



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE FÍSICA

DIFUSIÓN EN UNA RED ALEATORIA DE CANALES

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS, MENCIÓN FÍSICA

WASHINGTON LENIN PONCE TUSA

PROFESORA GUÍA:  
MARÍA LUISA CORDERO GARAYAR

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:  
RODRIGO SOTO BERTRAN  
CLAUDIO FALCÓN BEAS  
STEFFEN HÄRTEL GRUNDLER

SANTIAGO DE CHILE

2014

# Resumen

En esta tesis se diseñó e implementó una metodología experimental a escala microfluídica, enfocada al estudio de la difusión en redes cuasi-bidimensionales aleatorias de microcanales. Para ello, se adaptó la técnica de la recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo (FRAP) con el objetivo de determinar el coeficiente de difusión efectivo adimensional  $D/D_0$  de la fluoresceína en una solución acuosa dentro de estas redes; donde  $D_0$  es el coeficiente de difusión molecular de esta especie. Se estudió el comportamiento de  $D/D_0$  en función de dos parámetros adimensionales que describen las cualidades geométricas de estas redes: la homogeneidad  $\gamma = R/\langle L \rangle$  y el aspecto reticular  $\eta = \langle L \rangle/w$ , donde  $\langle L \rangle$  y  $w$  son la longitud media y el ancho de los canales, y  $R$  es el radio de la zona en que la difusión es medida. El parámetro  $\gamma$  describe los efectos de los detalles geométricos sobre la difusión y  $\eta$  cuantifica el volumen accesible al fluido. Adicionalmente, en estas geometrías estudiamos la respuesta de  $D/D_0$  frente la acción de un flujo periódico de amplitud  $x$  y promedio nulo.

Determinamos un parámetro crítico  $\gamma_c \sim 2.7$  a partir del cual la red puede ser descrita como un medio efectivo. En esta escala, encontramos que  $D/D_0 \sim 0.7$  para un valor fijo de  $\eta = 3.64$ . Además, medimos el efecto del aspecto reticular  $\eta$  sobre la difusión; en este caso  $D/D_0$  disminuye cuando  $\eta$  aumenta, llegando rápidamente a un nivel de saturación  $D/D_0 \sim 0.4 - 0.5$  para  $\eta > 2.5$ . Por otro lado, para  $\gamma = 0.6$ , lo que llamamos la micro-escala, se encontró que existe una dependencia del número de conexiones existentes en un nodo de la red sobre  $D/D_0$ . En el caso de la acción del flujo externo, observamos un importante incremento de  $D/D^*$  en términos de la amplitud adimensional de oscilación de este flujo  $x/\langle L \rangle$ , siendo  $D^*$  el coeficiente efectivo de difusión en ausencia de flujo.

En la primera parte de esta tesis establecemos la base teórica correspondiente del proceso de difusión, incluyendo una descripción para medios no homogéneos. También discutimos los aspectos relevantes del FRAP, que es la metodología experimental que usamos en este trabajo. Más adelante, describimos los métodos experimentales desarrollados, donde reseñamos, entre otros detalles, la forma de obtener geometrías reticulares desordenadas mediante los mosaicos de Voronoi y el procedimiento de construcción de los microcanales que reproducen estas geometrías. Luego, mostramos en detalle los resultados experimentales, entre ellos, los ya mencionados. Finalmente incluimos las conclusiones del presente trabajo, presentando además las sugerencias para futuras investigaciones en este tema.

# Abstract

In this research, an experimental methodology at microfluidic scale was designed and implemented, focused on the study of diffusion in quasi-two-dimensional randomly distributed networks of microchannels. The technique of fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) was adapted to measure the dimensionless effective diffusion coefficient  $D/D_0$  of fluorescein in aqueous solution within these networks; where  $D_0$  is the molecular diffusion coefficient of this specie. The behavior of  $D/D_0$  was studied as a function of two dimensionless parameters describing the geometrical attributes of the networks: The homogeneity  $\gamma = R/\langle L \rangle$  and the reticular aspect  $\eta = \langle L \rangle/w$ , where  $\langle L \rangle$  and  $w$  are the mean length and the width of the channels respectively, and  $R$  is the radius of the zone onto the diffusion is measured. The parameter  $\gamma$  describes the effects of geometrical details on the diffusion, and  $\eta$  quantifies the volume accessible to the fluid. Additionally, within these geometries, the response of  $D/D_0$  was studied under the action of a periodic flow with amplitude  $x$  and zero net flux.

A critical parameter  $\gamma_c = 2.7$  was obtained to describe the scale in which the network can be described as an effective medium. On this scale, it was found that  $D/D_0 = 0.7$  at a fixed value of  $\eta = 3.64$ . Additionally, we measured the effect of the reticular aspect  $\eta$  on the diffusion. In this case  $D/D_0$  decreases when  $\eta$  increases, reaching rapidly a saturation level  $D/D_0 = 0.4 - 0.5$  for  $\eta > 2.5$ . On the other hand, for  $\gamma = 0.6$ , what is called the micro-scale, the value of  $D/D_0$  was found to depend on the number of connections converging on a node of the network. Furthermore, in the case of the action of the external flow, a significant increase of  $D/D^*$  was observed in terms of the dimensionless amplitude of oscillation of the flow  $x/\langle L \rangle$ , where  $D^*$  is the effective diffusion coefficient in the absence of flow.

In the first part of this research, the theoretical basis of the diffusion process is established, including a description for heterogeneous media. Relevant aspects of FRAP are also discussed, which are part of the experimental methodology used in this work. Then, the experimental methods developed in this thesis are described, including the approach to design disordered lattice geometries through Voronoi tessellations. The method for building the microchannels with these geometries is explained also. Later, the experimental results are presented in detail, including the ones already mentioned. Finally the conclusions of this study are summarized, as well as some suggestions for future research in this topic.

*¡Sirena, cómo turba tu voz engañadora  
¡cómo haces dulce el lloro y agradable el tormento!  
fontana cristalina del parque de la aurora,  
que nunca has de apagar la viva sed que siento.*

*Atalanta, que alegras con tus labios risueños  
mis neuróticas noches de muchacho enfermizo;  
Esfinge, que te yergues frente a mis locos sueños;  
Arcángel, que me niegas la entrada al Paraíso...*

*Por la Nada huye el Tiempo en su carro triunfante  
—¿quién podrá detener el curso de lo Eterno?—  
¡Abre, divina dueña, la puerta de diamante:  
no importa que tu alcázar llame cielo al infierno!*

*Medardo Ángel Silva*

# Agradecimientos

En primer lugar, a la compañera de mi vida, Maricela, quien siempre estuvo, aunque a la distancia, con su sonrisa, buen humor y sus palabras alegres. Pero también en los minutos duros, cuando más era necesario. A ella, a quien Victoria tuvo a su lado, gracias por su amor, apoyo y comprensión para poder lograr de este objetivo personal.

También a mis padres; a Miguel y Patricia; a Saed, Clara y Hugo. A todos ellos, gracias por las atenciones para con mi familia incluyendo a Marcelo. A David, por su ayuda y tiempo invertido en mis largos y tediosos trámites.

A la Prof. María Luisa Cordero, por su valiosa guía, consejos, paciencia y tiempo dedicado al desarrollo de este trabajo. Gracias por sus conocimientos y experiencias compartidas. Por haber contribuido al desarrollo de mis destrezas científicas y experimentales.

A los miembros de la Comisión Evaluadora, por las sugerencias, opiniones e ideas orientadas a la mejora de este trabajo.

Al Departamento de Física, por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de seguir creciendo. Agradezco la apertura que siempre tuve en esta Universidad y la inmensa hospitalidad que este país, Chile, me brindó.

A la Secretaria Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación del Ecuador, por el total auspicio financiero a mi formación, sin el cual, esta meta no hubiera sido posible.

A mis compañeros de laboratorio y aula, de quienes también aprendí y por el tiempo de esparcimiento compartido.

A Félix Romero, por haberme hecho sentir un miembro más de su entorno familiar. También gracias por su incalculable ayuda en Chile. Espero la visita.

Y a La Legión Púrpura, porque deseamos el conocimiento y ansiamos el poder!

# Tabla de contenido

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Motivaciones del presente trabajo . . . . .	1
1.2. Recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo (FRAP) . . . . .	5
1.2.1. Fluorescencia y fotoblanqueo . . . . .	5
1.3. Movimiento browniano . . . . .	8
1.4. La ecuación de difusión . . . . .	10
1.5. Solución de la ecuación de difusión en una dimensión . . . . .	12
1.6. Solución de la ecuación de difusión en dos dimensiones . . . . .	15
1.7. Difusión en medios no homogéneos . . . . .	16
1.8. Modelo teórico de la recuperación de la fluorescencia . . . . .	21
<b>2. Métodos Experimentales</b>	<b>28</b>
2.1. Diseño de los microcanales . . . . .	28
2.1.1. Mosaicos de Voronoi . . . . .	28
2.1.2. Generación de las redes . . . . .	31
2.2. Construcción de los microcanales . . . . .	36
2.2.1. Construcción del molde . . . . .	37
2.2.2. Construcción del canal . . . . .	39
2.3. Montaje experimental . . . . .	40
2.4. ¿Cómo realizamos los experimentos FRAP? . . . . .	42
2.5. Restricciones experimentales . . . . .	44
2.5.1. Perfil de iluminación . . . . .	45
2.5.2. El blanqueo por observación . . . . .	48
2.5.3. El tiempo de fotoblanqueo . . . . .	49
2.6. Tratamiento de datos . . . . .	50
2.7. Aproximación numérica del modelo teórico . . . . .	54

2.8. Experimentos con flujo oscilatorio . . . . .	57
<b>3. Resultados</b>	<b>65</b>
3.1. Determinación del coeficiente absoluto de difusión . . . . .	65
3.2. Difusión en la microgeometría de los canales . . . . .	67
3.3. Difusión en la mesoescala de los canales . . . . .	70
3.3.1. Efecto colectivo: Zonas de blanqueo y dispersión . . . . .	70
3.3.2. Efecto colectivo: Dependencia en $\gamma$ . . . . .	72
3.3.3. Método alternativo de determinar el límite entre la micro y la mesoescala	74
3.3.4. Efecto del área efectiva . . . . .	78
3.4. Difusión bajo un flujo de promedio nulo . . . . .	82
<b>4. Conclusiones y perspectivas</b>	<b>85</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>88</b>

# Índice de tablas

2.1. Valores de $\eta$ de las redes microfluídicas diseñadas. . . . .	37
2.2. Calibración de respuesta del fluido en el periodo $T$ y la amplitud $x$ de oscilación respecto al parámetro de control volumen inyectado/succionado $V$ . . . . .	59
3.1. Coeficiente de difusión $D_0$ ( $\times 10^{-10}$ m <sup>2</sup> /s) de la fluoresceína para dos radios de blanqueo y dos intensidades de observación. . . . .	66
3.2. Coeficiente efectivo de difusión normalizado $D/D_0$ y su desviación standard porcentual $s^*$ para cuatro zonas de blanqueo en distintas redes microfluídicas caracterizadas por $\langle L \rangle$ y $w$ . . . . .	71
3.3. Coeficientes de difusión normalizados $D/D_0$ según el parámetro adimensional $\gamma$ , con $\eta = 3.64$ fijo. . . . .	73
3.4. Valor del valor crítico $\gamma_c$ en función de $\eta$ a un nivel de significación $\sigma_c = 5\%$ . . . . .	77
3.5. Coeficientes de difusión normalizados $D/D_0$ según el parámetro adimensional $\eta$ , con $\gamma = 3.99$ fijo. . . . .	79
3.6. Area $A_b$ blanqueada y la fracción accesible por el fluido $\kappa$ . . . . .	80
3.7. Coeficiente efectivo de difusión normalizado $D/D^*$ en función de la amplitud de oscilación $x$ . . . . .	83



# Índice de figuras

1.1. Retículo endoplasmático de una célula. . . . .	4
1.2. Proceso cuántico de fluorescencia . . . . .	6
1.3. Concentración normalizada $C/C_0$ vs distancia normalizada $x/a$ . . . . .	13
1.4. Concentración media normalizada $\bar{C}(t)/C_0$ vs tiempo normalizado $t/\tau_{1d}$ . . . . .	14
1.5. Concentración media normalizada $\bar{C}(t)/C_0$ vs tiempo normalizado $t/\tau_{2d}$ . . . . .	17
1.6. Estructura característica de un medio no homogéneo (poroso). . . . .	18
1.7. Curva teórica de la fluorescencia neta fraccional $f(t)$ vs el tiempo normalizado $t/\tau$ . . . . .	27
2.1. Mosaico regular de Voronoi de máximo empaquetamiento. . . . .	30
2.2. Mosaicos irregulares de Voronoi para varios $\chi$ . . . . .	32
2.3. Histograma de frecuencias del parámetro $L/\langle L \rangle$ para varios $\chi$ . . . . .	33
2.4. Longitud media $L/\langle L \rangle$ y dispersión $s/s^*$ en función de $\chi$ . . . . .	35
2.5. Diseño de una red de microcanales aleatorios usando una geometría de Voronoi, de longitud $\langle L \rangle = 297 \mu\text{m}$ y ancho de canal $w = 120 \mu\text{m}$ . . . . .	36
2.6. Esquema del grabado del diseño y molde . . . . .	38
2.7. Procedimiento para la construcción del microcanal . . . . .	40
2.8. Vistas reales de una red de microcanales. . . . .	41
2.9. Disposición experimental . . . . .	42
2.10. Óptica para la excitación y emisión de fluorescencia . . . . .	43
2.11. Diagrama de control y adquisición . . . . .	44
2.12. Perfiles de iluminación para blanqueo y observación . . . . .	48
2.13. Máscaras de blanqueo y complementarias . . . . .	51
2.14. Fluorescencia vs. tiempo . . . . .	52
2.15. Recuperación de la fluorescencia después del blanqueo . . . . .	54
2.16. Error relativo $\mathcal{E}$ vs tiempo normalizado $t/\tau$ . . . . .	57

2.17. Trazas de las partículas fluorescentes sometidas a flujo en el microcanal . . . .	59
2.18. Curva de calibración entre el volumen inyectado/succionado $V$ y la amplitud de oscilación $x$ . . . . .	60
2.19. Movimiento periódico de la zona blanqueada debido a la acción de un flujo oscilante. . . . .	62
2.20. Curva de recuperación de fluorescencia bajo la acción de un flujo oscilatorio .	63
3.1. Datos de la curva de recuperación y su ajuste. Espacio bidimensional homogé- neo. Radio circular de fotoblanqueo $R_1 = 468 \mu\text{m}$ , a intensidad de observación $/4x$ . . . . .	66
3.2. Zonas de blanqueo con varios alimentadores . . . . .	68
3.3. Efecto del número de alimentadores en la difusión . . . . .	69
3.4. Las 16 regiones analizadas. . . . .	71
3.5. Zonas fotoblanqueadas para el mismo microcanal a distintos radios de blanqueo	73
3.6. Tiempos de difusión característico y coeficientes de difusión efectivos . . . .	74
3.7. Círculos generados aleatoriamente sobre un red microfluídica . . . . .	76
3.8. Nivel de gris promedio $P$ en función de $\gamma$ . . . . .	77
3.9. Curva de $\sigma$ vs $\gamma$ . . . . .	78
3.10. Zonas fotoblanqueadas para diferentes anchos de canal $w$ . La longitud de arista $\langle L \rangle$ y el radio de blanqueo $R$ se mantienen constantes . . . . .	79
3.11. Coeficiente efectivo de difusión $D/D_0$ en función de $\eta$ . . . . .	80
3.12. Coeficiente efectivo de difusión $D/D_0$ en función de la fracción de superficie accesible $\kappa$ . . . . .	81
3.13. Coeficiente efectivo de difusión normalizado $D/D^*$ en función de varios pará- metros adimensionales. . . . .	84

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Motivaciones del presente trabajo

En la naturaleza existen diversas formas de transporte de materia, momentum y energía. Estos procesos se dan en amplios regímenes de escalas espacio-temporales lo que ha dado lugar a desarrollar descripciones muy particulares válidas dentro de cierto rango de parámetros que caracterizan el fenómeno estudiado. Desde escalas astronómicas tales como los jets de energía expulsados por pulsares, pasando por corrientes de aire de la atmósfera, o transporte de electrones en nanoestructuras nos dan la idea de la amplitud de condiciones donde los fenómenos de transporte están presentes.

Más particularmente, hablando ya de fluidos, los procesos de transporte de materia tienen gran importancia en estudios como reacciones químicas, transferencia de proteínas a nivel celular, recuperación de solutos dentro de medios porosos, movilidad de espermatozoides, por citar algunos. Todos éstos, aquí mencionados, tienen lugar en una escala tal donde los efectos viscosos y superficiales toman un papel clave en la descripción del medio y de la dinámica resultante. La microfluídica es el campo que precisamente cubre esta escala, con fluidos que transitan en canales del orden de  $100 \mu\text{m}$  y con volúmenes del orden de nanolitros, y donde los efectos inerciales son despreciables frente a los efectos viscosos. Una forma de cuantificar este régimen es mediante el número de Reynolds:

$$Re = \frac{\rho V_0 L_0}{\eta}, \quad (1.1)$$

donde  $\rho$  es la densidad del medio,  $V_0$  y  $L_0$  son las velocidades y longitudes características del proceso, respectivamente; y  $\eta$  es la viscosidad dinámica. Vemos, por lo tanto, que el número de Reynolds es una comparación entre los efectos inerciales y los viscosos. En la escala microfluídica, la longitud característica es  $L_0 \sim 1 \mu\text{m}$ , y su velocidad  $V_0 = 10 \mu\text{m/s}$ . Para el caso que el medio sea acuoso, la llamada *viscosidad cinemática*  $\eta/\rho \sim 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ , por lo que  $Re \sim 10^{-5}$ . Esto nos dice que la escala microfluídica responde a regímenes de bajo número de Reynolds ( $Re \ll 1$ ), siendo los efectos viscosos los que prevalecen.

Experimentalmente hablando, la microfluídica es un campo de reciente desarrollo, a partir de la década de 1990s (Tabeling, 2005). Esto gracias a la miniaturización de los sistemas microelectro-mecánicos (*MEMS* por sus siglas en inglés), lo cual facilitó la construcción, control y detección de sistemas microfluídicos. Entre estos instrumentos podemos mencionar microreactores químicos, microbombas, sistemas de separación de especies químicas, por mencionar algunos. Hoy en día los sistemas microfluídicos tienen una enorme aplicación en química y biología por la versatilidad que presentan al efectuar análisis y pruebas. Además, la mayoría de sistemas microfluídicos en sí (no sus instrumentos de control y sensores) pueden ser contruidos en materiales suaves, tales como polímeros, elastómeros o plásticos, lo que los hace aptos para ser combinados con varios otros elementos, lo que se conoce comúnmente como la tecnología *lab on a chip*.

Por otra parte, el advenimiento de la microfluídica, también ha motivado que diversos aspectos teóricos de la mecánica de fluidos sean enriquecidos y probados. La hidrodinámica, mezclas, flujos en gotas y chorros, fenómenos de interfases en estas escalas, procesos de difusión, son habitualmente motivo de estudios teóricos, experimentales y numéricos. También, asuntos como la cinética de reacciones químicas y transferencia de calor se han apoyado en regímenes microfluídicos para su caracterización.

Estas técnicas microfluídicas, por lo tanto, ofrecen un alto nivel de control de la geometría y condiciones en general (flujo externo, ausencia de turbulencia), lo que ha abierto la posibilidad de llevar a cabo estudios de procesos complejos que en otro escenario resulta complicado estudiar. Entre éstos podemos mencionar los fenómenos de transporte que toman lugar en estructuras vivas; en las que la naturaleza misma de ellas, impide un óptimo control de las condiciones de experimentación.

Hablando en este sentido mismo, un problema actual dentro de la biología celular es comprender los procesos de transporte de proteínas dentro de las células. Específicamente, existen

estudios que tratan de entender bajo qué tipo de transporte tiene lugar este desplazamiento de proteínas. Además, teniendo en cuenta las diferentes estructuras internas presentes en la célula (organelos), la geometría por la cual se produce el transporte es de fundamental importancia para tener una adecuada descripción (Dayel et al., 1999; Dieteren et al., 2011).

Una estructura interna presente en las células biológicas es el retículo endoplasmático (ER). En éste se observan dos regiones bien marcadas: el llamado ER rugoso que está formado por sacos o cisternas aplanadas, y el ER liso formado por una red de túbulos que recuerda a una geometría reticular bidimensional no uniforme, ver figura 1.1. El ER se extiende por el citoplasma estando conectado con la membrana nuclear externa. El espacio interior, o lumen, del ER y la membrana nuclear forma un solo compartimento.

La función del ER es variada dependiendo del tipo de célula, incluyendo la síntesis de lípidos, hormonas sexuales, proteínas por mencionar algunos. Así, el lumen del ER se encuentra poblado de estos compuestos y otros solutos en un medio acuoso. Adicionalmente a lo dicho, en el lumen del ER también se produce un transporte de estos productos, los cuales se mueven en el interior de estos túbulos a través de toda esta estructura. En tal sentido, muchos trabajos acerca del proceso de transporte en el retículo endoplasmático han sido efectuados, usando modelos de difusión en estas geometrías (Dayel et al., 1999; Sbalzarini et al., 2005; Cui-Wang et al., 2012).

