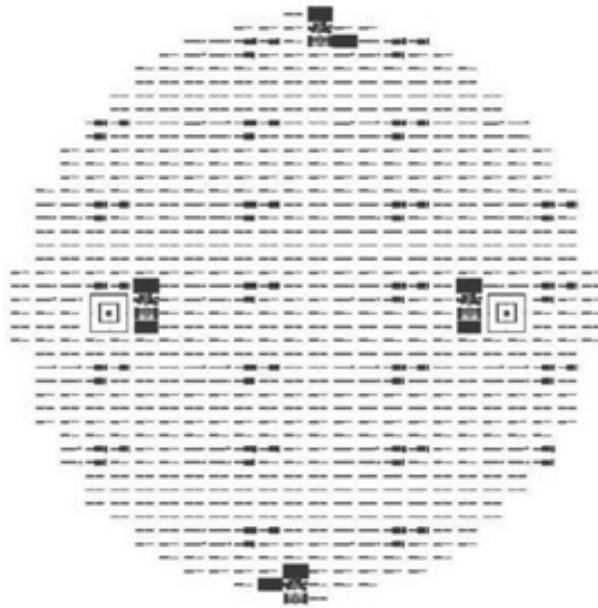
Los microelectrodos obtenidos en el mismo proceso de fabricación de las micro/nanopipetas de la segunda generación ofrecen la posibilidad de realizar medidas eléctricas en el interior de una célula viva. Esta línea se encuentra actualmente en desarrollo.

Como conclusión general habría que comentar que se ha demostrado la versatilidad de la tecnología desarrollada para aplicaciones en el campo de las Ciencias de la Vida donde, además de fabricar micro/nanopipetas, se han conseguido microelectrodos, microfiltros y micromezcladores.