Al ser el ER parte de un organismo vivo su estructura es muy dinámica, particularmente hablando del ER liso, se ha observado que su geometría reticular cambia continuamente, pudiéndose crear nuevos nodos y/o aristas, así como desaparecer. Este tipo de factores limitan la posibilidad de, al efectuar un estudio experimental, tener las mismas condiciones en cada realización; por tal razón muchas repeticiones son efectuadas con el propósito de tener una aproximación estadística válida.

No obstante que el transporte en el ER ha sido estudiado en base a modelos difusivos, otros procesos de transporte activo también han sido propuestos. La acción de motores moleculares en los filamentos, así como también las propiedades visco-elásticas de la estructura misma (ER) y medio circundante (citoplasma, citoesqueleto) pueden dar origen a un movimiento dirigido que acelera el transporte de masa (Brangwynne et al., 2009).

Motivado en lo anterior, este trabajo se enmarca en estudiar el proceso difusivo de un fluido en geometrías similares a las mostradas por el ER. Para ello, se desarrollará una meto-

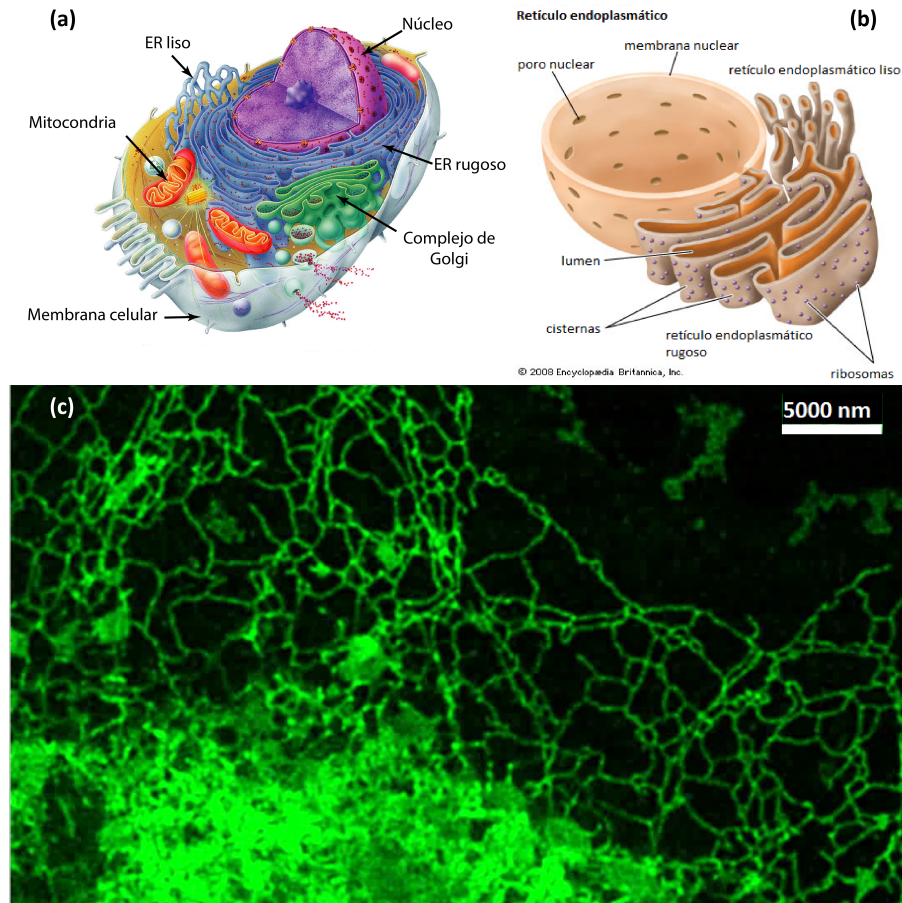


Figura 1.1: Retículo endoplasmático de una célula.

(a) Representación esquemática de una célula animal superior. Se destacan algunas estructuras internas, entre ellas el ER. (b) Esquema del ER junto al núcleo celular, observamos la geometría distintiva del ER rugoso y del ER liso. (c) Fotografía real del ER: Vemos la estructura de redes dentro de la que circulan los fluidos celulares. Se utiliza una técnica de excitación de la proteína fluorescente verde para poder observar la estructura. Imagen cortesía de Jorge Toledo. BNI/SCIAN Lab, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

dología experimental que incluye caracterizar y reproducir estas estructuras reticulares, pero ahora estáticas, usando técnicas microfluídicas de fabricación, para posteriormente utilizarlas con el fin de observar el desarrollo del proceso difusivo en estas redes, bajo distintas condiciones experimentales y además, haciendo uso de procesos de fluorescencia para cuantificar la difusión.

## 1.2. Recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo (FRAP)

Una técnica experimental para estudiar la difusión es la llamada recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo (FRAP por sus siglas en inglés). Ésta fue desarrollada a mediados de los 70s para medir propiedades en los procesos de transporte en sistemas pequeños tales como el movimiento de moléculas en células vivas (Jacobson et al., 1976). La técnica FRAP consiste en marcar a las moléculas cuya difusión se desea estudiar con un fluoróforo, una molécula fluorescente que puede emitir luz visible al ser excitada con la apropiada longitud de onda de la radiación incidente. Esta molécula fluorescente debe ser lo suficientemente pequeña para no afectar las propiedades difusivas de la molécula bajo estudio. O simplemente podemos estudiar las propiedades de la difusión de las moléculas fluorescentes mismas, las cuales pueden ser de tamaño comparable con otras moléculas disueltas en la solución o el medio celular. Estudios recientes se basan en el uso de la proteína fluorescente verde como fluoróforo para el estudio de la movilidad en el interior de estructuras celulares (Dayel et al., 1999; Dieteren et al., 2011).

El principio del FRAP se basa en destruir la fluorescencia localmente mediante la irradiación de un láser o una fuente de luz intensa adecuada sobre una zona fluorescente. Producto de esta exposición, la fluorescencia desaparece irreversiblemente quedando oscurecida la región expuesta, esto es conocido como el *fotoblanqueo*. Luego, esta región empieza a recuperar progresivamente su fluorescencia debido a la difusión de las moléculas no blanqueadas circundantes hacia la región fotoblanqueada. Así, el flujo difusivo de las moléculas causa que la concentración de moléculas fluorescentes crezca en tiempo en la zona fotoblanqueada, lo que se relaciona directamente con el nivel de fluorescencia observado y las propiedades difusivas de la especie.

### 1.2.1. Fluorescencia y fotoblanqueo

Por lo que hemos visto, los procesos de fluorescencia y fotoblanqueo son importantes para realizar experimentos usando FRAP, por lo que en este apartado nos centraremos a describir los procesos físicos que producen estos fenómenos.

La fluorescencia es el resultado de un proceso cuántico que se produce en algunas moléculas

llamadas fluoróforos. Este proceso se da en varias etapas. Primero, al incidir un láser o una luz adecuada sobre las moléculas, los fotones de energía  $h\nu_x$  excitan a éstas pasando desde el estado base  $S_0\{0\}$  (nivel 0, subestado vibracional 0) a un estado singlete  $S_1\{n\}$  de mayor energía, donde  $n$  es el  $n$ -ésimo subestado vibracional del estado  $S_1$  (figura 1.2). Esta excitación se produce en  $\sim 10^{-15}$  s, tiempo suficientemente corto para que otros procesos no ocurran en ese lapso de tiempo. Así, para el proceso de excitación tenemos:

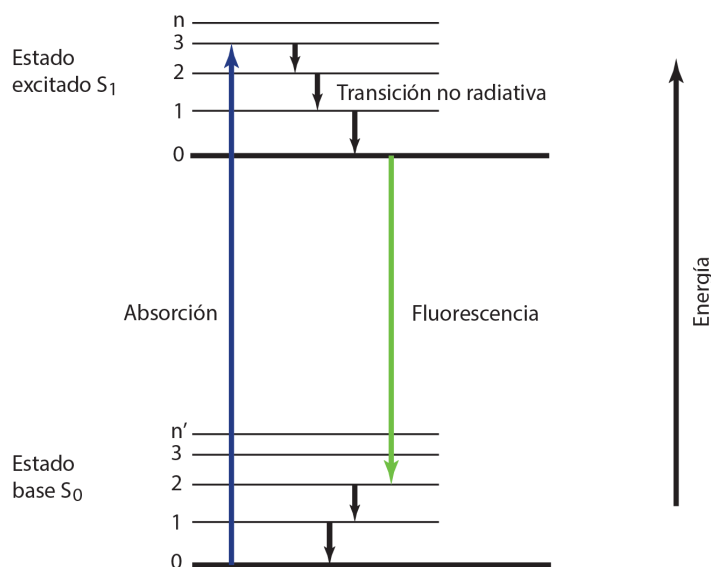


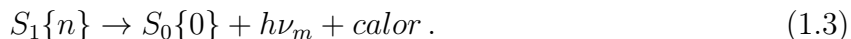
Figura 1.2: Proceso cuántico de fluorescencia

Los fotones absorbidos excitan al fluoróforo del estado base  $S_0\{0\}$  a un estado excitado  $S_1\{n\}$ . Luego, la energía  $n$ -vibracional es disipada hasta llegar al estado excitado de menor energía vibracional  $S_1\{0\}$ . Se emite entonces el fotón de fluorescencia hacia el estado  $S_0$  donde nuevamente pueden ocurrir procesos de relajación.

Luego, ocurre una relajación vibracional del estado excitado  $S_1\{n\}$  debido a una transferencia de momento entre la moléculas fluorescentes y el soluto, pasando al estado excitado de menor energía vibracional  $S_1\{0\}$  en un tiempo típico  $\sim 10^{-11}$  s. Además, otros procesos cuánticos no radiativos toman lugar durante este lapso temporal, tales como el decaimiento colisional (interacciones de corto alcance), cruce intersistema (transición a un estado triplete), conversión interna (acoplamiento vibracional entre el estado excitado y otro más bajo). Esto causa que no todas las moléculas excitadas regresarán al estado base mediante el proceso de fluorescencia.



Una vez que la molécula se encuentra en el estado excitado base  $S_1\{0\}$ , un fotón de energía  $h\nu_m$  es emitido, regresando al estado base  $S_0\{n'\}$  en general. Aquí nuevamente se produce un relajamiento vibracional hasta llegar al estado de menor energía  $S_0\{0\}$ . Como vemos, debido a los procesos de relajación vibracional, la energía del fotón emitido (de fluorescencia) es menor que la del fotón de excitación causando una diferencia de energía llamada el cambio de Stokes. Es decir, la longitud de onda de la luz emitida por fluorescencia es mayor que la de excitación, ocupando en realidad una pequeña banda de longitudes de onda.



Este proceso de fluorescencia es cíclico mientras los fotones mantengan excitando a las moléculas del fluoróforo, por lo que una sola de ellas puede generar muchos fotones detectables. Además, debido a los procesos no radiativos mencionados ya, se define la eficiencia cuántica de fluorescencia  $Q_f$  como la razón entre el número de fotones emitidos en comparación al número de fotones absorbidos. Esta fracción puede ser experimentalmente obtenida por técnicas de fotoespectrometría, donde se obtienen curvas de respuesta de flujo reflejado y/o absorbido (por la muestra) en función de un flujo luminoso incidente de referencia. Para la fluoresceína, la eficiencia cuántica de fluorescencia reportada es de  $Q_f \approx 0.92$  (Gaigalas and Wang, 2008; Diaspro, 2006).

A diferencia del proceso de fluorescencia, el fotoblanqueo no ha sido totalmente entendido, aunque algunas teorías han sido propuestas (Diaspro, 2006). El fotoblanqueo puede describirse como el proceso en que las moléculas del fluoróforo dejan de ser fluorescentes debido a un fenómeno de reacción fotoquímica que destruye a la molécula (fotólisis). Sin embargo, los detalles específicos acerca de las etapas y condiciones para que se dé esta reacción aún son discutidas.

Se sugiere que las interacciones fotodinámicas entre los estados triplete del fluoróforo excitado y del oxígeno molecular disuelto pueden ser las responsables que dan origen al fotoblanqueo. Si las moléculas tienen una alta probabilidad de efectuar un cruce inter-sistema, esto es pasar del estado excitado singlete al estado excitado triplete, éstas serán mucho más propensas a interactuar con el medio, ya que el estado triplete tiene un tiempo de vida mucho mayor que el singlete (milisegundos contra nanosegundos). En este estado, la molécula es altamente reactiva y puede reaccionar químicamente con el medio de forma irreversible. Además, los estados tripletes del oxígeno pueden interactuar con los estados excitados de la molécula produciendo, en ese caso, que se creen radicales libres de oxígeno que destruyan al

fluoróforo.

Otras explicaciones subrayan que los eventos de absorción de varios fotones o de un segundo fotón después que la molécula está ya en el estado excitado pueden estar involucrados en el fotoblanqueo. Estos eventos tienen una baja probabilidad de ocurrencia por lo que es necesario que la intensidad de la luz incidente sea varios órdenes de magnitud superior que para el caso de la excitación por un solo fotón. La acción de esta luz de intensidad mayor es la responsable de que las moléculas excitadas en el estado singlete tengan una mayor probabilidad de efectuar una transición al estado triplete excitado, lo que permite que las reacciones fotoquímicas tomen lugar.

De forma equivalente al proceso de fluorescencia, la eficiencia cuántica del fotoblanqueo  $Q_b$  se define como la relación entre el número de moléculas que han sido fotoblanqueadas y el número de fotones absorbidos durante la exposición. Para la fluoresceína,  $Q_b = 3 \times 10^{-5}$ , a una intensidad de excitación incidente de  $5.09 \text{ mW/mm}^2$  a  $488 \text{ nm}$  (Diaspro, 2006).

Debemos hacer notar que durante un experimento FRAP existen dos clases de fotoblanqueo: uno intencional y el otro no. El fotoblanqueo intencional es el que se realiza de forma controlada y motivada a producir el oscurecimiento de una zona para posteriormente observar la recuperación de la fluorescencia, en este caso la eficiencia de fotoblanqueo debe ser la mejor posible. En el otro caso, el llamado blanqueo por observación, se produce en la fase experimental de la recuperación ya que necesariamente debemos iluminar la muestra fluorescente para obtener las medidas. Esto provoca un fotoblanqueo no deseado que debe ser minimizado durante el experimento y/o corregido en el tratamiento posterior de los datos, tema que abordaremos al detalle en la sección 2.5.2.

### 1.3. Movimiento browniano

Ya que este trabajo tiene como propósito el estudio experimental de las propiedades difusivas en geometrías complejas, en la presente sección, y en las subsiguientes, exponemos la base teórica de este tema. Nuestra descripción empieza con el movimiento browniano, para luego entrar en detalles de la ecuación de difusión, y su solución en dos casos particulares. Más adelante, incluimos además, una aproximación de la ecuación de difusión para medios no homogéneos.

Iniciamos con el movimiento browniano. Éste debe su nombre a Robert Brown, quien en 1827 observó los desplazamientos erráticos en las trayectorias de las partículas de polen en agua. Sin embargo, la causa de estos movimiento no pudo ser explicada aún. No obstante, varias décadas después, el movimiento browniano fue asociado a un proceso de difusión molecular provocada por las fluctuaciones térmicas de las moléculas, las que a su vez dan origen a eventos colisionales. Esta interpretación física y su formalismo teórico fue desarrollado por Einstein y Langevin.

El movimiento browniano se puede modelar como una caminata aleatoria en una línea para el caso unidimensional. Supongamos entonces que tenemos una partícula que puede moverse sobre el eje  $x$  realizando pasos discretos de longitud  $\Delta x_i = \pm l$  y de duración  $\tau$  cada uno. Consideremos además que cada paso es estadísticamente independiente de cualquier otro y que es igualmente probable realizar un paso hacia una u otra dirección.

Por facilidad consideremos que al tiempo  $t = 0$  la partícula se encuentra en  $x = 0$ . Ahora, la posición luego de  $N$  pasos es:

$$x_N = \sum_{i=1}^N \Delta x_i. \quad (1.4)$$

Si efectuamos  $M$  de estas caminatas, se puede demostrar que la posición media (promediada en  $M$ ) sigue siendo el origen, es decir,  $\langle x_N \rangle = 0$ , lo que es consecuencia de la simetría de la probabilidad de efectuar un paso en cualquiera de las dos direcciones. Esta cantidad, por lo tanto, no es capaz de explicar el movimiento observable en el proceso difusivo. Ahora, introduzcamos otra cantidad conocida como el *desplazamiento cuadrático medio* definida como:

$$\langle x_N^2 \rangle = \frac{1}{M} \sum_{j=1}^M \left( x_N^{(j)} \right)^2, \quad (1.5)$$

donde  $x_N^{(j)}$  es la posición final de la partícula luego de  $N$  pasos en la  $j$ -ésima caminata. Luego, al efectuar el cálculo explícito bajo las premisas ya mencionadas, obtenemos que:

$$\langle x_N^2 \rangle = Nl^2, \quad (1.6)$$

de donde definimos la longitud de difusión como:

$$l_N = \left( \langle x_N^2 \rangle - \langle x_N \rangle^2 \right)^{1/2} = \sqrt{N}l. \quad (1.7)$$

Y ya que los  $N$  pasos son efectuados en un tiempo  $t = N\tau$ , podemos escribir:

$$l(t) = \sqrt{\frac{t}{\tau}} l = \sqrt{\frac{l^2}{\tau} t} = \sqrt{2Dt}, \quad (1.8)$$

donde la constante  $D$  es el conocido *coeficiente de difusión* de la partícula sobre el fluido base. Vemos que la longitud de difusión depende de  $t^{1/2}$ , por lo que este proceso es muy lento aun para escalas microfluídicas y poco conveniente para efectuar mezclas.

Este modelo puede ser extendido a dos y tres dimensiones descomponiendo en cada dirección el movimiento, así se puede llegar a que en general:

$$l(t) = \sqrt{2Ddt}, \quad (1.9)$$

siendo  $d = 1, 2, 3$ , la dimensión del espacio donde se produce la difusión.

Este tipo de comportamiento, dependiente de  $t^{1/2}$ , se conoce como difusión normal. Cabe mencionar que algunos procesos difusivos pueden describirse en función de  $t^{\nu/2}$ , siendo  $\nu$  un número; por lo que no solamente tenemos la difusión normal sino otro tipo de comportamientos, llamados de difusión anómala.

## 1.4. La ecuación de difusión

Como vimos en la sección anterior, el movimiento browniano puede ser modelado bajo un punto de vista microscópico, es decir, considerando el carácter discreto de la moléculas. Sin embargo, estos procesos de interacción a nivel molecular causan un fenómeno plenamente observable a nivel macroscópico; nos referimos a la difusión. Este proceso puede ser modelado por ecuaciones macroscópicas que describen un comportamiento continuo del medio a diferencia del modelo microscópico.

Para abordar este tema, centrémonos al estudio de una solución, cuya concentración del soluto es  $C(\vec{r}, t)$ . Definimos la densidad (másica) de corriente  $\vec{J}$  como la cantidad de sustancia pasando perpendicularmente a través de una superficie de referencia por unidad de tiempo. La ley fenomenológica de Fick para la difusión establece que para bajas concentraciones, el flujo de la especie es una respuesta lineal al gradiente de concentración, así:

$$\vec{J}(\vec{r}, t) = -D \vec{\nabla} C(\vec{r}, t). \quad (1.10)$$

Sin embargo, se ha encontrado que esta ley se responde muy bien también a soluciones con más alta concentración. En esta ecuación vemos que la dirección del flujo es opuesta al gradiente de concentración, lo que explica, por ejemplo, el hecho que una mancha de tinta inmersa en agua se expanda hacia las regiones de menor concentración. La ley de Fick puede ser vista como la representación macroscópica de los efectos de las fluctuaciones térmicas en las partículas.

Ahora por otro lado, aplicando la ley de conservación de masa de la especie difusiva, en un volumen  $V$  de superficie  $S$ , tenemos:

$$\frac{\partial}{\partial t} \int_V C dV = - \int_S \vec{J} \cdot d\vec{S}, \quad (1.11)$$

de donde, con la directa aplicación del teorema de Stokes, obtenemos:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \vec{\nabla} \cdot \vec{J} = 0, \quad (1.12)$$

e inmediatamente, usando la ley de Fick 1.10, se llega a:

$$\frac{\partial C}{\partial t} - D \nabla^2 C = 0, \quad (1.13)$$

la cual es conocida como la *ecuación de difusión*. En esta deducción hemos considerado a  $D$  como una constante en virtud de que el medio es homogéneo. En otro caso, cuando el medio es heterogéneo, el coeficiente de difusión debe ser considerado dependiente de  $\vec{r}$  y  $C$  inclusive.

Uno de los aspectos importantes de la ecuación de difusión es su irreversibilidad. Vemos que un cambio  $t \rightarrow -t$  en la ecuación de difusión implica un coeficiente de difusión negativo  $-D$ , lo que físicamente no tiene sentido, ya que esto supondría que cualquier inhomogeneidad en la concentración sea amplificada mientras más localizada sea. Desde el punto de vista microscópico, para revertir el proceso difusivo a un estado inicial de concentración, se necesitaría revertir exactamente las velocidades de todas las partículas del sistema, no solo de las moléculas que difunden, sino también de las que constituyen el fluido base. Esta reversión de velocidad no debería tener la más mínima fluctuación y ser absolutamente sincronizada entre todas las partículas, proceso muy difícil que tenga lugar debido a que las fluctuaciones térmicas para cada trayectoria estarán presentes. No obstante, existen procesos físicos en que no solamente existe la difusión, sino que ésta puede estar acompañada por otros efectos que entran en competencia con la difusión. En estas circunstancias, podemos tener situaciones en que las in-homogeneidades se ven magnificadas antes que atenuadas.

Para resolver la ecuación de difusión, necesitamos tener tanto el perfil inicial de concentración  $C(\vec{r}, 0)$ , así como las condiciones de borde del sistema. Dentro de estas consideraciones debemos definir la geometría sobre la cual la especie difundirá. La condición de borde temporal tiene que ver con el hecho que a tiempos muy grandes, la concentración llega a ser uniforme en el espacio considerado.

## 1.5. Solución de la ecuación de difusión en una dimensión

En razón de las necesidades posteriores del presente trabajo, en esta sección nos enfocamos a solucionar la ecuación de difusión 1.13 en una dimensión (eje  $x$ ) para el caso de un perfil inicial de concentración tal que: sea nulo en un ancho  $2a$ , centrado en el origen, mientras que fuera de esta región la concentración inicial es constante  $C_0$ , así:

$$C(x, 0) = \begin{cases} 0 & |x| < a, \\ C_0 & |x| \geq a. \end{cases} \quad (1.14)$$

El método de solución que usaremos será por medio de la transformada de Fourier. Así, definimos:

$$\tilde{C}(k, t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} e^{ikx} C(x, t) dx, \quad (1.15a)$$

$$C(x, t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-ikx} \tilde{C}(k, t) dk. \quad (1.15b)$$

Usando la ecuación 1.15b en 1.13, tenemos que ésta se transforma en:

$$\partial_t \tilde{C}(k, t) = -Dk^2 \tilde{C}(k, t), \quad (1.16)$$

cuya solución es:

$$\tilde{C}(k, t) = \tilde{C}(k, 0) e^{-Dk^2 t}, \quad (1.17)$$

con

$$\tilde{C}(k, 0) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} C(x, 0) e^{ikx} dx = C_0 \sqrt{2\pi} \delta(k) - \frac{2C_0}{\sqrt{2\pi}} \frac{\sin ka}{k}, \quad (1.18)$$

donde hemos usado el perfil de concentración inicial 1.14 y  $\delta(k)$  es la distribución delta de Dirac unidimensional.

Finalmente, realizando la transformada inversa, tenemos que:

$$\begin{aligned}
 C(x, t) &= C_0 \int_{-\infty}^{\infty} \delta(k) e^{-Dk^2 t} e^{-ikx} dk - \frac{C_0}{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{\sin ka}{k} e^{-Dk^2 t} e^{-ikx} dk \\
 &= C_0 \left( 1 - \frac{1}{2} \left\{ \operatorname{erf} \left[ \frac{a-x}{2\sqrt{Dt}} \right] + \operatorname{erf} \left[ \frac{a+x}{2\sqrt{Dt}} \right] \right\} \right),
 \end{aligned} \tag{1.19}$$

siendo  $\operatorname{erf}(x)$  la conocida función error. Este resultado está de acuerdo con la expresión presentada por Crank (1975) para el problema complementario (la especie difunde desde el centro hacia los lados) bajo otro método de solución. En la figura 1.3 podemos ver la evolución del perfil de concentración para variables reducidas adimensionales, pudiéndose observar la forma en que la concentración en la región  $-1 < x/a < 1$  va subiendo debido a la difusión desde los extremos. A tiempos suficientemente grandes se alcanza una condición homogénea de concentración  $C_0$  en todo el espacio.

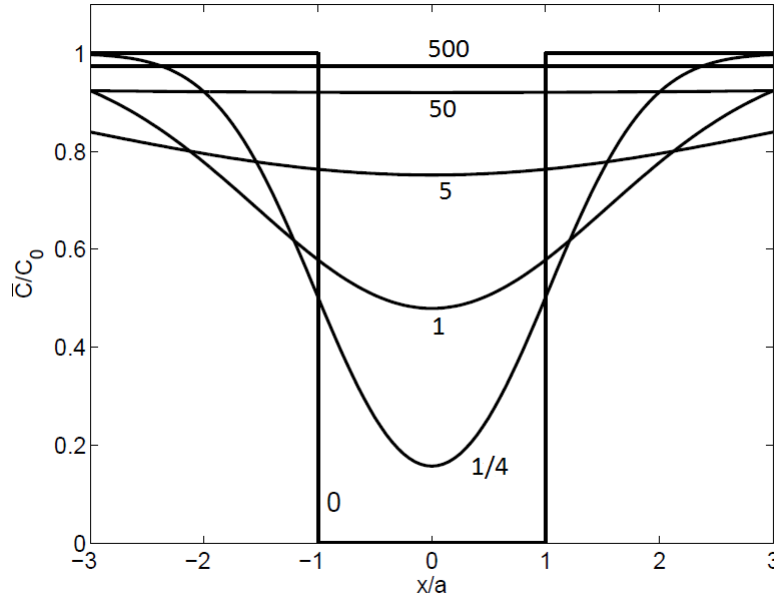


Figura 1.3: Concentración normalizada  $C/C_0$  vs distancia normalizada  $x/a$

Curvas de concentración para el caso de un perfil de concentración inicial definida por la ecuación 1.14. Los números en la curvas corresponden a un tiempo adimensional  $t/\tau_{1d}$ . Para el valor 0, se tiene el perfil de concentración inicial; mientras que para tiempos muy largos la concentración tiende a ser  $C_0$  en todo el espacio, debido a la ausencia de bordes considerada.

Complementariamente, obtengamos la expresión de la concentración media para toda la región  $-1 < x/a < 1$  en función del tiempo. Como podemos suponer ya a partir de la figura

1.3, dentro de este intervalo, la concentración media debe ir creciendo con el paso del tiempo hasta alcanzar un valor igual al del espacio circundante. Así, haciendo el cálculo obtenemos:

$$\bar{C}(t) = \frac{1}{2a} \int_{-a}^a C(x,t) dx = C_0 \left( 1 + \sqrt{\frac{t}{2\pi\tau_{1d}}} \left( 1 - e^{-\frac{2\tau_{1d}}{t}} \right) - \operatorname{erf}\left(\sqrt{\frac{2\tau_{1d}}{t}}\right) \right), \quad (1.20)$$

donde hemos introducido el tiempo característico de recuperación  $\tau_{1d}$  como:

$$\tau_{1d} = \frac{a^2}{2D}. \quad (1.21)$$

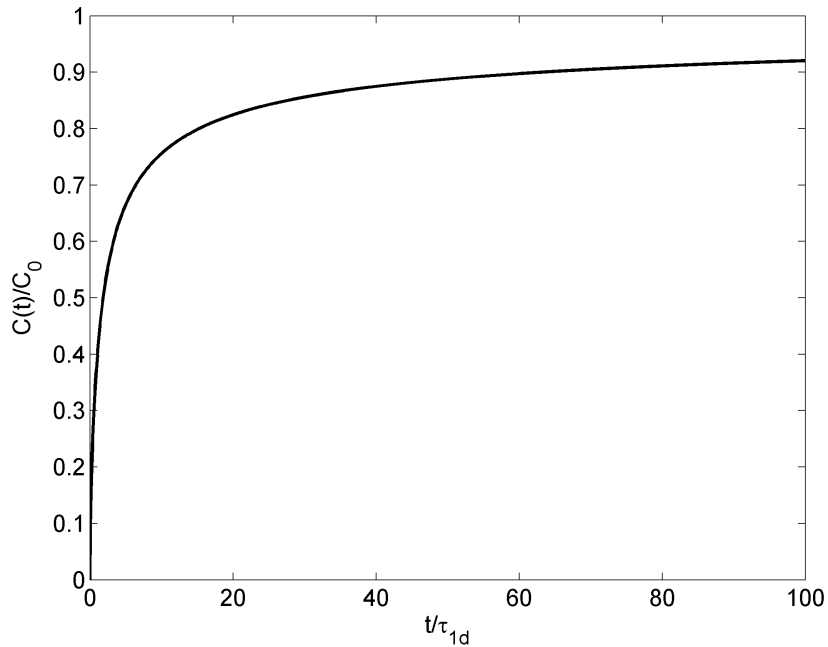


Figura 1.4: Concentración media normalizada  $\bar{C}(t)/C_0$  vs tiempo normalizado  $t/\tau_{1d}$

La curva de recuperación muestra la evolución temporal de la concentración media  $\bar{C}(t)/C_0$  en la región  $|x|/a < 1$ . Vemos que a tiempos largos, la concentración media  $\bar{C}(t)/C_0$  tiende a 1. Esta curva nos puede dar a conocer el coeficiente de difusión  $D$  de la especie.

En la figura 1.4 mostramos el comportamiento de esta función, o la llamada *curva de recuperación*, debido a que la concentración media inicial en la región  $|x/a| < 1$ , que puede ser vista como una perturbación, va recuperándose hasta alcanzar el equilibrio (o saturación) con la concentración del espacio restante que se supone suficientemente grande. Como vemos, esta curva está descrita por el parámetro  $\tau_{1d}$  que toma en cuenta el tamaño  $a$  de la región de análisis, pero también el coeficiente de difusión  $D$  que es propio de la sustancia que está



difundiendo. Por tanto, mediante la curva de recuperación podemos conocer este coeficiente  $D$  que caracteriza a la especie. Este tipo de curva de recuperación de la concentración dentro de una región dada será una de las herramientas analíticas que usaremos en el desarrollo de este trabajo.

## 1.6. Solución de la ecuación de difusión en dos dimensiones

Ahora pasemos al caso equivalente en dos dimensiones. Aquí consideramos la difusión de un perfil inicial de concentración nula en el interior de un círculo de radio  $R$ , mientras que la concentración fuera del círculo es constante  $C_0$ ; una vez más consideramos que el espacio externo es lo suficientemente grande. Es decir, al  $t = 0$ , la concentración en cualquier punto del espacio bidimensional, en coordenadas polares  $(r, \theta)$  cuyo origen coincide con el centro del círculo, es:

$$C(r, \theta, t = 0) = \begin{cases} 0 & r \leq R, \\ C_0 & r > R. \end{cases} \quad (1.22)$$

En este caso, deseamos obtener la expresión para  $C(r, \theta, t)$  por lo que tenemos que considerar la ecuación de difusión 1.13, que en coordenadas polares puede ser escrita como:

$$\frac{\partial C}{\partial t} - D \left( \frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial C}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 C}{\partial \theta^2} \right) = 0. \quad (1.23)$$

Aplicando el mismo método de transformada de Fourier, en este caso para dos dimensiones, podemos obtener que esta ecuación en el espacio de Fourier  $(k, \theta_k)$  toma la forma:

$$\partial_t \tilde{C}(k, \theta_k, t) = -Dk^2 \tilde{C}(k, \theta_k, t). \quad (1.24)$$

Solucionando esta ecuación tenemos que:

$$\tilde{C}(k, \theta_k, t) = \tilde{C}(k, \theta_k, 0) e^{-Dk^2 t}, \quad k \geq 0. \quad (1.25)$$

Y considerando el perfil inicial de concentración 1.22 se puede demostrar que:

$$\tilde{C}(k, \theta_k, 0) = \frac{1}{2\pi} \int_{\mathfrak{R}^2} C(r, \theta, 0) e^{i\vec{k} \cdot \vec{r}} d^2 \vec{r} = C_0 \left( \frac{\delta(k)}{k} - \frac{R}{k} J_1(kR) \right), \quad (1.26)$$

siendo  $J_n(x)$  la función de Bessel de orden  $n$ . En este punto, observamos que la dependencia angular en  $\theta_k$  deja de expresarse, esto debido a la simetría angular del perfil inicial, por lo que podemos decir que  $C(k, \theta_k, t) = C(k, t)$ .

Ahora, aplicando la transformada inversa para encontrar la concentración en el espacio métrico  $C(r, t)$ , la cual también es angularmente simétrica, podemos llegar a la expresión integral:

$$C(r, t) = C_0 - R C_0 \int_0^\infty J_1(kR) J_0(kr) e^{-Dk^2 t} dk. \quad (1.27)$$

Vemos en esta ocasión que no tenemos una expresión cerrada para  $C(r, t)$  a diferencia del caso unidimensional. Sin embargo, tal como ya se manifestó, estamos mayormente interesados en conocer la recuperación de la concentración media  $\bar{C}(t)$  en todo círculo en función del tiempo  $t$ . Entonces, haciendo este cálculo, tenemos que:

$$\begin{aligned} \bar{C}(t) &= \frac{1}{\pi R^2} \int_0^R \int_0^{2\pi} C(r, t) d^2 \vec{r} = C_0 - 2C_0 \int_0^\infty \frac{J_1^2(kR)}{k} e^{-k^2 D t} dk \\ &= \exp\left(\frac{-2\tau_{2d}}{t}\right) \left( I_0\left(\frac{2\tau_{2d}}{t}\right) + I_1\left(\frac{2\tau_{2d}}{t}\right) \right), \end{aligned} \quad (1.28)$$

donde se realizó primero la integración en  $\vec{r}$  y luego en  $k$ , e  $I_n(x)$  es la función modificada de Bessel de orden  $n$ . Así mismo, se define el tiempo característico de difusión (o recuperación) en dos dimensiones como:

$$\tau_{2d} = \frac{R^2}{4D}. \quad (1.29)$$

En la figura 1.5, podemos ver la curva de recuperación de la concentración para el caso presente. Así, comparando entre ambas situaciones, podemos decir que la recuperación de la concentración es más rápida en el caso bidimensional que en caso unidimensional debido a la existencia de un grado de libertad adicional de movimiento. De igual forma, ésta es la razón por la que para la difusión en dos dimensiones, se define  $\tau_{2d}$  como la mitad del valor unidimensional  $\tau_{1d}$ , ecuación 1.21.

## 1.7. Difusión en medios no homogéneos

En la sección anterior hemos discutido acerca de la difusión cuando el espacio disponible es homogéneo. Sin embargo cuando el medio tiene zonas accesibles a la difusión de las moléculas

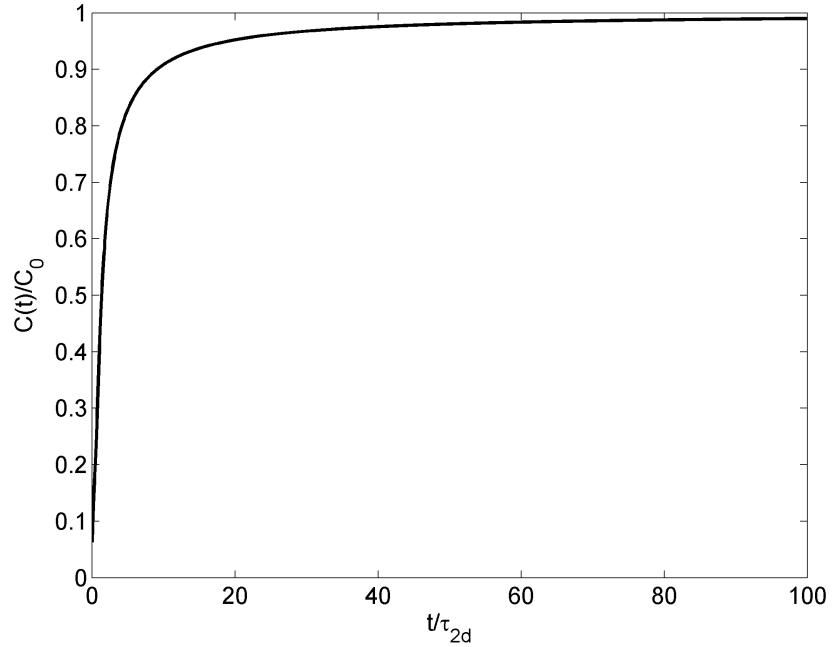


Figura 1.5: Concentración media normalizada  $\bar{C}(t)/C_0$  vs tiempo normalizado  $t/\tau_{2d}$

La curva de recuperación de la concentración media  $\bar{C}(t)/C_0$  en la región  $r/R \leq 1$  muestra una mayor rapidez de recuperación que en el caso unidimensional. Similarmente a lo anterior, a partir de esta curva también podemos conocer el coeficiente de difusión  $D$ .

y zonas donde no puede acceder, como en un medio poroso, la descripción de la difusión puede llegar a ser más complicada.

En este tipo de medios, figura 1.6, la fracción de volumen accesible al fluido  $V_{acc}$  en relación al volumen total  $V_{tot}$  es conocida como la porosidad,  $\rho = V_{acc}/V_{tot}$ . En tales medios, vemos que la concentración  $C(\vec{r}, t)$  de la especie en difusión en el fluido cambia abruptamente a cero en las zonas inaccesibles, por lo que resolver la ecuación de difusión 1.13, bajo las condiciones de borde muy complejas que describen a estos medios, resultaría muy complicado.

Sin embargo, un método que permite evitar este trabajo se basa en obtener un comportamiento promedio de la concentración  $\langle C \rangle$  en un volumen representativo del medio incluyendo las zonas en que  $C(\vec{r}, t)$  es nula. Este volumen tiene que ser mayor que el tamaño característico de una zona excluida (o poro) pero no más grande que una cierta escala mesoscópica para conservar la dependencia espacial de este medio (Lesne and Lagues, 2012).

Este método, llamado de homogeneización, se basa en encontrar una ecuación efectiva de

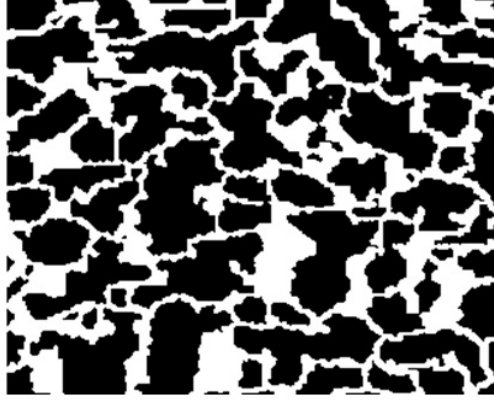


Figura 1.6: Estructura característica de un medio no homogéneo (poroso).

En un medio poroso, el fluido tiene zonas accesibles (blanco) y no accesibles (negro). En tales medios, establecer matemáticamente las condiciones de borde entre estas interfaces resulta muy difícil.

difusión en base a un promedio volumétrico de la concentración, en donde las condiciones de borde son absorbidas por la introducción de parámetros efectivos. Esta aproximación no sólo ha sido usada para la descripción de medios porosos sino también para estructuras vivas como el cerebro (Nicholson, 2001).

Detallamos el procedimiento general en tres dimensiones, para el caso bidimensional, los promedios volumétricos deben ser reemplazados por promedios superficiales. Definamos entonces:

$$\langle C \rangle = \frac{1}{V_0} \int_{V_0} C d^3\vec{r}, \quad (1.30)$$

donde  $V_0$  es el mencionado volumen representativo del medio.

Ahora, recordando la ley de Fick, ecuación 1.10, y promediando en el volumen, obtenemos:

$$\langle \vec{J} \rangle = -D \langle \vec{\nabla} C \rangle, \quad (1.31)$$

siendo  $D$  independiente de la posición.

En el lado derecho de la ecuación anterior, se puede hacer uso del teorema del promedio (Gray and Lee, 1977), teniéndose que:

$$\langle \vec{\nabla} C \rangle = \vec{\nabla} \langle C \rangle + \frac{1}{V_0} \int_A C d\vec{S}, \quad (1.32)$$

donde la integral se extiende sobre el área  $A$  de todas las interfaces existentes entre las zonas

accesibles e inaccesibles al fluido, y  $d\vec{S}$  es el vector elemental de superficie, perpendicular a estas interfaces.

No obstante, esta integral puede ser escrita, según lo demostrado por Lehner (1979), como:

$$\frac{1}{V_0} \int_A C d\vec{S} = (E - 1) \vec{\nabla} \langle C \rangle, \quad (1.33)$$

con  $E$ , para el caso de un medio isótropo, estando definida por medio la ecuación:

$$\langle \vec{\nabla} C \rangle = \rho E \vec{\nabla} \langle C \rangle^*, \quad (1.34)$$

siendo  $\langle C \rangle^*$  el promedio de la concentración tomada en el volumen neto accesible al fluido  $V_{acc}$  dentro de  $V_0$ . Así vemos que  $E = 1$  si el medio es homogéneo, mientras que  $E < 1$  para un medio poroso.