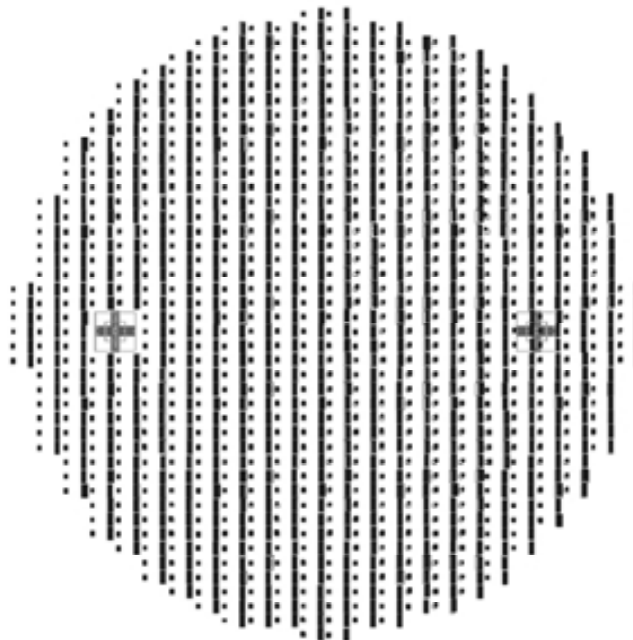
ANEXO A

Juego de máscaras CNM178

CNM178 - OXIDE



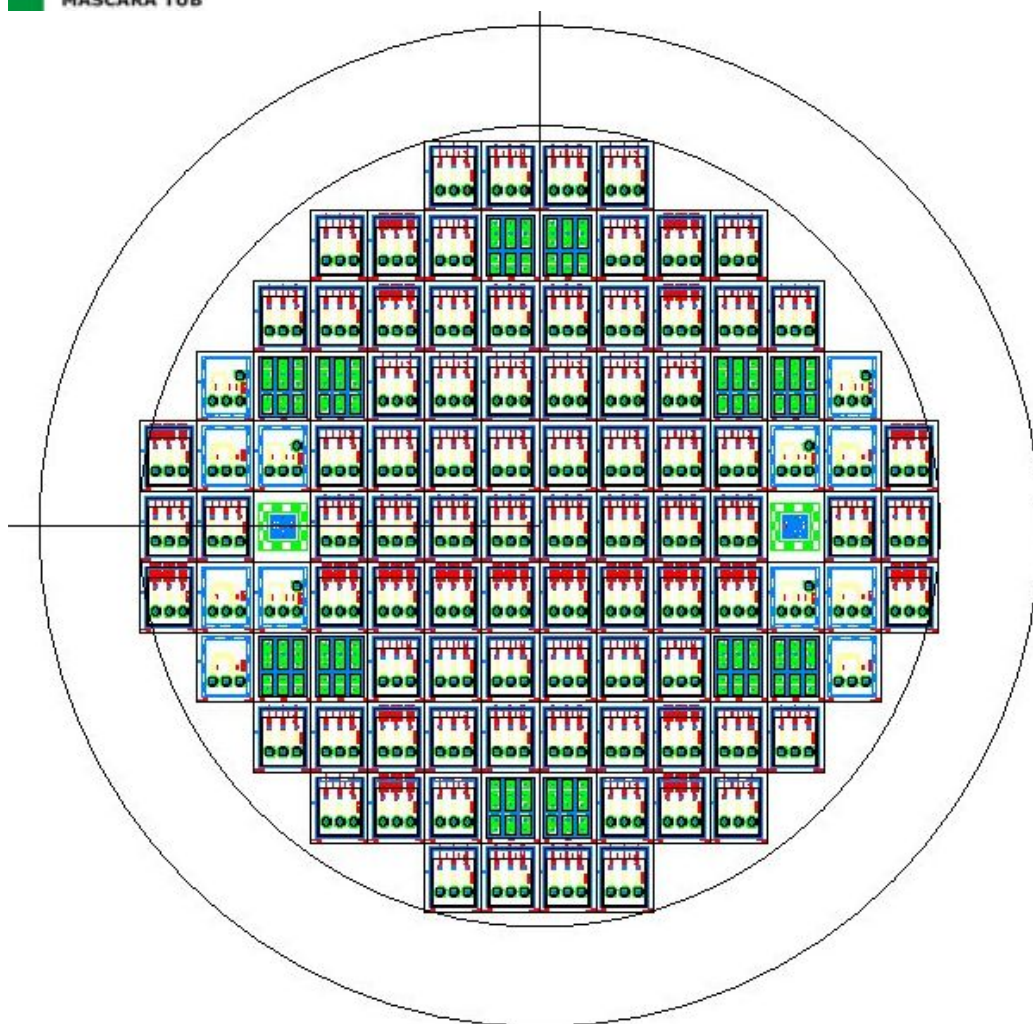
CNM178 - MEMBS



ANEXO B

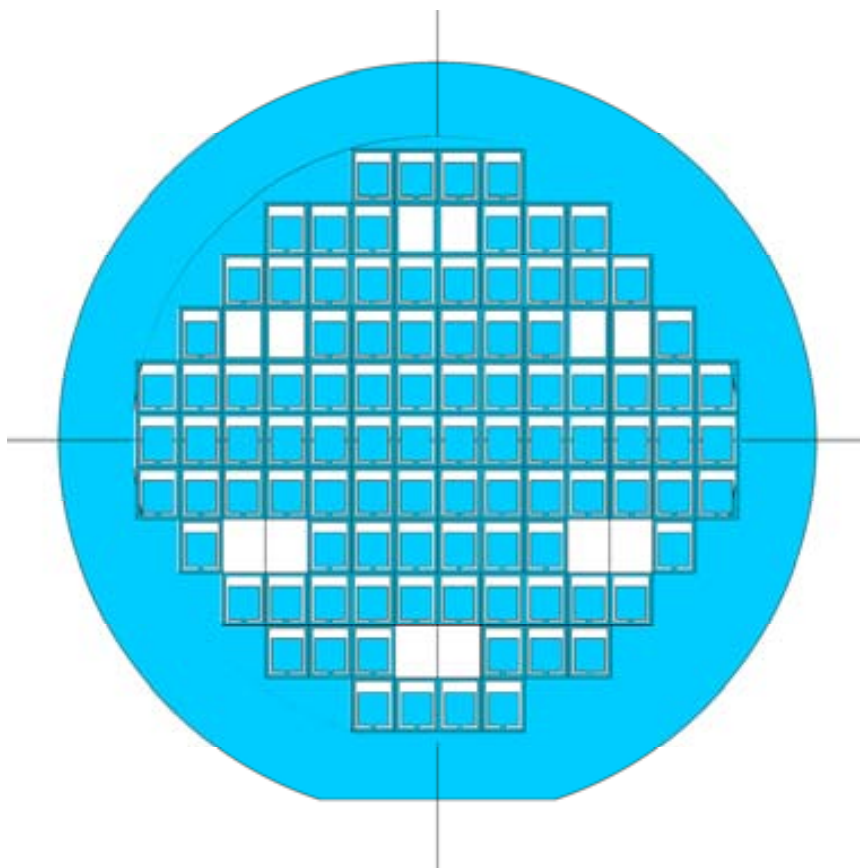
Juego de máscaras CNM-231

- MÁSCARA PIPETA
- MÁSCARA REBAJE
- MÁSCARA CORTE
- MÁSCARA TUB



ANEXO C

Disposición chips vidrio en oblea



ANEXO D

Micro/nanopipetas de óxido y Co/Ni para posibles aplicaciones magnéticas

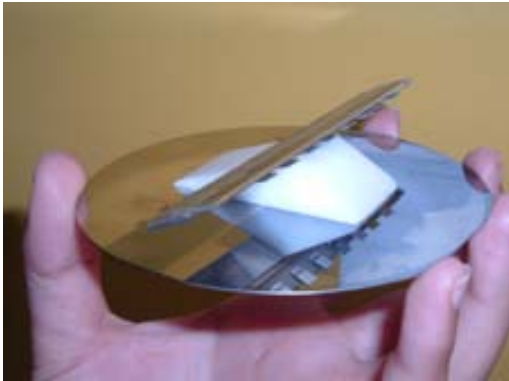
Pensando en posibles aplicaciones magnéticas de las micro/nanopipetas, se buscó un material que actuase como capa estructural y definieran las paredes del canal una vez grabada la capa sacrificial de óxido y tuviera propiedades magnéticas. Se seleccionó el Co/Ni para que actuase como capa estructural. La deposición de Co/Ni en MEMS había sido estudiada previamente en el grupo [1]. Además, gracias a estudios previos realizados en el laboratorio de microsistemas, se había comprobado que este material resistía un ataque de HF 49% [2] necesario para el grabado de la capa sacrificial de óxido de silicio.

El primer paso era depositar la capa semilla de Titanio y Niquel. Esta etapa fue realizada por el Dr. Francesc Pi en el *Laboratori de Capes Primes* del Departamento de Óptica de la Universitat Autònoma de Barcelona. Se realizó una deposición física en fase vapor (PVD) utilizando un *sputter* (Leybold, modelo UNIVEX 450) con un cañón de electrones y un sistema de vacío con una bomba turbomolecular.