Luego, reemplazando la expresión 1.33 en la ecuación 1.32 obtenemos:

$$\langle \vec{\nabla} C \rangle = E \vec{\nabla} \langle C \rangle, \quad (1.35)$$

con lo que se tiene que la ley de Fick promediada es:

$$\langle \vec{J} \rangle = -ED \langle \vec{\nabla} C \rangle. \quad (1.36)$$

En este punto podemos ya definir un coeficiente de difusión efectivo del medio como:

$$D_{eff} = ED. \quad (1.37)$$

Complementariamente, promediando la ecuación de conservación 1.12, tenemos que:

$$\left\langle \frac{\partial C}{\partial t} \right\rangle + \langle \vec{\nabla} \cdot \vec{J} \rangle = 0. \quad (1.38)$$

De nuevo, el promedio de este gradiente podemos expandirlo usando el teorema de promedio, así:

$$\langle \vec{\nabla} \cdot \vec{J} \rangle = \vec{\nabla} \cdot \langle \vec{J} \rangle + \frac{1}{V_0} \int_A \vec{J} \cdot d\vec{S}. \quad (1.39)$$

Para evaluar esta última integral de superficie, usamos el hecho que las interfaces son impermeables al paso de moléculas difusivas, por lo que idénticamente se anula. En el caso de

interfaces permeables se considera que este flujo es proporcional al gradiente de concentración entre ambos lados de la interfase. Entonces, con esta consideración llegamos a que:

$$\langle \vec{\nabla} \cdot \vec{J} \rangle = \vec{\nabla} \cdot \langle \vec{J} \rangle. \quad (1.40)$$

Respecto al promedio de la derivada temporal de  $C$  en la ecuación 1.38, se puede demostrar que cuando las interfases son estáticas:

$$\left\langle \frac{\partial C}{\partial t} \right\rangle = \frac{\partial \langle C \rangle}{\partial t}, \quad (1.41)$$

con lo que la ecuación 1.38 toma la forma:

$$\frac{\partial \langle C \rangle}{\partial t} + \vec{\nabla} \cdot \langle \vec{J} \rangle = 0. \quad (1.42)$$

Luego, combinando esta ecuación con la expresión 1.36, llegamos a:

$$\frac{\partial \langle C \rangle}{\partial t} - D_{eff} \nabla^2 \langle C \rangle = 0, \quad (1.43)$$

lo que equivale a la ecuación de difusión en un espacio homogéneo con coeficiente de difusión  $D_{eff}$ . En esta ecuación, el parámetro  $D_{eff}$  reemplaza a las condiciones de borde de la interfase, cuando se considera el comportamiento de los valores promedios en la escala en que el medio parece homogéneo (pero poroso).

En este sentido, es común escribir que

$$D_{eff} = D/\lambda^2, \quad (1.44)$$

siendo  $\lambda$  la llamada tortuosidad. Este parámetro cuantifica el incremento de la longitud recorrida por una partícula entre dos puntos del medio inhomogéneo respecto a la distancia recorrida en un medio homogéneo. Este incremento se debe a que las moléculas en difusión tienen que recorrer un camino más largo entre dos puntos debido a la presencia de las interfases. Microscópicamente hablando, la tortuosidad también puede ser relacionada con el hecho de que las moléculas en difusión, además de colisionar con las otras moléculas de su misma especie y del solvente, también chocan con las interfases presentes en el medio poroso. Esto provoca, que en un tiempo dado, una determinada molécula se desplace menos que si estuviera en un medio homogéneo.

Existen varios modelos para el cálculo de la tortuosidad a partir de la estructura geométrica del medio. Estas aproximaciones abordan detalles como: el número de caminos posibles entre dos puntos; el tamaño, forma y variación de las zonas accesibles; factores topológicos que dan cuenta de la conectividad del medio, entre otros. Sin embargo, determinar las contribuciones relativas de tales aspectos resulta una cuestión abierta. Más aún, desde el punto de vista del movimiento mismo de las partículas, el cálculo de  $\lambda$  puede incluir no solo factores geométricos sino también constitutivos. En estas consideraciones pueden tomarse en cuenta el efecto de la viscosidad o las interacciones entre las moléculas en difusión y las interfases. No obstante este tipo de efectos también resultan de difícil cuantificación.

Volviendo a nuestra aproximación desarrollada, vemos que a pesar que el proceso de difusión es muy complicado de modelar a escalas microscópicas, éste puede ser descrito de manera más simple en escalas mayores mediante las variables promedio colectivas. De hecho, este tipo de aproximación también es conocido como de campo medio, e incluso, demostraciones matemáticas rigurosas de la validez de las teorías de campo medio efectivas han sido probadas (Bensoussan et al., 1978).

No obstante, existe un régimen crítico en el cual esta aproximación de campo medio falla. Esto ocurre cuando la geometría porosa del medio es fractal, es decir, se pueden encontrar poros a cualquier escala. En este caso, no se aplica una ecuación de difusión normal, sino que un comportamiento de difusión anómala debe considerarse (Lesne and Lagues, 2012).

## 1.8. Modelo teórico de la recuperación de la fluorescencia

En la sección 1.2, describimos la técnica del FRAP y detallamos los procesos físicos de fluorescencia y fotoblanqueo. Ahora, en la presente sección, exponemos un modelo teórico que relaciona el proceso difusivo de recuperación de la concentración (sección 1.6) con la recuperación de fluorescencia en un experimento FRAP.

Muchas descripciones teóricas del FRAP han sido desarrolladas, las cuales han ido tomando en cuenta diversos detalles de esta técnica. Uno de los trabajos pioneros fue realizado por Axelrod et al. (1976) donde ya se toma en cuenta las condiciones del perfil de iluminación como parámetro para describir la recuperación de la fluorescencia. Cabe destacar que en un experimento FRAP la variable medible es la fluorescencia que está directamente relacionada

con la concentración del fluoróforo. Sin embargo, la fluorescencia se ve afectada además por la forma de los perfiles de excitación y observación debido a ser una variable de intensidad luminosa. Por lo tanto, este aspecto influye sobre el nivel de fluorescencia excitada/detectada por lo que debe ser tomado en cuenta.

Trabajos posteriores teóricos, numéricos y experimentales han ido agregando aspectos tales como la naturaleza de la muestra en estudio: geometría, solución de varias especies, adherencia, organismo vivo; así como también las condiciones experimentales del proceso: diferentes perfiles de iluminación, fotoblanqueo parcial, tiempo de fotoblanqueo (Soumpasis, 1983; Sbalzarini et al., 2005; Frank et al., 2008).

En lo que sigue, tomamos en cuenta las hipótesis de Axelrod para la descripción del FRAP. Se considera un espacio homogéneo donde la región fotoblanqueada será un círculo de radio  $R$ , siendo  $C(r, t)$  la concentración de moléculas no fotoblanqueadas a la distancia  $r$  a un tiempo  $t$ , existe invariancia angular. Si la intensidad del perfil del (foto)blanqueo es  $I_b(r)$ , la concentración de las moléculas no blanqueadas justo después del blanqueo ( $t = 0$ ) puede ser escrita como:

$$C(r, 0) = C_0 \exp(-\alpha t_b I_b(r)), \quad (1.45)$$

siendo  $C_0$  la concentración inicial uniforme previa al fotoblanqueo,  $\alpha I_b(r)$  es la tasa de reacción del fotoblanqueo a primer orden y  $t_b$  es el tiempo de duración del fotoblanqueo, el cual es mucho más pequeño que cualquier tiempo característico de transporte.

Además si definimos la cantidad de blanqueo como:

$$G = \alpha t_b I_b(0), \quad (1.46)$$

y la intensidad de blanqueo normalizada

$$i_b(r) = \frac{I_b(r)}{I_b(0)}, \quad (1.47)$$

entonces la ecuación 1.45 se puede escribir como:

$$C(r, 0) = C_0 \exp(-G i_b(r)), \quad (1.48)$$

La ecuación 1.48 es el perfil de concentración inicial a partir de la cual deseamos obtener su proceso de difusión. Sin embargo, a diferencia de la ecuación 1.22 (perfil inicial de concentración bidimensional), en este caso la distribución de la concentración depende del perfil de



blanqueo que no necesariamente es homogéneo ya hablando en términos de la ejecución experimental. Así, la evolución difusiva de esta condición está gobernada por la misma ecuación ya mencionada antes:

$$\frac{\partial C}{\partial t} - D \left( \frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial C}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 C}{\partial \theta^2} \right) = 0, \quad (1.49)$$

bajo la condición de borde  $C(r, t \rightarrow \infty) = C_0$  debido a que el espacio exterior es mucho mayor que el círculo blanqueado, además la dependencia angular en  $C$  no interviene debido a la simetría de la condición inicial supuesta en el perfil de blanqueo.

Sin embargo, en el FRAP, la cantidad detectable y medible es el nivel de fluorescencia media  $F_G(t)$  sobre toda la región fotoblanqueada, la cual se relaciona con la concentración mediante:

$$F_G(t) = \frac{q}{A} \int I_{ob}(r) C_G(r, t) d^2 \vec{r}, \quad (1.50)$$

donde  $C_G(r, t)$  es la solución de la ecuación 1.49 dependiente del parámetro  $G$ ;  $q$  es la eficiencia neta de todos los procesos cuánticos de absorción, emisión y detección;  $A$  es un factor de atenuación de la intensidad de luz e  $I_{ob}(r)$  es el perfil de observación, que no necesariamente es igual al perfil de blanqueo  $I_b(r)$ .

Podemos ver de la ecuación 1.50, que si el perfil de observación  $I_{ob}(r)$  es uniforme, la fluorescencia  $F_G(t)$  es precisamente la concentración media  $\bar{C}(t)$  (ecuación 1.28), salvo un factor de proporcionalidad, por lo que también estará descrita por una curva de recuperación (en tanto el perfil de blanqueo  $I_b(r)$  reproduzca una condición inicial de déficit local de concentración a  $t = 0$ ). Por lo tanto, mediante el conocimiento de la curva de recuperación del nivel de fluorescencia  $F_G(t)$  podemos tener información acerca de las propiedades difusivas del proceso bajo consideración.

La influencia que tiene un perfil de blanqueo usual localizado es introducir una distribución de fluorescencia en la zona blanqueada. Generalmente se consideran dos casos comunes del perfil de iluminación suministrada por el láser o la lámpara de irradiación, éstos son: un perfil gaussiano

$$I_b(r) = \frac{2P_0}{\pi R^2} \exp\left(-\frac{2r^2}{R^2}\right), \quad (1.51)$$

o un perfil uniforme dentro del círculo de blanqueo y nulo fuera de él

$$I_b(r) = \begin{cases} P_0/\pi R^2 & r \leq R, \\ 0 & r > R, \end{cases} \quad (1.52)$$

donde  $P_0$  es la potencia de la luz incidente.

Cabe mencionar que el nivel de fluorescencia justo al iniciar el proceso de recuperación  $F_G(0)$  es menor cuanto mayor sea el valor de  $G$ . En condiciones experimentales idealmente se desea tener el mayor blanqueo posible, es decir  $F_G(0) = 0$ . Sin embargo, cuando esto no se logra (como sucederá en nuestro trabajo experimental), conviene describir la recuperación de la fluorescencia en su forma fraccional neta como:

$$f_G(t) = \frac{F_G(t) - F_G(0)}{F_G(\infty) - F_G(0)}. \quad (1.53)$$

Esta normalización nos permite cancelar la dependencia en  $q$  y  $A$  que se tiene en la ecuación 1.50, lo que resulta conveniente al no tener que incluir estas variables experimentales como parámetros de ajuste o estimarlas.

Continuando con el modelo teórico, vemos de la ecuación 1.50, que para obtener la expresión de  $F_G(t)$  debemos conocer  $C(r, t)$ , la cual está descrita por la ecuación de difusión. Así empleando el mismo método de solución por transformada de Fourier:

$$C(r, t) = \frac{1}{2\pi} \int e^{-i\vec{k}\cdot\vec{r}} \tilde{C}(k, t) d^2\vec{k}, \quad (1.54)$$

y realizando un procedimiento similar a la sección 1.6, llegamos a:

$$\tilde{C}(k, t) = \tilde{C}(k, 0) e^{-Dk^2t}, \quad k \geq 0, \quad (1.55)$$

con

$$\tilde{C}(k, 0) = \frac{C_0}{2\pi} \int \exp(-G i_b(r')) e^{i\vec{k}\cdot\vec{r}'} d^2\vec{r}', \quad (1.56)$$

donde hemos usado la distribución inicial de concentración dada en la ecuación 1.48.

Ahora, usando estas expresiones e introduciéndolas en la ecuación 1.50, tenemos:

$$F_G(t) = \frac{qC_0}{4\pi^2 A} \int \phi_G(\vec{k}) \exp(-Dk^2t) d^2\vec{k}, \quad (1.57)$$

donde se ha definido una cantidad  $\phi_G(\vec{k})$  que depende de las propiedades de la fuente de luz utilizada, como:

$$\phi_G(\vec{k}) = \int_{\Omega} I_{ob}(r) \exp(-i\vec{k}\cdot\vec{r}) d^2\vec{r} \int \exp(i\vec{k}\cdot\vec{r}' - G i_b(r')) d^2\vec{r}'. \quad (1.58)$$

donde  $\Omega$  es la región donde se mide la recuperación de la fluorescencia, es decir, el círculo de radio  $R$ .

La ecuación 1.57 es la que presenta Axelrod et al. como forma general de la fluorescencia para luego aplicar a los casos de perfiles de blanqueo y observación gaussianos y uniformes (ecuaciones 1.51 y 1.52 respectivamente). Para el caso del perfil uniforme, Axelrod llegó una solución que incluye una serie infinita, sin embargo, Soumpasis (1983) encontró una expresión cerrada a este problema, coincidiendo con la ecuación 1.28 que describe la recuperación de la concentración en dos dimensiones vista en la sección 1.6.

A partir de este resultado, realizamos algunos cálculos explícitos aun para cualquier forma de perfiles de iluminación y blanqueo. Separamos las dos integrales en 1.58 definiendo primeramente:

$$\phi_1(\vec{k}) = \int_{\mathbb{R}^2} \exp(i\vec{k} \cdot \vec{r}' - G i_b(r')) d^2\vec{r}' . \quad (1.59)$$

Ahora, la intensidad de blanqueo  $i_b(r')$  sólo incide en el círculo  $\Omega$  de radio  $R$ , mientras que en el espacio restante  $\Omega^c$  es nula, por lo que la integral anterior se puede escribir como:

$$\begin{aligned} \phi_1(\vec{k}) &= \int_{\Omega} \exp(i\vec{k} \cdot \vec{r}' - G i_b(r')) d^2\vec{r}' + \int_{\Omega^c} \exp(i\vec{k} \cdot \vec{r}') d^2\vec{r}' \\ &= \int_{\Omega} \exp(i\vec{k} \cdot \vec{r}' - G i_b(r')) d^2\vec{r}' + \int_{\mathbb{R}^2} \exp(i\vec{k} \cdot \vec{r}') d^2\vec{r}' - \int_{\Omega} \exp(i\vec{k} \cdot \vec{r}') d^2\vec{r}' . \end{aligned} \quad (1.60)$$

Luego, efectuando las integraciones posibles en coordenadas polares tenemos que:

$$\phi_1(\vec{k}) = 2\pi \left( T_G(k) + \frac{\delta(k)}{k} - \frac{R}{k} J_1(kR) \right) , \quad (1.61)$$

donde

$$T_G(k) = \int_0^R J_0(kr) \exp(-G i_b(r)) r' dr' . \quad (1.62)$$

De igual forma, definimos:

$$\phi_2(\vec{k}) = \int_{\Omega} I_{ob}(r) \exp(-i\vec{k} \cdot \vec{r}) d^2\vec{r} = 2\pi \int_0^R I_{ob}(r) J_0(kr) r dr . \quad (1.63)$$

Ahora, utilizando 1.61 y 1.63 en 1.57, tenemos:

$$F(t) = \frac{qC_0}{4\pi^2 A} \int \phi_1(\vec{k}) \phi_2(\vec{k}) \exp(-Dk^2 t) d^2\vec{k} , \quad (1.64)$$

de donde llegamos a que:

$$F_G(t) = \frac{2\pi q C_0}{A} \left( \int_0^\infty \phi_2(k) [k T_G(k) - R J_1(kR)] \exp(-Dk^2 t) dk + \phi_2(0) \right) , \quad (1.65)$$

y usando la expresión de fracción normalizada neta 1.53, obtenemos:

$$f_G(t) = 1 - \frac{\int_0^\infty \phi_2(k)[kT_G(k) - RJ_1(kR)] \exp(-Dk^2t) dk}{\int_0^\infty \phi_2(k)[kT_G(k) - RJ_1(kR)] dk}. \quad (1.66)$$

Las expresiones 1.65 y 1.66 describen en general la recuperación de la fluorescencia tomando en cuenta los perfiles de blanqueo, de observación y el parámetro  $G$ . Para el caso de que la intensidad de blanqueo y observación sean homogéneos en la región circular blanqueada, ecuación 1.52, se puede demostrar que  $f(t)$  no depende de  $G$ , quedando descrita por la misma ecuación que se obtiene para la recuperación de la concentración en el caso bidimensional, es decir:

$$f(t) = \exp\left(\frac{-2\tau}{t}\right) \left( I_0\left(\frac{2\tau}{t}\right) + I_1\left(\frac{2\tau}{t}\right) \right), \quad (1.67)$$

donde  $\tau$ , de aquí en adelante, es el tiempo característico de difusión en dos dimensiones.

En el caso de que los perfiles de iluminación de blanqueo y observación sean gaussianos (ecuación 1.51), basándonos en la aproximación de Axelrod para  $G \geq 4$ , podemos obtener que:

$$f(t) = \frac{\nu G^{-\nu} \Gamma(\nu) - G^{-1}}{1 - G^{-1}}, \quad (1.68)$$

siendo  $\nu = (1 + 2t/\tau)^{-1}$  y  $\Gamma(\nu)$  la función gama.

En la figura 1.7 podemos observar las curvas de recuperación de la fluorescencia  $f(t)$  para el caso de perfiles homogéneos y gaussianos. Las diferencias aquí observadas se deben al efecto de la forma de los perfiles de iluminación y del parámetro de blanqueo  $G$ , mas no de las propiedades difusivas del fluido en estudio. En general, podemos decir que la curva de recuperación de fluorescencia depende del parámetro de blanqueo (experimental)  $G$  así como del tiempo característico  $\tau$  de la especie en difusión.

Sin embargo, para otros tipos de perfiles de iluminación debemos usar la expresión 1.66 y obtener las formas explícitas de  $f(t)$  de ser posible. Precisamente esta expresión es la que usaremos para caracterizar el proceso de recuperación de la fluorescencia en los experimentos que describiremos en los siguientes capítulos ya que los perfiles de trabajo no se ajustan a ninguno de estos dos casos particulares.

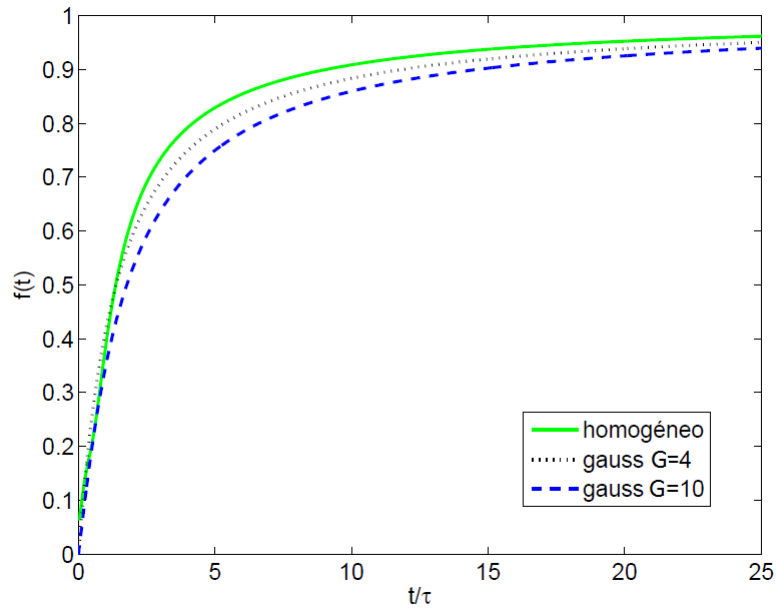


Figura 1.7: Curva teórica de la fluorescencia neta fraccional  $f(t)$  vs el tiempo normalizado  $t/\tau$

Para el caso de perfiles homogéneos de iluminación, la recuperación de la fluorescencia  $f(t)$  es más rápida que para el caso de perfiles gaussianos. Inclusive, para mayores valores de  $G$  en el perfil gaussiano, la recuperación es más lenta. Estas diferencias se deben a las condiciones de iluminación en el blanqueo y la observación. No obstante, las propiedades difusivas del fluido en consideración son las mismas

# Capítulo 2

## Métodos Experimentales

En este capítulo exponemos inicialmente algunas propiedades de los mosaicos de Voronoi como un método para obtener la estructura reticular aleatoria, y aplicar estas geometrías al diseño de microcanales. Luego exponemos el proceso experimental de fabricación de los microcanales mediante el método de litografía óptica y suave. Posteriormente procedemos a reseñar el procedimiento de uso de los microcanales en conjunto con los demás instrumentos para la realización de los experimentos FRAP. Mencionamos además las restricciones experimentales que tenemos que manejar en base a nuestra metodología de trabajo. Más adelante incluimos también el método de tratamiento de las imágenes para la obtención de la curva de recuperación de la fluorescencia y la aproximación numérica usada para obtener los parámetros de ajuste óptimos. Finalmente, describimos las variantes experimentales al procedimiento anterior para el caso de los experimentos con flujo oscilatorio.

### 2.1. Diseño de los microcanales

#### 2.1.1. Mosaicos de Voronoi

El presente trabajo tiene como objetivo determinar experimentalmente el coeficiente efectivo de difusión  $D$  en estructuras que recuerden la geometría del retículo endoplasmático (figura 1.1). Vemos que estas redes son bastante heterogéneas y poligonales en su mayoría. Un método para generar un tipo de geometría de estas características se basa en los mosaicos

de Voronoi, que ya ha sido usado para simular geometrías de medios porosos (Wu et al., 2012), además de ser utilizados en otras áreas como geografía o biología.

Los mosaicos (también llamados diagramas o teselaciones) de Voronoi dividen a una región bidimensional (o tridimensional) en polígonos (o poliedros) convexos, que llamaremos celdas, llenando todo el espacio sin sobreponerse. En la presente exposición consideramos el caso bidimensional. La forma más simple de describir a los mosaicos Voronoi consiste en que teniendo un conjunto dado de puntos en el espacio  $p_i$ , que llamaremos *semillas*, la celda  $R_i$  asociada está conformada por los puntos cuya distancia a  $p_i$  es menor o igual a su distancia a cualquier otro punto. En otras palabras, una celda de Voronoi  $R_i$  está compuesta por todos los puntos que están más cerca de  $p_i$  que a cualquier otro punto semilla. Con este criterio, a cada punto  $p_i$  le corresponde una única celda de Voronoi  $R_i$ . En la figura 2.1 podemos apreciar un mosaico de Voronoi para una distribución regular de semillas.

Aunque existe toda un formalismo matemático del tema, incluyendo variantes como métricas no euclidianas, topología, hiper-dimensionalidad, definiciones equivalentes; nosotros no ahondaremos en estos aspectos teóricos sino que nos centraremos en la descripción estadística geométrica que tienen estas estructuras. Al respecto, Zhu et al. (2001) realizó un trabajo muy detallado de la distribución estadística de varios parámetros geométricos basado en la generación computacional de mosaicos de Voronoi irregulares.

Como hemos mencionado, los mosaicos de Voronoi se generan a partir de los puntos semillas, por lo que la distribución de éstos determinará la forma de los mosaicos. Esta distribución puede ser regular o irregular en el espacio. Cuando las semillas tienen un patrón regular, es decir, todos los puntos semilla están igualmente espaciados con sus vecinos más próximos, la red de mosaicos de Voronoi que genera es regular. En el caso de máximo empaquetamiento, donde las semillas tienen 6 vecinas más cercanas, el patrón de Voronoi obtenido es aquel donde celdas son hexágonos perfectos, lo que conocemos como una red de panal de abejas. Este modelo de distribución de las semillas se conoce como modelo de esfera dura, en el sentido que las semillas no pueden estar más cerca que una distancia  $d_0$  (las esferas son todas iguales). Así para la estructura regular de panal de abeja, si tenemos  $n$  semillas en un área  $A_0$ , es fácil demostrar que la distancia entre dos semillas vecinas cualquiera es:

$$d_0 = \left( \frac{2A_0}{n\sqrt{3}} \right)^{1/2}. \quad (2.1)$$

En la figura 2.1 se muestra la geometría de un mosaico regular de Voronoi. Observamos

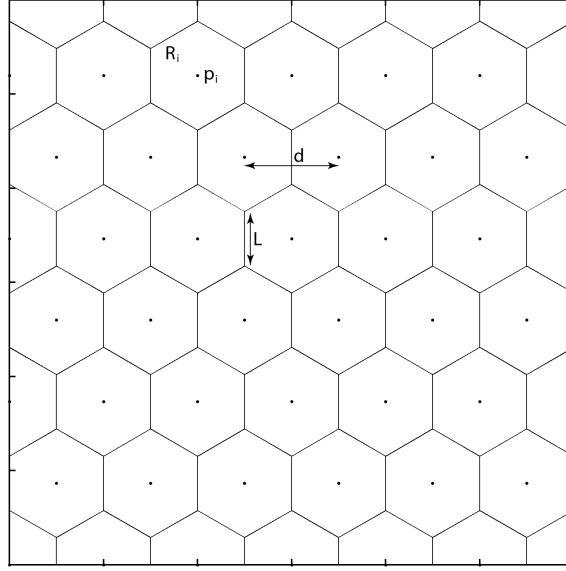


Figura 2.1: Mosaico regular de Voronoi de máximo empaquetamiento.

Se muestra la distribución regular de las semillas, así como las celdas de Voronoi hexagonales. A cada semilla  $p_i$  le corresponde una celda  $R_i$ . Se muestra la longitud de arista  $L$  de una celda y la distancia  $d$  entre semillas.

la estructura hexagonal de las celdas así como sus respectivas semillas que coinciden, en este caso, con el centro geométrico del hexágono. Identificamos  $L$  como la longitud de una arista de la celda; para el caso discutido aquí, para cualquier arista tenemos que:

$$L_0 = \frac{d_0}{\sqrt{3}} = \left( \frac{2A_0}{3n\sqrt{3}} \right)^{1/2}. \quad (2.2)$$

Ahora, modificando este modelo de esfera dura, podemos obtener mosaicos irregulares de Voronoi. Supongamos de nuevo que deseamos generar  $n$  celdas de Voronoi (no necesariamente regulares) en una área  $A_0$ . Esto únicamente será posible si la mínima distancia  $\delta$  entre dos semillas vecinas es menor que  $d_0$ , ya que si fuera mayor, no cabrían las  $n$  semillas o celdas. Lo que equivale a decir que las semillas son esferas duras de diámetro  $d_0$  o menos y por lo tanto, al reducir su tamaño, tienen un espacio adicional que les permite “moverse” de la configuración regular inicial. De esta forma la distribución de las semillas será irregular y el mosaico de Voronoi correspondiente será desordenado. Aquí, es conveniente definir el parámetro de regularidad  $\alpha$  del mosaico de Voronoi como:

$$\chi = \frac{\delta}{d_0}. \quad (2.3)$$



Con esta definición, vemos que si  $\delta = d_0$ ,  $\chi = 1$ , lo que corresponde a la red regular de panal de abeja. En cambio,  $\delta = 0$ , quiere decir que no hay restricción en la distancia entre semillas, siendo idealmente puntos que inclusive pueden coincidir en su posición. Para este caso, el mosaico de Voronoi obtenido será completamente desordenado con  $\chi = 0$ . Este parámetro es conocido también como factor o densidad de empaquetamiento para el caso de esferas duras.

### 2.1.2. Generación de las redes

Una vez que hemos descrito a los mosaicos de Voronoi e introducido el parámetro  $\chi$  definido por la ecuación 2.3, nuestro siguiente paso es generar los mosaicos de Voronoi bajo este criterio, como una forma de obtener la geometría reticular desordenada que deseamos estudiar. Así, definimos una área unitaria  $A_0$  cuadrada fija cuyos vértices son los puntos cartesianos  $(0, 0)$ ,  $(0, 1)$ ,  $(1, 1)$ ,  $(1, 0)$ , donde las semillas serán colocadas. Luego, necesitamos dos parámetros para que el mosaico de Voronoi quede completamente determinado; por conveniencia de nuestro trabajo, los parámetros que escogimos para generar y caracterizar los mosaicos serán el número  $n$  de semillas (o celdas) y el parámetro de regularidad  $\chi$ .

A partir de estas consideraciones, empleamos el software Matlab 2012a para generar computacionalmente los mosaicos de Voronoi, para lo cual desarrollamos un algoritmo para obtener  $n$  puntos aleatorios (semillas) en la región  $A_0$  de forma que cada uno de éstos se sitúe a una distancia no menor que  $\delta$ , el cual queda determinado con el parámetro de control  $\chi$ . El proceso de obtención de estas  $n$  semillas parte con la generación del primer punto aleatorio. Luego, un segundo punto aleatorio es generado y el algoritmo discrimina si la distancia de este punto al primer punto es mayor que  $\delta$ . De cumplirse esta condición el segundo punto es conservado como semilla, de lo contrario, es descartado y un nuevo punto aleatorio es generado hasta cumplir con esta condición. Siguiendo el ciclo, el tercer punto aleatorio debe cumplir la condición de distancia mínima con las dos primeras semillas ya generadas. Este proceso se repite hasta alcanzar las  $n$  semillas. Una vez que se cuenta con la distribución de las semillas, el mosaico de Voronoi se obtiene utilizando las funciones incluidas en el paquete informático mencionado.

Al tener un mosaico de Voronoi irregular, vemos que las celdas obtenidas pueden ser polígonos de cualquier lado, irregulares en general y de tamaños diversos dependiendo del factor de regularidad. En la figura 2.2 vemos estas diferencias para 4 valores de  $\chi$  para  $n = 100$ . No

obstante de las heterogeneidades entre las celdas, se puede realizar un estudio estadístico de las propiedades geométricas promedio para todo el mosaico. Al respecto, Zhu et al. (2001), en el trabajo mencionado, realizó el estudio estadístico de las distribuciones de los parámetros de las celdas tales como su número de lados, longitud de arista, ángulos internos, área, entre otros, encontrando que estas distribuciones puede ser descritas por modelos probabilísticos teóricos existentes o proponiendo nuevos.

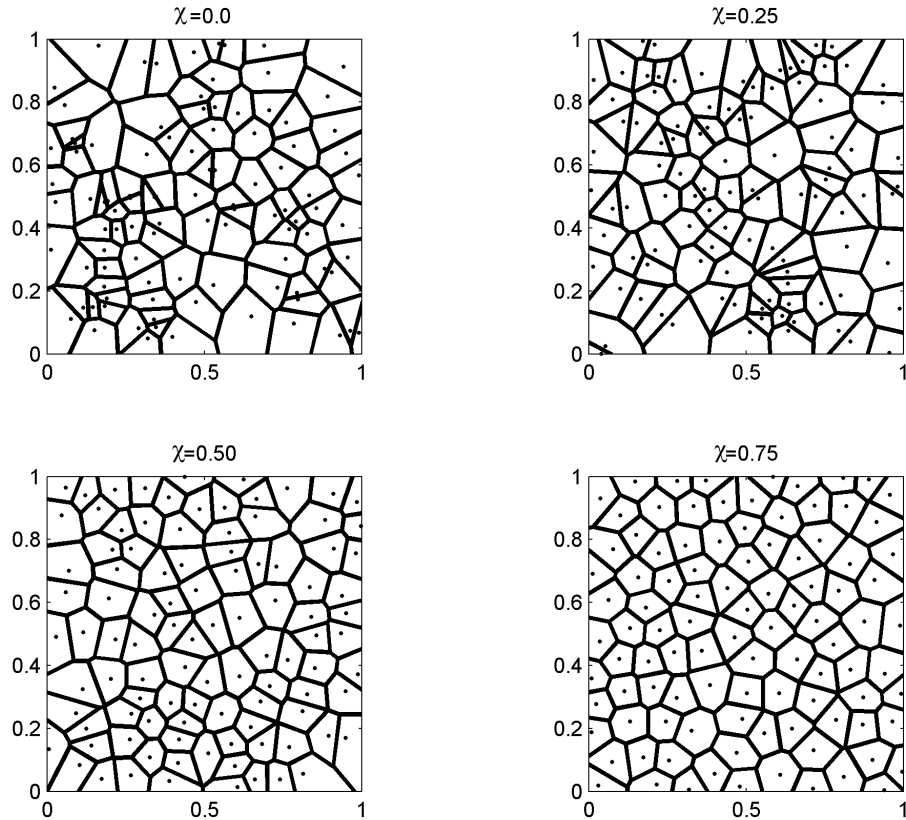


Figura 2.2: Mosaicos irregulares de Voronoi para varios  $\chi$

Todos los mosaicos de Voronoi que se muestran tienen  $n = 100$  celdas. En el caso  $\chi = 0$  el mosaico es completamente aleatorio. A medida que  $\chi$  crece, el mosaico va adquiriendo mayor regularidad.

En lo que tiene que ver con los objetivos de esta tesis, nos centraremos únicamente en el análisis de la distribución de la longitud de arista  $L$  de una celda de Voronoi. Para una red completamente regular,  $L$  es monodispersa, y está determinada por la ecuación 2.2; en cambio, en un mosaico irregular, el parámetro equivalente para todo el mosaico es la longitud media  $\langle L \rangle$  tomada de todas las aristas existentes.

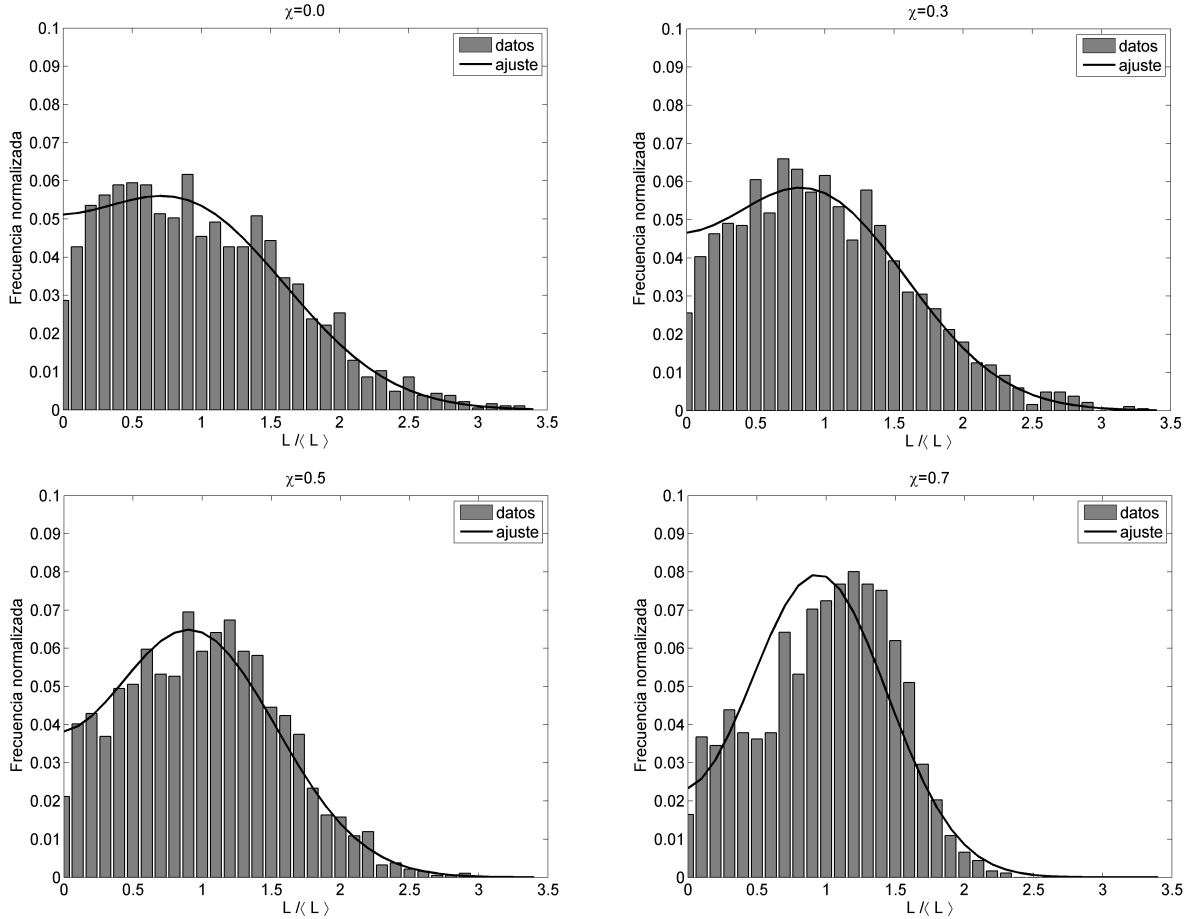


Figura 2.3: Histograma de frecuencias del parámetro  $L/\langle L \rangle$  para varios  $\chi$

Los histogramas fueron construidos con datos de los mosaicos de Voronoi de 2000 celdas. Para  $\chi = 0.7$  vemos que la distribución de  $L/\langle L \rangle$  es más estrecha que para valores menores. Además observamos que la asimetría inicial se va atenuando. El ajuste según la ecuación 2.4 es mejor para  $\chi$  pequeños.

Con el propósito de tener una idea de la distribución estadística de  $L$ , escogimos generar 20 mosaicos de Voronoi de 2000 celdas cada uno, esto lo hicimos para valores de  $\chi$  desde 0 hasta 0.7 en pasos de 0.1. Luego, si consideramos que cada celda en promedio tiene 6 lados, cada uno de los cuales está compartido entre 2 celdas, la estimación es que tenemos  $1.2 \times 10^5$  aristas para nuestro análisis estadístico, para cada valor de  $\chi$ . Así, para cada mosaico realizamos el cálculo de la longitud media de arista de celda  $\langle L \rangle$  y su desviación estándar  $s$ .

En la figura 2.3 observamos algunos histogramas de frecuencia normalizada que nos muestran la distribución de  $L/\langle L \rangle$ , a distintos parámetros de regularidad. Podemos ver que a medida que incrementamos el valor de  $\chi$  la distribución se va haciendo más angosta alrededor de  $L/\langle L \rangle = 1$ , y además se torna más simétrica respecto valores de menor regularidad.

Además incluimos el ajuste correspondiente de la curva de distribución  $q(L)$ , según el modelo propuesto por Zhu:

$$q(L) = \frac{1}{2\sigma_g\sqrt{2\pi}} \left( \exp\left(-\frac{(L-\mu_g)^2}{2\sigma_g^2}\right) + \exp\left(-\frac{(L+\mu_g)^2}{2\sigma_g^2}\right) \right), \quad (2.4)$$

donde  $\mu_g$  y  $\sigma_g$  son parámetros de ajuste para cada valor de  $\chi$ . Podemos observar que esta distribución se adapta mejor a los datos para  $\chi$  pequeños.

Lo siguiente que podemos hacer es conocer cómo se relaciona  $\langle L \rangle$  con  $L_0$ , en función de  $\chi$ . Recordemos que  $L_0$  es la longitud de arista para un mosaico completamente regular (mantenemos fijo  $n$ ). El resultado podemos verlo en la figura 2.4, donde observamos que  $\langle L \rangle \approx L_0$  para cualquier valor de  $\chi \leq 0.6$ . Además, la desviación standard, mostrada como barras en la figura, es máxima para  $\chi = 0$  con un valor de  $s \approx 0.7 L_0$ . Para observar más claramente cómo varía esta dispersión, hemos graficado el comportamiento del parámetro  $s/s^*$  en función de  $\chi$ , donde  $s^*$  la desviación standard que corresponde a una red completamente desordenada ( $\chi = 0$ ). En ella vemos que la dispersión decrece al aumentar  $\chi$ , sin embargo, este decrecimiento no es tan pronunciado ya que como vemos, cuando  $\chi = 0.7$  aún tenemos una dispersión  $s \approx 0.7s^*$ .

Así, de acuerdo al resultado estadístico, para valores de  $\chi < 0.5$  podemos escribir que:

$$\langle L \rangle \approx L_0. \quad (2.5)$$

Cabe destacar que el método aquí usado de generación de las semillas no es eficiente para obtener distribuciones con  $\chi > 0.7$ , ya que la probabilidad de obtener aleatoriamente estructuras de mayor regularidad es cada vez más baja al incrementar  $\chi$ , requiriéndose mucho mayor tiempo de ejecución del algoritmo. Para obtener mosaicos de mayor regularidad existen otros métodos como por ejemplo, partiendo de la red regular hexagonal se puede ir desplazando las semillas gradualmente adoptando la red un patrón irregular.

Con los resultados concernientes a la distribución de  $L$  y su dependencia en  $\chi$ , y teniendo en cuenta el tipo de geometría en la que deseamos estudiar los fenómenos de difusión, vemos que con un adecuado valor de regularidad, podemos crear mosaicos de Voronoi que reproduzcan las estructuras reticulares heterogéneas que recuerdan a la vistas en un retículo endoplasmático celular o incluso medios porosos. Así, para los propósitos de este trabajo, valores de  $\chi < 0.5$  son aptos para obtener mosaicos de Voronoi muy desordenados. Ahora, dentro de este rango, para acotar el estudio experimental del presente trabajo, se fijó un

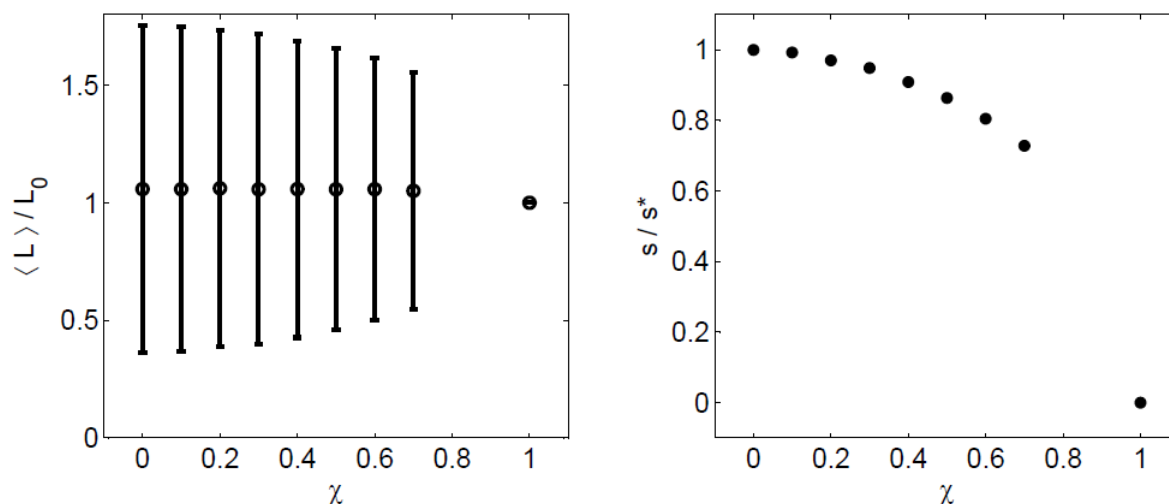


Figura 2.4: Longitud media  $L/\langle L \rangle$  y dispersión  $s/s^*$  en función de  $\chi$

A la izquierda, vemos que  $\langle L \rangle / L_0$  se mantiene prácticamente constante para  $\chi < 0.5$ , sin embargo la desviación está alrededor del 70% para  $\chi = 0$  decayendo a medida que aumentamos la regularidad. A la derecha, la desviación standard normalizada  $s/s^*$  muestra poca variación para  $\chi$  menores que 0.3, a partir de lo cual empieza a reducirse con mayor rapidez, hasta llegar al valor nulo que corresponde a la red completamente regular.