Para evitar que las partículas depositadas entraran en la cavidad y de este modo evitar luego la electrodeposición de Co/Ni en esa zona, se preparó el montaje que se muestra en la Figura D.1. Este montaje evitaría que la capa semilla se depositara en la cavidad de entrada. Se distribuyeron 8 chips de una oblea a la que no se le había depositado polisilicio sobre una tira de vidrio. Los chips se pusieron con la cara dorso en contacto con el vidrio. De esta manera las cavidades de entrada al microcanal quedaban protegidas por el vidrio. Esta tira se depositó sobre una pieza de teflón. Esta pieza se utilizó para dar la inclinación necesaria a los chips para depositar capa semilla en el punto de unión de la punta con la base del chip.

La pieza se colocó sobre una oblea de silicio (Figura D.1a) que se adaptaría al equipo de deposición. El montaje final puede observarse en la Figura D.1b.

(a)



(b)



Figura D.1: Imágenes del montaje utilizado para la deposición de la capa semilla, (a) distribución de los chips en la oblea sobre el soporte para evitar que entre la capa semilla en la cavidad de entrada y (b) posición final en el equipo de deposición perteneciente al *Laboratori de Capes Primes* del Departamento de Óptica de la UAB

Se depositó una capa de Titanio de 1000 \AA y una de Niquel de 500 \AA . Este proceso se realizó por la cara dorso y por la cara componentes. Una vez depositada la capa semilla, se procedió a la electrodeposición del Co/Ni en el departamento de Química-Física de la UB. Las condiciones del baño empleadas para la electrodeposición se muestran en la Tabla D.I. La electrodeposición se realizó mediante método potencioestático con un potencial de $V = -800 \text{ mV}$ y con agitación magnética. El proceso de deposición está optimizado para obtener una capa homogénea, compacta de grano fino y con una composición de 60% Co y 40% Ni [1].