único parámetro de regularidad  $\chi = 0.3$ . Este valor fue escogido en base al criterio de que la distribución estadística de la longitud de arista  $L/\langle L \rangle$  (figura 2.3) a  $\chi = 0.3$  está mejor descrita por la ley de probabilidad 2.4, en comparación a otros valores de  $\chi$ .

Luego de haber establecido el comportamiento estadístico de  $\langle L \rangle$  y haber fijado el parámetro de regularidad, estamos en condiciones de generar redes controladas para nuestro trabajo experimental. De esta forma, ya con el fin de diseñar y construir nuestra redes de microcanales, escogimos generar mosaicos de Voronoi de  $N=500, 1000, 2000$  y  $4000$  celdas en un área unitaria con un parámetro de regularidad fija  $\chi = 0.3$ . En este punto, usando las herramientas informáticas mencionadas, generamos el gráfico de las geometrías a ser construidas.

Seguidamente, trasladamos este gráfico a un software de tratamiento de imágenes (Illustrator CS6, Adobe Systems), donde realizamos varias adecuaciones. Primero escalamos el gráfico a un cuadrado de 1.5 cm de lado. Luego especificamos el ancho  $w$  de las aristas que serán los microcanales, escogimos varios anchos desde 20 hasta 120 micrones, tabla 2.1. Adicionalmente incluimos dos zonas elípticas homogéneas a los lados opuestos del cuadrado, las

cuales servirán como área de pre-llenado y pre-evacuación. Complementariamente incluimos los indicadores para los puntos de entrada y/o salida del fluido.

Además inscribimos la figura dentro de un círculo de 5.4 cm de diámetro. Debemos especificar que toda la estructura de las redes generadas y demás identificadores que se pueden incluir (texto) deben ser puestas en color blanco sobre un fondo negro ya que esto será de suma importancia para la posterior construcción de los microcanales, figura 2.5.

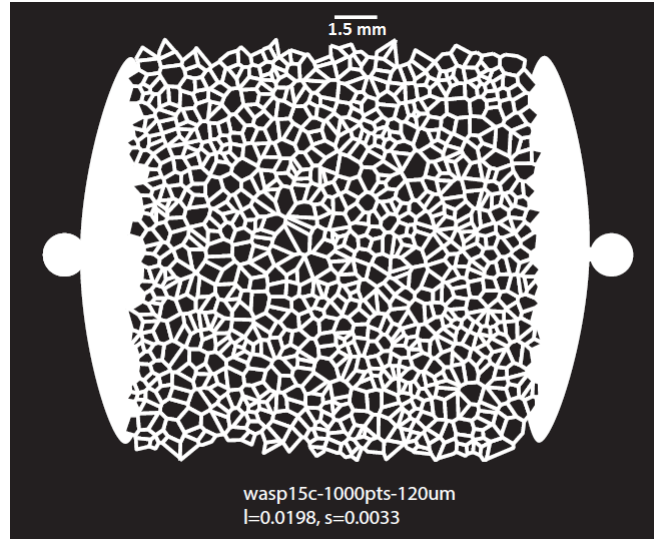


Figura 2.5: Diseño de una red de microcanales aleatorios usando una geometría de Voronoi, de longitud  $\langle L \rangle = 297 \mu\text{m}$  y ancho de canal  $w = 120 \mu\text{m}$ .

Como vemos, hasta aquí tenemos dos variables geométricas propias de las redes:  $\langle L \rangle$  y  $w$ ; con ellas podemos introducir un parámetro adimensional  $\eta = \langle L \rangle / w$  que llamaremos *aspecto reticular*. Este nombre se debe al hecho que la red puede ser vista como formada por hilos muy delgados si  $\eta$  es grande o, por el contrario, formada por islas (las celdas) si  $\eta$  es pequeño. Además,  $\eta$  nos da una idea de la fracción accesible al fluido, ya que dado un  $\langle L \rangle$  fijo, la fracción accesible vendrá determinada por el ancho  $w$  de los microcanales. En la tabla 2.1 resumimos las redes diseñadas para nuestro estudio experimental en términos de las variables mencionadas.

## 2.2. Construcción de los microcanales

Para construir los microcanales, luego de haber cumplido con su diseño, se deben realizar esencialmente dos pasos, primero construir el molde del microcanal y después el microca-

$N$	$\langle L \rangle$ ( $\mu\text{m}$ )	$w$ ( $\mu\text{m}$ )				
		20	40	60	80	120
500	418.5	20.93	10.46	6.98	5.23	3.49
1000	297	14.85	7.43	4.95	3.71	2.48
2000	198	9.90	4.95	3.30	2.48	1.65
4000	145.5	7.28	3.64	2.43	1.82	1.21

Tabla 2.1: Valores de  $\eta$  de las redes microfluídicas diseñadas.

Las celdas en gris significan que estos diseños no fueron construidos debido a: 1) tener el tamaño de celda Voronoi muy grande en comparación al campo de visión disponible del microscopio usado ó, 2) tener una relación entre  $\langle L \rangle$  y  $w$  tal que el grosor del canal va ocupando el espacio de la celda Voronoi, por lo que la geometría reticular se va perdiendo.

nal propiamente dicho. Para estos procedimientos seguimos un protocolo de litografía que detallamos en cada caso.

### 2.2.1. Construcción del molde

Luego de que los canales han sido diseñados en el computador, éstos son impresos en una salida de película transparente tipo offset para ser usados como fotomáscaras en el proceso de construcción del molde del canal. Este procedimiento se detalla a continuación y es conocido como *litografía óptica* (Chiu and Shaw, 1997; Shaw et al., 1997).

El procedimiento consiste en grabar el diseño del canal sobre un substrato adecuado; este grabado tendrá un grosor predefinido del orden de los micrones y es lo que en adelante llamaremos *el molde*. Para el efecto, usamos como substrato obleas o wafers circulares de silicio de 2 pulgadas de diámetro, pulidas sobre una cara, orientación  $\langle 100 \rangle$ , tipo P, comercializadas por *University Wafers*. Sobre la superficie pulida de una oblea limpia y seca, depositamos una porción de resina fotoresistente SU-8 (Gersteltec Sarl), luego colocamos la oblea en un *spin coater* con el fin de que la capa de resina tenga un espesor uniforme sobre toda la superficie de la oblea. El tiempo y velocidad de rotación del *spin coater* viene dada por las especificaciones del fabricante de la resina de acuerdo al espesor deseado. En este caso, usamos el protocolo suministrado para un espesor de 50 micrones ( $1700 \times 2\pi$  rad/min durante 1 min 53 s, tiempo de desaceleración 13 s).

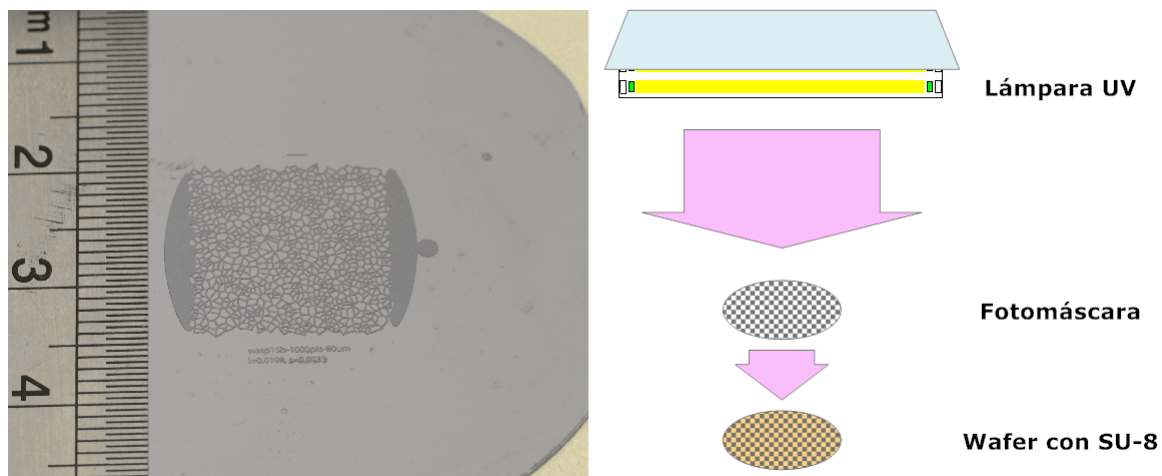


Figura 2.6: Esquema del grabado del diseño y molde

A la derecha: La luz ultravioleta incide sobre la fotomáscara, la cual solamente deja pasar la luz UV por las regiones transparentes, coincidentes con el diseño del canal, hacia la oblea con SU-8 en su superficie. A la izquierda observamos el molde construido con la red de zonas de Voronoi ya grabadas sobre el wafer de silicio.

Posteriormente, dejamos reposar por una hora para que escapen las posibles burbujas atrapadas en la resina. Colocamos la oblea en una placa caliente a  $65^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos y luego subimos la temperatura en pasos de  $5^{\circ}\text{C}$  cada 3 minutos hasta alcanzar los  $95^{\circ}\text{C}$ , temperatura que mantenemos por 40 minutos o hasta que el solvente se evapore y la resina solidifique completamente. Con este procedimiento logramos que la resina quede firmemente adherida a la oblea.

Después situamos la fotomáscara del diseño del canal (salida transparente offset) sobre la capa sólida de resina, teniendo en cuenta la mejor disposición para evitar posibles fallos en la estructura de la resina (hoyos, regiones más gruesas). Luego procedemos a iluminar este arreglo con una lámpara ultravioleta (UV) colocada perpendicularmente a 30 cm de altura (figura 2.6). El tiempo de iluminación utilizado fue de 6 minutos. La exposición a luz UV actúa como catalizador de una reacción química que tiene lugar en la resina fotoresistente, que sin embargo ocurre en presencia del calor, por lo que inicialmente no observamos aún la geometría inscrita sobre la resina. Por tal razón, inmediatamente luego de la exposición colocamos nuevamente la oblea sobre la placa caliente siguiendo la misma rampa de incremento de temperatura mencionada antes. Una vez efectuado ese horneado seremos capaces de observar el diseño del microcanal sobre la resina fotoresistente.



Luego seguimos con el revelado o desarrollo del molde. Esto lo hacemos por inmersión de la oblea en el solvente químico *propylene glycol monomethyl ether acetate* (Sigma-Aldrich), llamado comúnmente *desarrollador SU-8*. El tiempo de inmersión depende del tamaño y geometría del diseño, en este caso, típicamente fue de 6 minutos o hasta que toda la resina que no fue expuesta sea removida de la oblea. Así, sólo la porción de resina que fue expuesta a la luz UV (el diseño) permanece en la oblea. Seguidamente limpiamos con isopropanol toda la oblea para eliminar restos de desarrollador y evitar un sobre-revelado de la resina. Como paso opcional, se horneó la oblea en la placa caliente a una temperatura de 135°C por un tiempo de 2 horas para re-entrelazar algunas grietas existentes posterior al desarrollo y brindar mayor resistencia a la estructura en general, además este horneado asegura que la resina SU-8 no cambie sus propiedades mecánicas a las temperaturas de uso.

### 2.2.2. Construcción del canal

Una vez que tenemos el molde, podemos construir el canal (Xia and Whitesides, 1998). Primeramente procedemos a realizar la mezcla de poly-dimethylsiloxane (PDMS), un polímero muy usado en el campo de la microfluídica, con un reticulante con el fin de lograr que cadenas de PDMS se enlacen entre ellas. Esta mezcla la hacemos en proporción de 1 g de reticulante por cada 10 gramos de PDMS. La mezcla obtenida es transparente en el rango óptico de observación, aunque inicialmente es algo opaco debido a las burbujas de aire en la mezcla por lo que es recomendable dejar reposar al menos una hora antes de continuar con el siguiente paso.

Procedemos a verter los 11 gramos de esta mezcla sobre el molde obtenido en el apartado anterior, previo a colocarlo sobre un recipiente a fin que no se derrame el PDMS. Además, vertemos PDMS adicional sobre placas limpias de vidrio, que servirán de sustrato del canal, y que sellarán el molde. Dejamos que el PDMS endurezca, dejándolo reposar por la noche al ambiente y en la mañana siguiente colocarlo por varios minutos en el horno. Luego, procedemos a separar toda la pieza de PDMS del molde (figura 2.7). Realizamos las perforaciones para las entradas y salidas del flujo, y sometemos tanto la pieza de PDMS como el sustrato de vidrio a un tratamiento de plasma por un intervalo de 8 minutos con el fin de excitar las moléculas de PDMS para su posterior pegado. Sellamos el canal pegando la cara de PDMS donde está inscrito el diseño del canal con la cara de la placa de vidrio cubierta con este polímero igualmente, y finalmente colocamos el chip microfluídico en un horno para reforzar

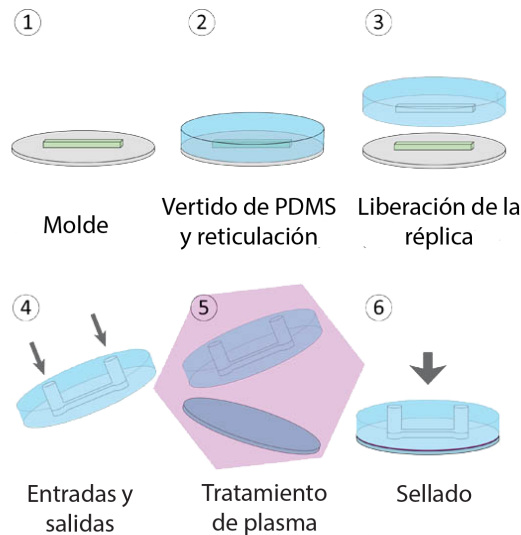


Figura 2.7: Procedimiento para la construcción del microcanal

Para la construcción del canal, debemos contar con el molde previamente fabricado (1). Sobre éste vertemos el PDMS (2), formando la estructura hueca del canal (3). Perforamos la entradas y salidas (4), sometemos a tratamiento de plasma (5), y finalmente sellamos el canal con otra placa de vidrio (6). Imagen tomada de <http://www.elveflow.com/wp/wp-content/uploads/2012/04/PROCESS-MOLDING-SINGLE-LAYER-PDMS-DEVICE-copie.png>

el pegado.

En la figura 2.8, mostramos dos vistas de una red microfluídica de canales terminada. Al nivel macroscópico, podemos observar la estructura transparente obtenida donde el chip está expuesto a la luz de excitación del microscopio. Observamos las entradas y salidas del fluido, fluoresceína en nuestro caso. Al nivel microscópico, vemos los detalles de la geometría de la red de microcanales, ubicamos los parámetros  $L$  y  $w$ .

### 2.3. Montaje experimental

En el desarrollo de todos los experimentos de este trabajo, los microcanales fueron llenados con una solución de fluoresceína disodio (Kingscote Chemicals) a una concentración de 0.5 mM en agua, teniendo una tonalidad verdosa. El llenado de los canales se lo realiza conectando una manguera a una entrada del microcanal, y mediante el uso de bombas de jeringa (KDS200, KDSscientific) se inyecta un flujo constante de esta solución del orden de  $1 \mu\text{L}/\text{min}$  (figura 2.9). Adicionalmente se conecta otra manguera a la salida del canal como

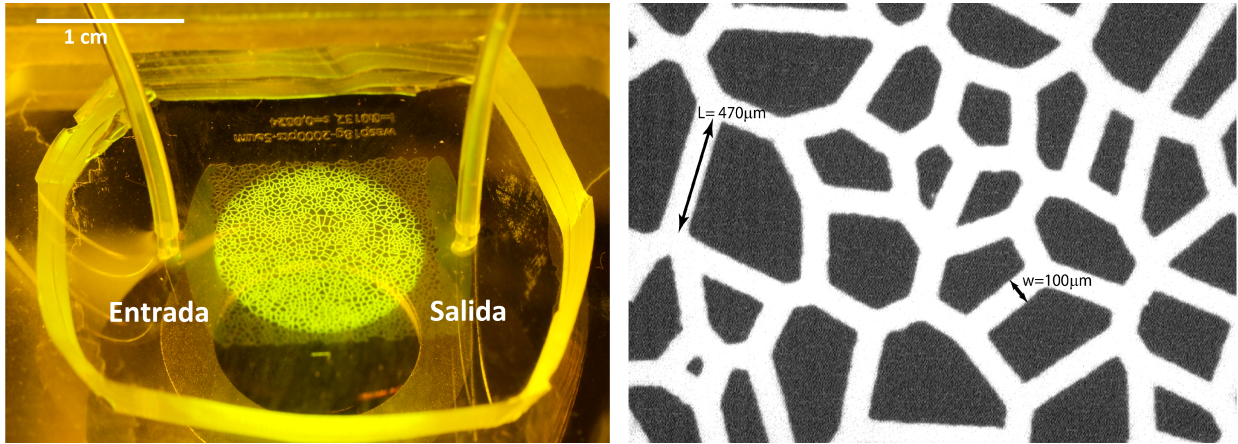


Figura 2.8: Vistas reales de una red de microcanales.

A la izquierda: Mostramos una red de microcanales construida, se observa las mangueras de entrada y salida. Los canales fueron llenados con fluoresceína. La imagen fue tomada a través de un filtro para observar la fluorescencia de emisión. A la derecha: Una red de microcanales vista al microscopio. Identificamos la longitud  $L$  de una celda (la red completa tiene  $n = 2000$  celdas) y el ancho  $w$  para toda la red.

vía de escape del aire y fluido sobrante, además se debe tener sumo cuidado de que todas las porciones de aire en el interior de los canales sean removidas.

Para realizar las mediciones de la recuperación de la fluorescencia mediante la técnica de FRAP, usamos un microscopio invertido (Eclipse TS100, Nikon) con su respectivo accesorio de iluminación por lámpara de mercurio (Intensilight C-HGFI, Nikon). Esta lámpara ofrece la mayor iluminación entre longitudes de onda entre 340 nm y 600 nm, teniendo además picos de intensidad en longitudes de onda  $\sim 430$  nm,  $\sim 534$  nm,  $\sim 542$  nm, entre otros. La longitud de onda para la excitación de la especie química usada en estos experimentos, la fluoresceína, es  $\lambda_{ex}=494$  nm, mientras que la de emisión es  $\lambda_{em}=521$  nm, por lo que vemos que el equipo usado es apropiado para estudios de fluorescencia. Como podemos observar en la figura 2.10, el proceso óptico inicia con la luz que viene de la lámpara de iluminación y atraviesa un filtro para excitación, dejando pasar la luz de longitudes de onda  $\lambda_{ex}$  (con un cierto ancho  $\Delta\lambda_{ex}$ ), pasa por un espejo separador de rayos (*beamsplitter*) y por el objetivo para excitar el espécimen. Luego, la fluorescencia de respuesta pasa por el mismo objetivo y por el *beamsplitter*, donde toma un diferente camino óptico, llega a filtro de emisión dejando pasar la luz de longitudes de onda  $\lambda_{em}$  (con un cierto ancho  $\Delta\lambda_{em}$ ) y luego al sensor correspondiente.