Tabla D.I: Condiciones baño para la electrodeposición de la capa semilla de 60% Co y 40% Ni.

Co (II)	$0.2-0.3 \text{ mol dm}^{-3}$
Ni (II)	$0.7-0.9 \text{ mol dm}^{-3}$
Sacarina	$0.5-1.2 \text{ g dm}^{-3}$
Ácido bórico	$20-40 \text{ g dm}^{-3}$
Electrodo Referencia	Ag/ AgCl Pt
Contraelectrodo	
pH	3-3.5
Temperatura	$50-60^{\circ}\text{C}$
Tiempo	50-100 s

D.2

Las imágenes SEM de la Figura D.2 muestran el extremo final de unas puntas y el punto de unión de estas mismas puntas a la base del chip después del proceso de electrodeposición. La Figura D.2a muestra como el Co/Ni había recubierto totalmente la capa de óxido de la punta. El Co/Ni también había recubierto el punto de unión de la punta a la base del chip como muestra el detalle de la Figura D.2b.

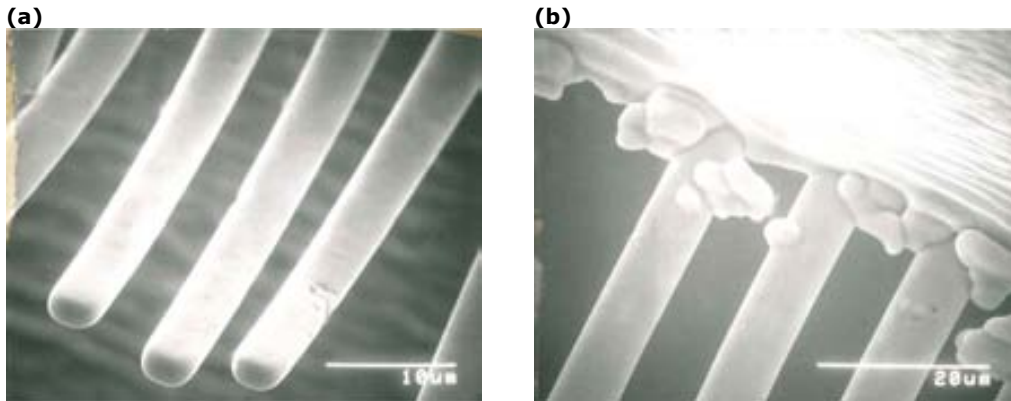


Figura D.2: Imágenes SEM del detalle (a) del extremo final de unas puntas y (b) del punto de unión de las puntas con la base del chip después del proceso de electrodeposición del Co/Ni.

A pesar de los buenos resultados obtenidos con la electrodeposición de la capa de Co/Ni recubriendo toda la punta definida por la capa de óxido, se observaron la aparición de estreses que producían el doblamiento de las puntas, como puede observarse en la Figura D.2a.

Referencias

- [1] Duch M, Esteve J, Gomez E, Perez-Castillejos R, and Valles E, *Electrodeposited Co-Ni Alloys for MEMS*, Journal of Micromechanics and Microengineering, 12, 2002, 400-405.
- [2] Duch M, Pruebas Resistencia Co-Ni En HF, Documento interno.

El trabajo presentado en esta memoria ha dado lugar a las siguientes publicaciones

- M.J. Lopez, D. Caballero, E. M. Campo, R. Perez-Castillejos, A. Errachid, J. Esteve, J. A. Plaza, ***FIB assisted technology in sub-picolitre micro-dispenser fabrication*** *Journal of Micromechanics and Microengineering* 18 (2008) 075021
- M.J. Lopez, E. Fernández, E. M. Campo, E. Ibáñez, C. Nogués, J. Esteve, J.A. Plaza, ***Versatile micropipette technology based on Deep Reactive ion Etching and anodic bonding for biological applications***, *under preparation*
- M.J. Lopez, E. Fernández, E. M. Campo, E. Ibáñez, C. Nogués, J. Esteve, J.A. Plaza, ***Sharpened transparent micropipettes fabrication for cell membrane piercing***, *under preparation*
- E. M. Campo, M.J. Lopez, J. Esteve, J.A. Plaza, ***FIB reshaped capillary glass for ICSI application***, *under preparation*