La obtención de las imágenes se realizó acoplado al microscopio una cámara de video (Marlin F080-C, Allied Vision Technologies), la misma que fue conectada al computador

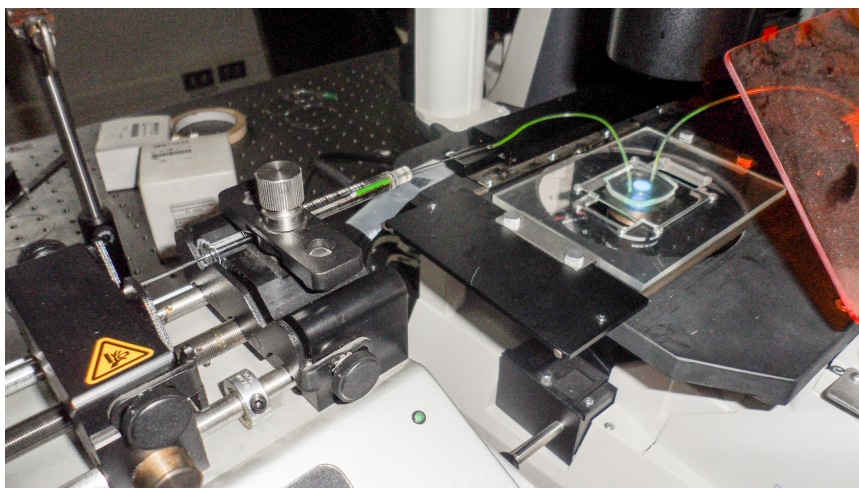


Figura 2.9: Disposición experimental

Se muestra el microcanal conectado a las mangueras de entrada y salida. La bomba de jeringa acoplada nos entrega un flujo constante.

donde se guardaron las imágenes. Debido a que la recuperación de la fluorescencia es rápida a tiempos pequeños después del fotoblanqueo mientras que a tiempos largos es lenta cuando ya alcanza el equilibrio, diseñamos una aplicación que permita obtener muchas imágenes a tiempos cortos y pocas a tiempos largos. Esta aplicación controló el obturador de la cámara por intermedio de una tarjeta de adquisición de datos (USB 6008, National Instruments) que permitió la comunicación entre el computador, donde se ejecuta la aplicación (en LabView, National Instruments), y la cámara. La disposición experimental descrita se muestra en la figura 2.11.

## 2.4. ¿Cómo realizamos los experimentos FRAP?

Una vez que hemos colocado el microcanal en el portaplaquetas del microscopio y debidamente llenado con la solución de fluoresceína, enfocamos y seleccionamos una región de interés. El proceso de fotoblanqueo lo efectuamos usando la misma luz que proporciona la lámpara de mercurio, iluminando la zona del canal a la máxima intensidad y con una lente de magnificación 10x. Realizamos esto con el fin de que la luz sea lo suficientemente intensa y sea capaz de producir el fotoblanqueo en las moléculas de fluoresceína. El tamaño de la zona fotoblanqueada es controlado mediante la apertura del diafragma, con lo que se define un radio  $R$  de la zona blanqueada que consideramos circular. En este punto, podemos definir el

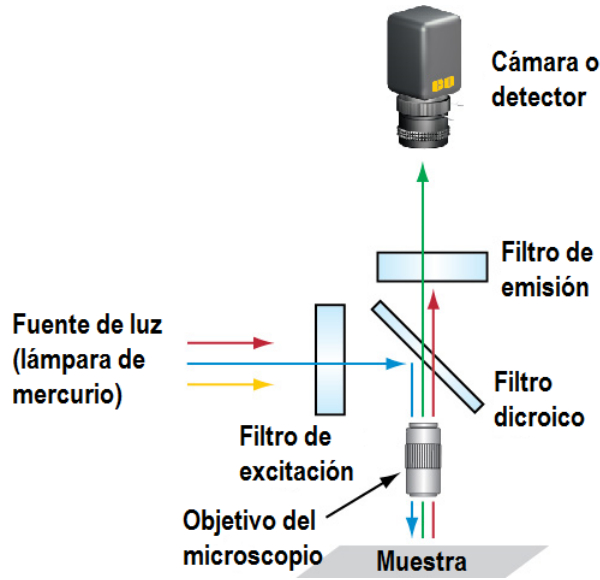


Figura 2.10: Óptica para la excitación y emisión de fluorescencia

Imagen basada de <http://www.edmundoptics.com/technical-resources-center/microscopy/understanding-microscopes-and-objectives/>

nuevo parámetro adimensional:

$$\gamma = \frac{R}{\langle L \rangle}, \quad (2.6)$$

al cual llamaremos *homogeneidad* en el sentido que al crecer  $R$  (o disminuir  $\langle L \rangle$ ), el área en consideración encierra mayores detalles geométricos de la red. Por ejemplo, si  $\gamma \sim 1$ , estaríamos considerando un sector de fotoblanqueo local, con una escala al nivel de la longitud de las aristas donde los efectos colectivos de la red no son apreciables. En cambio,  $\gamma \gg 1$  corresponde a una escala donde los detalles colectivos de la red entran en consideración, donde podemos considerar válida la aproximación de medio efectivo homogéneo.

Continuando con la descripción del FRAP, una vez que se ha realizado el fotoblanqueo, se obtendrá que la zona de exposición quede bastante oscurecida, inclusive perceptible a simple vista debido a los tamaños que manejamos. El tiempo típico de fotoblanqueo fue de 3 segundos, llegando hasta los 5 segundos dependiendo del area de la zona fotoblanqueada. Todo este proceso de fotoblanqueo y la subsecuente recuperación de la fluorescencia de la zona blanqueada es grabado en imágenes TIFF con una resolución de  $1280 \times 768$  pixeles a escala de grises de 8 bits, en la cual un pixel negro corresponde a un nivel de gris 0 y un pixel blanco un nivel de gris de 255.

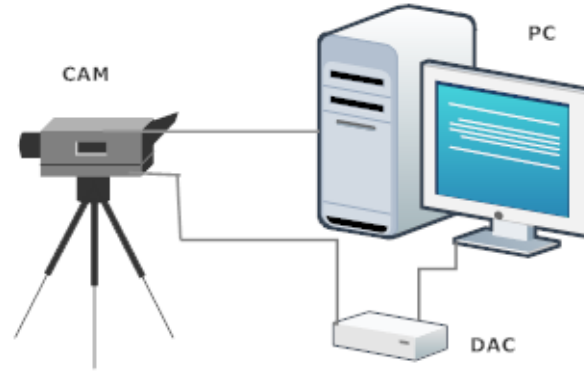


Figura 2.11: Diagrama de control y adquisición

El computador PC controla la tarjeta DAC, la cual genera pulsos eléctricos que accionan el disparador de la cámara CAM, acorde a nuestro requerimiento: muchas imágenes al inicio de la recuperación y pocas después. Las imágenes capturadas se guardan en el computador PC.

Inmediatamente después que hemos realizado el fotoblanqueo, cambiamos la lente de magnificación (girando el revólver del microscopio) de 10x a 2x con el fin de observar toda la zona blanqueada. Simultáneamente disminuimos la intensidad de luz fluorescente en un factor de 8 ( $/8x$ ) para minimizar el efecto de blanqueo no intencional que toma lugar al observar la recuperación de fluorescencia.

A partir de este punto, que corresponde a  $t = 0$ , consideramos que se inicia el proceso de recuperación de la fluorescencia. Realizamos la grabación de las imágenes a 5 Hz durante los primeros 90 s debido a que en esta etapa la recuperación de la fluorescencia es rápida, a esta etapa la llamamos *grabación continua*. Luego de este tiempo procedemos a tomar las imágenes cada 57 s, momento en que accionamos la iluminación por 3 s mientras las imágenes son tomadas y guardadas (a 5 Hz igualmente), luego de esto desactivamos la iluminación hasta el siguiente minuto cuando se repite el procedimiento. Dependiendo de la magnitud de la zona blanqueada, podemos extender el tiempo de grabación desde unos pocos minutos hasta una hora. La frecuencia de grabación de 5 Hz es suficientemente rápida para captar la recuperación de la fluorescencia por difusión.

## 2.5. Restricciones experimentales

Existen algunas limitaciones y efectos de tipo experimental que debemos mencionar, que tienen que ver con las características mismas del equipo usado, del método de experimentación

escogido y de procesos físicos complementarios que ocurren durante el experimento. Estos efectos tienen que ser considerados y/o corregidos en el proceso del posterior análisis de datos, para así obtener un mejor resultado al caracterizar el proceso de recuperación de la fluorescencia por difusión.

### 2.5.1. Perfil de iluminación

Primeramente, al realizar experimentos FRAP preliminares pudimos observar que el perfil de iluminación de la lámpara fluorescente no era uniforme debido probablemente a un mal ajuste del equipo. Esta inhomogeneidad afecta al proceso de fotoblanqueo y a las imágenes correspondientes a la recuperación de la fluorescencia, razón por la que es necesario conocer experimentalmente este perfil de iluminación. Adicionalmente, el modelo matemático que usaremos incluye conocer el perfil de iluminación como un factor que debe tomarse en cuenta para la descripción de la evolución de la curva de recuperación de fluorescencia (sección 1.8). Por lo que nuestro trabajo consiste en medir el perfil radial de iluminación de blanqueo (o excitación) y de observación (o emisión), para varios radios de apertura del diafragma con las que trabajaremos más adelante.

Para el caso del perfil de blanqueo  $I_b(r)$ , necesitamos un desarrollo teórico previo. Recordemos que en el proceso de fotoblanqueo el nivel de iluminación es máximo, causando una rápido descenso de la fluorescencia, llegando a un nivel homogéneo de saturación. Esto enmascara los detalles del perfil de iluminación usado por lo que resulta complicado tener una idea de su forma, bajo estas circunstancias.

Por tal motivo, establecimos una aproximación teórica que sea válida para casos en que el fotoblanqueo sea muy débil, ya que esto lo podemos lograr reduciendo la intensidad de luz de la lámpara y exponiendo la muestra fluorescente por tiempos muy cortos. Así, apoyándonos en la hipótesis ya utilizada en el análisis teórico, sección 1.8, ecuación 1.48, consideremos nuevamente la concentración de fluoresceína inmediatamente después del blanqueo  $C(r, 0)$  en función de la distancia radial  $r$ :

$$C(r, 0) = C_0 e^{-G i_b(r)}. \quad (2.7)$$

donde  $C_0$  es la concentración de la especie química antes del fotoblanqueo,  $G$  es la cantidad de blanqueo e  $i_b(r)$  es el perfil de blanqueo. En equilibrio, la concentración  $C_0$  es homogénea en

todas la zonas. Ahora para blanqueos muy tenues podemos asumir que el nivel de fluorescencia  $F_0$  es proporcional a la concentración  $C_0$  de la especie química fluorescente. Además, si la iluminación no es uniforme, la fluorescencia  $F_0$  tampoco lo será, sino que será dependiente en general del punto del espacio específico  $(r, \theta)$  dentro del círculo de observación. En este punto ignoramos la distribución angular de iluminación, y solo nos enfocamos a obtener la dependencia radial de los perfiles, ya que en adelante corregiremos el efecto de la asimetría angular. Así, la fluorescencia inicial (antes del blanqueo) pasa a ser una función del radio,  $F_0(r)$ . Con estas consideraciones entonces, salvo un factor, la fluorescencia inmediatamente después del blanqueo  $F(r, 0)$  puede ser descrita como:

$$F(r, 0) = F_0(r)e^{-G i_b(r)}. \quad (2.8)$$

Luego, expandiendo a primer orden tenemos:

$$F(r, 0) = F_0(r) \times (1 - G i_b(r)), \quad (2.9)$$

de donde:

$$G i_b(r) = 1 - \frac{F(r, 0)}{F_0(r)}, \quad (2.10)$$

con lo que obtenemos una expresión para  $i_b(r)$ , acompañada del factor  $G$ . Sin embargo, ya que estamos interesados en la forma del perfil mas no en su valor específico, normalizaremos esta intensidad como:

$$i_b(r) = \frac{1 - \frac{F(r, 0)}{F_0(r)}}{1 - \frac{F(0, 0)}{F_0(0)}}, \quad (2.11)$$

la cual es independiente del factor  $G$ .

Como podemos observar en la ecuación 2.11, necesitamos conocer los niveles de fluorescencia (nivel de gris) antes de efectuar el fotoblanqueo,  $F_0(r)$ , e inmediatamente después de efectuarlo,  $F(r, 0)$ ; así que el procedimiento experimental descrito a continuación se basa en obtener estos datos. Para ello, usamos un chip microfluídico diseñado como un reservorio bidimensional isótropo y homogéneo totalmente lleno de fluoresceína. Para un radio de apertura  $R$ , usando el objetivo de magnificación 2x, expusimos el chip a la luz de la lámpara fluorescente bajo una intensidad  $/8x$  por intervalo de tiempo entre 1 s y 1.5 s, es decir, tomamos alrededor de 15 a 23 imágenes para tener una mejor estadística. Con este paso obtenemos las imágenes previas al blanqueo  $F_0(r)$ . Luego para obtener las imágenes débilmente blanqueadas, usando objetivo de magnificación 10x exponemos brevemente ( $\sim 0.5$  s) la muestra a la luz de la lámpara bajo el mismo nivel de iluminación tenue  $/8x$ . Luego cambiamos el



objetivo de magnificación a 2x para captar las imágenes de la zona débilmente blanqueada. De igual forma, grabamos estas imágenes dentro de los primeros 1.5 s.

Ya en las imágenes, definimos la zona de interés, circular en este caso, e hicimos un cálculo de iluminación radial media dentro esta zona. Construimos cascarones circulares de espesor constante  $3.3 \mu\text{m}$  (distancia equivalente a 1 pixel en esta magnificación) e incrementando el radio interno en pasos diferenciales de  $3.3 \mu\text{m}$  hasta llegar al valor del radio de apertura  $R$ . Realizamos este proceso tanto para el conjunto de imágenes previas al blanqueo como posterior al blanqueo, promediando en las 15 a 23 imágenes de las que disponemos.

Luego, aplicando la ecuación 2.11 obtenemos el perfil de blanqueo normalizado  $i_b(r)$ . Por otro lado, obtener la forma del perfil de observación  $i_{ob}(r)$  resulta más sencillo, ya que en este caso la intensidad de luz que incide es tenue ( $/8x$ ), por lo que las diferencias de iluminación inherentes al perfil son más fáciles de detectar, ya que no existe fotoblanqueo. Por esto, el perfil de observación normalizado, para la misma región blanqueada, se obtiene directamente a partir de las imágenes de pre-blanqueo como:

$$i_{ob}(r) = \frac{F_0(r)}{F_0(0)}. \quad (2.12)$$

En la figura 2.12 se muestra el resultado obtenido para el caso de una zona de blanqueo de  $R = 1190 \mu\text{m}$ . Vemos que el perfil radial de blanqueo tiene una pequeña pendiente decreciente con el radio, produciéndose un notable decaimiento en las zonas próximas al borde. Esta *cola* que se observa ya cerca del borde del area de exposición al blanqueo tiene un ancho característico, repitiéndose para cualquier radio de apertura  $R$ . Esto se debe al efecto de difracción que ocurre cerca al borde del círculo de blanqueo, produciéndose un decaimiento rápido en la intensidad de la luz.

Así, usaremos estos perfiles experimentales de blanqueo (excitación) y de observación (emisión) en los radios que correspondan para el respectivo análisis y correcciones en los datos. La diferencia encontrada entre estos perfiles se explica por el hecho que para el proceso de fotoblanqueo, toda la extensión del perfil incide sobre la zona circular de interés; mientras que para la observación de la recuperación de fluorescencia únicamente una fracción del perfil incide sobre esta zona blanqueada. Esto se debe a que para el fotoblanqueo usamos un objetivo 10x, el cual enfoca toda la luz en la zona de blanqueo, mientras que para la observación posterior usamos un objetivo 2x, es decir, el campo de iluminación total crece en este caso, pero ya que la zona blanqueada se mantiene fija, solo debemos considerar la parte

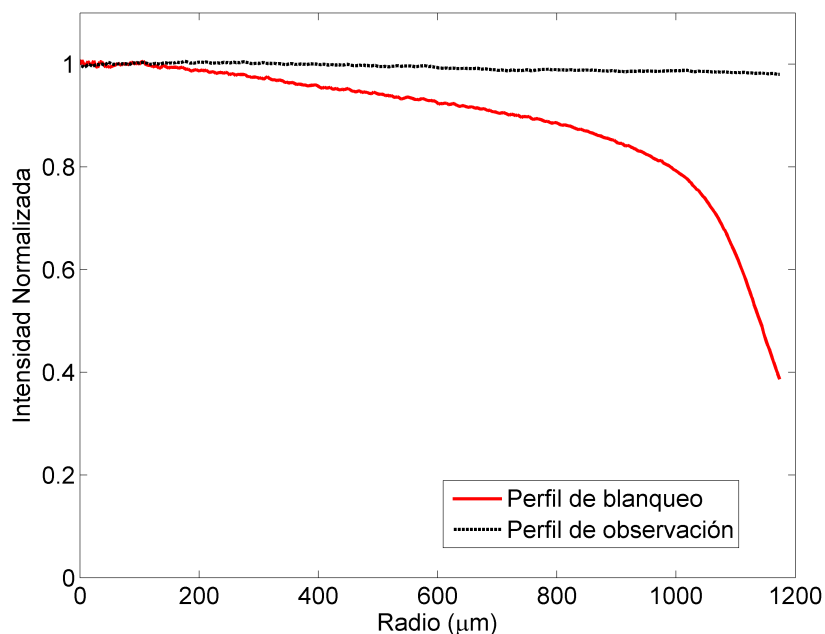


Figura 2.12: Perfiles de iluminación para blanqueo y observación

El perfil de iluminación para el fotoblanqueo disminuye con el radio a una pendiente pequeña, llegando a atenuarse a lo sumo el 20%, antes de llegar a una cola de ancho característico. Para el caso del perfil de observación podemos ver que varía muy poco en términos del radio.

del perfil que incide sobre esta zona, que correspondería a la quinta parte del perfil completo. Además el hecho de ampliar el campo de iluminación en la observación, desplaza la cola de difracción lejos de la zona blanqueada por lo que no tiene influencia sobre ésta. En todo caso, la región que corresponde al perfil de observación es bastante plano, pudiéndose inclusive considerarlo constante, sin embargo trabajamos con los datos experimentales obtenidos.

### 2.5.2. El blanqueo por observación

Otro efecto que ocurre en los experimentos FRAP es el blanqueo por observación dado que el solo hecho de iluminar la muestra ya causa un blanqueo que no necesariamente es requerido. Este efecto toma lugar en la etapa de recuperación de la fluorescencia cuando la lámpara es accionada para que la cámara pueda grabar las imágenes. El blanqueo por observación no solo afecta a la zona fotoblanqueada originalmente sino a todo el campo iluminado. Además, debemos notar que el perfil no homogéneo de iluminación causa que el blanqueo por observación no sea uniforme. Para minimizarlo tomamos dos medidas: reducir la

intensidad de la lámpara fluorescente en un factor de 8 respecto a la intensidad máxima en el proceso de captura de imágenes posterior al fotoblanqueo, e iluminar la muestra únicamente cuando la cámara toma las imágenes, es decir, mantener iluminada la muestra durante los primeros 90 s posterior al fotoblanqueo, para luego apagar y encender la lámpara cada 57 s por un intervalo de 3 s.

Aún con estas estrategias, tanto el blanqueo por observación como las inhomogeneidades del perfil de iluminación que afectan a las imágenes deben ser corregidos. Para realizar esta corrección, tomamos todo un conjunto de imágenes de la misma región de interés pero sin fotoblanquear, bajo las mismas condiciones de iluminación y protocolo de grabación usadas en el proceso del FRAP. A este conjunto de imágenes las llamaremos  $H(t)$  y las consideraremos matrices de dimensiones  $p = 768$  filas por  $q = 1280$  columnas, cuyos elementos de matriz  $h_{ij}(t) \in [0, 255]$  corresponden al nivel de gris para un tiempo  $t$  dado; donde  $i \in [1, 768]$  e  $j \in [1, 1280]$ . Con este conjunto  $H(t)$  podemos obtener factores que corrigen los efectos del iluminación. El método detallado para determinar estos factores se explican en la sección del tratamiento de datos 2.6.

### 2.5.3. El tiempo de fotoblanqueo

Otro detalle importante que debemos mencionar es el tiempo de fotoblanqueo. En nuestros experimentos realizamos el fotoblanqueo exponiendo la muestra a la luz intensa entre 3 s y 5 s. Este tiempo se puede considerar instantáneo ya que si consideramos aun el radio más pequeño de la zona expuesta al fotoblanqueo,  $r \approx 250 \mu\text{m}$ , y conociendo que el coeficiente de difusión de la fluoresceína es  $D \approx 4 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ , obtenemos que el tiempo característico de difusión es  $\tau = r^2/4D \approx 40 \text{ s}$ , tiempo que es un orden de magnitud más grande que el tiempo de fotoblanqueo. Por lo tanto, en el tiempo que dura el fotoblanqueo, la difusión es despreciable.

Además, una vez que se ha fotoblanqueado la zona de interés, existe un lapso de tiempo que transcurre durante el proceso de cambio de lente y disminución de la intensidad de luz, previo al inicio de la grabación de la recuperación de la fluorescencia. En este tiempo  $t_x$ , que típicamente es máximo 2 s, el proceso difusivo en la zona de interés no es grabado. Sin embargo, tomando en cuenta las mismas consideraciones anteriores, el incremento del radio de la zona blanqueada durante  $t_x$  es del orden  $\delta R \approx 10 \mu\text{m}$  siendo mucho menor que el radio de blanqueo. Por tal razón, el efecto del tiempo  $t_x$  en la difusión temprana ha sido despreciado,

sino que consideramos a la primera imagen posterior a  $t_x$  (cuando la intensidad de la luz fue reducida y la lente ya ha sido cambiada) como el inicio de la etapa de recuperación de la fluorescencia debida a la difusión.

## 2.6. Tratamiento de datos

Contando con las imágenes grabadas del FRAP y sus correspondientes archivos de tiempos, procedemos al tratamiento de los mismos. Consideramos las imágenes como matrices  $L(t)$  de dimensiones  $p = 768$  filas por  $q = 1280$  columnas, cuyos elementos de matriz  $l_{ij}(t) \in [0, 255]$  corresponden al nivel de gris para un tiempo  $t$  dado; donde  $i \in [1, 768]$  e  $j \in [1, 1280]$ . Lo que nos interesa es el nivel de gris promedio. Primeramente, aprovechando la gran diferencia inicial de fluorescencia que presenta la zona fotoblanqueada respecto al resto, definimos la zona de interés creando una máscara binaria (blanco=1 y negro=0) de la zona blanqueada  $M$  y de la que queda por fuera, es decir, una máscara complementaria  $N$  (figura 2.13), ambas matrices teniendo las mismas dimensiones que las imágenes originales. Aplicamos estas máscaras a las imágenes  $L(t)$  mediante un producto definido por:

$$[L(t) * M] = l_{ij}(t) \times m_{ij} \quad \forall i, j, \quad (2.13a)$$

$$[L(t) * N] = l_{ij}(t) \times n_{ij} \quad \forall i, j, \quad (2.13b)$$

donde  $m_{ij}$  y  $n_{ij}$  son los elementos de las matrices  $M$  y  $N$ . Luego para obtener el nivel promedio de nivel de gris la zona blanqueada y complementaria aplicamos respectivamente:

$$F_{in}(t) = \frac{\sum_{ij} [L(t) * M]_{ij}}{\sum_{ij} m_{ij}}, \quad (2.14a)$$

$$F_{out}(t) = \frac{\sum_{ij} [L(t) * N]_{ij}}{\sum_{ij} n_{ij}}. \quad (2.14b)$$

En condiciones ideales, la curva de recuperación de fluorescencia (nivel de gris) de la zona de fotoblanqueo debería ser estrictamente creciente debido al proceso de transporte difusivo de moléculas desde el exterior. Sin embargo, debido al blanqueo por observación en el proceso de la toma de imágenes, la curva de recuperación de fluorescencia de la zona blanqueada no es tal. En realidad, observamos que la recuperación es creciente durante un cierto tiempo hasta que el blanqueo por observación causa que la fluorescencia decaiga a medida que es

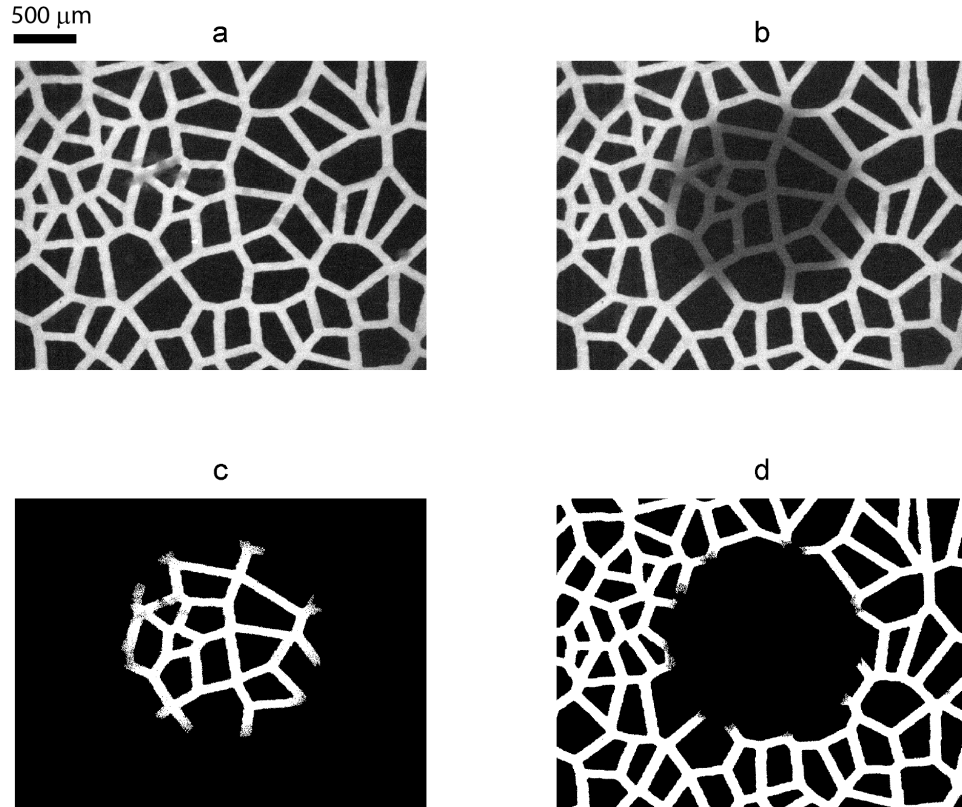


Figura 2.13: Máscaras de blanqueo y complementarias

A partir de la imagen pre-fotoblanqueo (a) y de la primera imagen posterior al fotoblanqueo (b), podemos definir una máscara binaria para la zona blanqueada (c), y de la zona complementaria (d). Esto con el posterior propósito de comparar el nivel de gris entre estas dos zonas en el transcurso del tiempo.

expuesta a la luz como lo vemos en la figura 2.14. Respecto a la variación de fluorescencia de la zona complementaria, ésta debe ser decreciente en el tiempo debido a la difusión de las moléculas de fluoresceína desde la zona blanqueada hacia la zona complementaria. Pero además este decaimiento de la fluorescencia en esta zona también se ve reforzado por el blanqueo por observación mencionado ya antes, por lo que la curva de evolución de la zona complementaria mostrada la figura 2.14 incluye los dos efectos.

Ya que el propósito es comparar los niveles de fluorescencia entre la zona blanqueada con la zona complementaria, y debido a que el perfil de iluminación no es homogéneo lo que a su vez causa que el blanqueo por observación sea diferente entre las dos zonas, no sería correcto simplemente obtener la fracción de recuperación como  $F_{in}(t)/F_{out}(t)$ . Lo que necesitamos

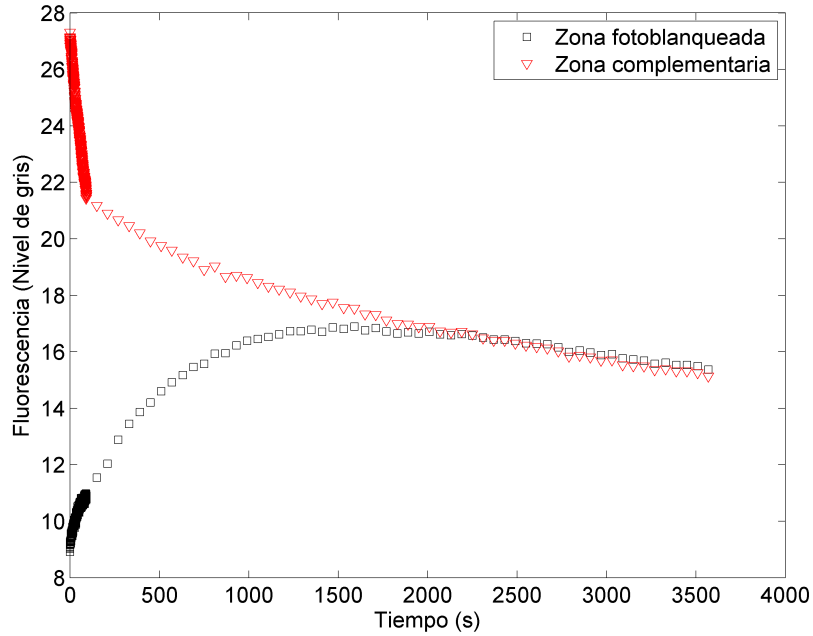


Figura 2.14: Fluorescencia vs. tiempo

El efecto de blanqueo en la etapa de observación en la toma de imágenes atenúa la fluorescencia de las zonas expuestas. En el caso de la zona blanqueada se observa como el nivel de fluorescencia crece en las etapas tempranas, mientras que a tiempos largos el blanqueo hace decaer esta recuperación. La evolución de la fluorescencia de la zona complementaria es decreciente debido al proceso de difusión de las moléculas fotoblanqueadas y reforzada por el blanqueo por observación.

entonces es corregir estos efectos, lo cual lo hacemos introduciendo factores de corrección para cada instante tiempo. Para esto usamos las imágenes de referencia no fotoblanqueadas  $H(t)$  mencionadas en la subsección 2.5.2.

Similarmente a lo descrito para el conjunto de imágenes  $L(t)$  del FRAP, aplicamos las máscaras  $M$  y  $N$  al conjunto  $H(t)$ , que una vez más las consideramos como matrices de dimensiones  $768 \times 1280$ :

$$[H(t) * M] = h_{ij}(t) \times m_{ij} \quad \forall i, j, \quad (2.15a)$$

$$[H(t) * N] = h_{ij}(t) \times n_{ij} \quad \forall i, j, \quad (2.15b)$$

siendo  $h_{ij}(t)$  los elementos de matriz de  $H(t)$ . Ahora procedemos a obtener los valores de fluorescencia media de la zona blanqueada y complementaria respectivamente, en ausencia

del fotoblanqueo (intencional):

$$H_{in}(t) = \frac{\sum_{ij}[H(t) * M]_{ij}}{\sum_{ij} m_{ij}}, \quad (2.16a)$$

$$H_{out}(t) = \frac{\sum_{ij}[H(t) * N]_{ij}}{\sum_{ij} n_{ij}}, \quad (2.16b)$$

con lo que podemos comparar finalmente estos valores que corresponden a la diferencia de fluorescencia entre las dos zonas mencionadas:

$$\beta(t) = \frac{H_{in}(t)}{H_{out}(t)}. \quad (2.17)$$

Estos son los factores de corrección que introducimos para relacionar de manera correcta la recuperación de fluorescencia en el FRAP. Así, la fracción recuperada por difusión de la zona blanqueada respecto a la zona complementaria es:

$$frac(t) = \frac{1}{\beta(t)} \times \frac{F_{in}(t)}{F_{out}(t)}. \quad (2.18)$$

Debido a que el fotoblanqueo en la zona de interés no es total, es decir, no todas las partículas de fluoresceína dejan de ser fluorescentes, la fracción definida en la ecuación 2.18 parte de un valor distinto de cero, y va aumentando hasta saturar al valor de 1, ya que el transporte por difusión entre la zona blanqueada y la complementaria provoca que se alcance finalmente un estado de concentración uniforme entre las dos zonas a tiempos suficientemente grandes. Adicionalmente, por el modelo matemático que empleamos para describir el FRAP, normalizamos esta fracción entre un valor inicial nulo y valor final 1 a tiempos muy grandes, es decir:

$$f(t) = \frac{frac(t) - frac(0)}{frac(\infty) - frac(0)}, \quad (2.19)$$

con  $frac(\infty) \rightarrow 1$ .

Como ejemplo, en la figura 2.15 observamos que la curva de  $frac(t)$  parte originalmente alrededor de 0.3, lo que significa que alrededor del 70% de la fluorescencia fue reducida por el proceso del fotoblanqueo. Por supuesto, a tiempos grandes la relación entre la fluorescencia entre las dos zonas crece monótonamente hasta llegar a ser idealmente 1. En la misma figura, vemos la curva de la fracción normalizada correspondiente  $f(t)$ , calculada a partir de

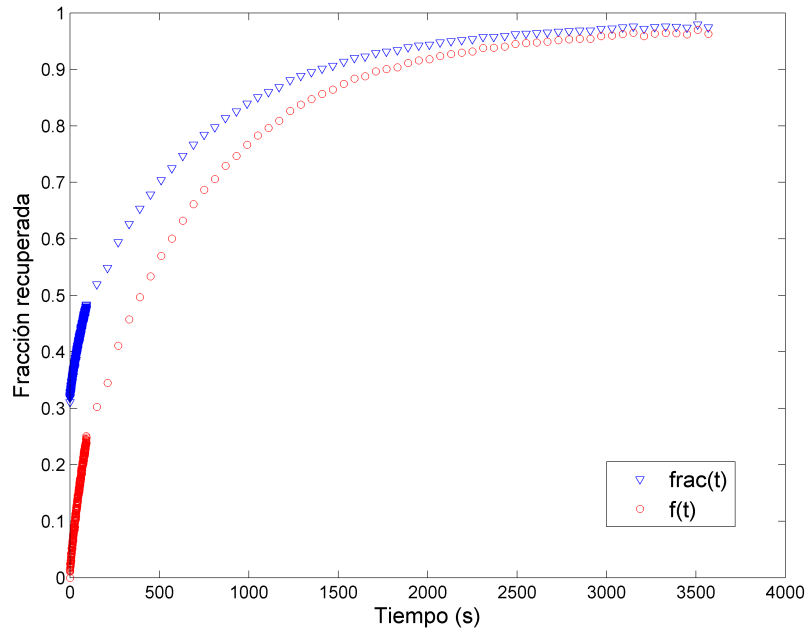


Figura 2.15: Recuperación de la fluorescencia después del blanqueo

A pesar del efecto del blanqueo por observación, éste se cancela al comparar el nivel de fluorescencia entre las zonas blanqueada y complementaria. Observamos una recuperación creciente en el tiempo. En la leyenda de la figura,  $frac(t)$  es la fracción recuperada calculada según la ecuación 2.18, mientras que  $f(t)$  es la fracción normalizada obtenida según la expresión 2.19.

la ecuación 2.19, la cual representa la recuperación de la fluorescencia típica para un experimento FRAP. El tiempo de recuperación característico está determinado por el coeficiente de difusión de la fluoresceína, además del tamaño y geometría de la zona blanqueada, en lo cual nos enfocamos en este trabajo. Así, apoyándonos en esta curva, y mediante la herramienta numérica que se describe a continuación, podemos obtener el tiempo característico de recuperación y el coeficiente de difusión de los experimentos FRAP en las diferentes configuraciones experimentales que se describirán más adelante.

## 2.7. Aproximación numérica del modelo teórico

En el presente apartado detallamos la aproximación numérica del modelo teórico descrito en la sección 1.8. Esta aproximación nos permitirá realizar el análisis de la curva experimental de recuperación de la fluorescencia tomando en cuenta los perfiles de blanqueo y observación



medidos, con lo que finalmente seremos capaces de estimar los parámetros difusivos de los experimentos efectuados.

De acuerdo a lo mencionado en la última parte sección 1.8, el perfil de blanqueo  $I_b(r)$  y observación  $I_{ob}(r)$ , además del coeficiente de difusión  $D$ , tienen un efecto crucial en la forma de recuperación de la fluorescencia. Estos perfiles de iluminación vienen determinados por las características propias de los instrumentos utilizados y pueden ser medidos en forma experimental como se ha mostrado ya (sección 2.5.1). Sin embargo, luego, las curvas de estos perfiles experimentales deberían ser expresados en forma analítica con el propósito de utilizar la ecuación general 1.66 de recuperación de la fluorescencia. Aunque sería posible ajustar expresiones analíticas que describan adecuadamente a estos perfiles experimentales para cada caso, existe otra posibilidad de análisis válida para cualquier perfil discreto, esto es, la discretización.

El objetivo es obtener una aproximación numérica de la integral 1.66 con el fin de que sea susceptible de aplicación al caso de tener perfiles experimentales discretos de iluminación. Para tal propósito, es conveniente realizar una adimensionalización de las expresiones correspondientes. Así definiendo los parámetros adimensionales:

$$r^* = r/R, \quad (2.20a)$$

$$k^* = Rk, \quad (2.20b)$$

e introduciéndolos en 1.63, tenemos que:

$$\phi_2(k) = 2\pi R^2 \int_0^1 I_{ob}(Rr^*) J_0(k^*r^*) r^* dr^*. \quad (2.21)$$

De la misma forma, la integral 1.62 puede ser escrita como:

$$T_G(k) = R^2 \int_0^1 J_0(k^*(r^*)') \exp(-Gi_b[R(r^*)']) (r^*)' d(r^*)', \quad (2.22)$$

mientras que 1.65 queda expresada según:

$$F(t) = \frac{2\pi q R^4 C_0}{A} \left( \int_0^\infty \phi_2(k^*) [k^* T_G(k^*) - J_1(k^*)] \exp\left(-\frac{(k^*)^2 Dt}{R^2}\right) dk^* + \phi_2(0) \right), \quad (2.23)$$

siendo

$$T_G(k^*) = \int_0^1 J_0(k^*(r^*)') \exp(-Gi_b[R(r^*)']) (r^*)' d(r^*)', \quad (2.24)$$

y

$$\phi_2(k^*) = 2\pi \int_0^1 I_{ob}(Rr^*) J_0(k^*r^*) r^* dr^*. \quad (2.25)$$

Así, finalmente la fluorescencia neta fraccional es:

$$f(t) = 1 - \frac{\int_0^\infty \phi_2(k^*) [k^* T_G(k^*) - J_1(k^*)] \exp(-t/4\tau) dk^*}{\int_0^\infty \phi_2(k^*) [k^* T_G(k^*) - J_1(k^*)] dk^*}. \quad (2.26)$$

Ahora efectuando una discretización en la integral en estas tres últimas expresiones tenemos:

$$T_G(k^*)_{disc} = \sum_{p=0}^n J_0(k^*r_p^*) \exp(-G i_b [R(r_p^*)']) (r_p^*)' \Delta(r^*)', \quad (2.27)$$

$$\phi_2(k^*)_{disc} = 2\pi \sum_{p=0}^n I_{ob}(Rr_p^*) J_0(k^*r_p^*) r_p^* \Delta r^*, \quad (2.28)$$

$$f(t)_{disc} = 1 - \frac{\sum_{q=0}^m \phi_2(k_q^*) [k_q^* T_G(k_q^*)_{disc} - J_1(k_q^*)] \exp(-t/4\tau) \Delta k^*}{\sum_{q=0}^m \phi_2(k_q^*) [k_q^* T_G(k_q^*)_{disc} - J_1(k_q^*)] \Delta k^*}, \quad (2.29)$$

con  $\Delta r^* = 1/n$  y  $r_p^* = p\Delta r^*$ . Por motivos prácticos de cálculo, en la suma de la ecuación 2.29, hemos acotado hasta un valor máximo de  $k_m$ , con lo que  $\Delta k^* = k_m/m$  y  $k_q^* = q\Delta k^*$ .

Las ecuaciones 2.27, 2.28 y 2.29 son las expresiones que usaremos para realizar los ajustes de las curvas experimentales de recuperación  $f(t)_{exp}$  vs  $t$ . Vemos que para ello necesitamos conocer los perfiles de iluminación para el blanqueo y la observación en forma discreta. En este conjunto de ecuaciones, por lo tanto, tenemos dos parámetros de ajuste:  $G$ , que nos da la cantidad de blanqueo producido inicialmente, y  $\tau = R^2/4D$  que nos da la información de las propiedades difusivas de la especie en análisis. El ajuste lo efectuamos mediante la minimización de los errores cuadráticos  $(f(t)_{exp} - f(t)_{disc})^2$ , para lo cual se desarrolló un código computacional.

En la figura 2.16 mostramos el error relativo  $\mathcal{E} = (f(t)_{disc} - f(t))/f(t)$  entre la aproximación discreta 2.29 y la solución exacta 1.67 que corresponde al caso de perfiles homogéneos de blanqueo y observación. La aproximación numérica se realizó con  $n = 100$ ,  $k_m = 50$  y  $m = 500$ . Podemos apreciar que como  $\mathcal{E} \leq 0$ ,  $f_{disc}(t)$  subestima el valor teórico  $f(t)$ . Para tiempos muy cortos el error es  $\sim 10\%$ , pero rápidamente decae tal que para  $t \sim \tau$  ya es de

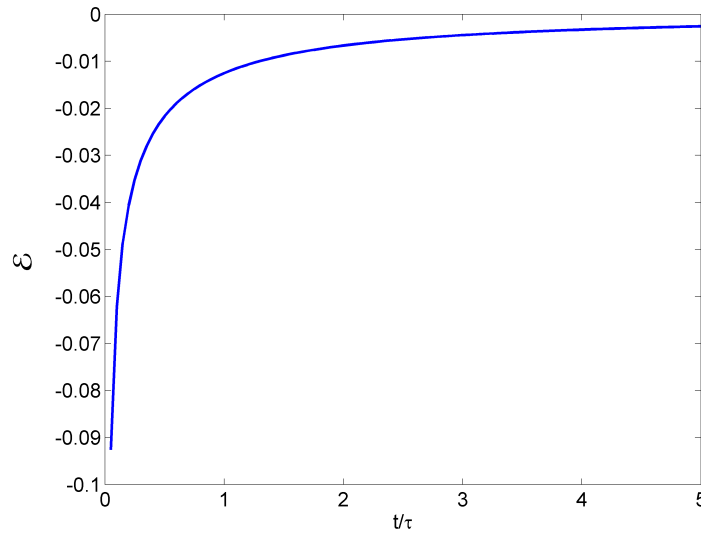


Figura 2.16: Error relativo  $\mathcal{E}$  vs tiempo normalizado  $t/\tau$

El error decae rápidamente con el tiempo, siendo menor al 2% ya en tiempos  $t \sim \tau$ . Los valores negativos de  $\mathcal{E}$  nos indican una subestimación de la aproximación discreta de  $f(t)$  respecto al valor teórico.

menos del 2% y para tiempos más grandes el error es casi nulo. Respecto a la bondad del ajuste de la aproximación discreta, se obtuvo que el coeficiente de difusión correspondiente a esta aproximación  $D_{disc} = 0.974D_{teo}$ , donde  $D_{teo}$  es el valor teórico. Por lo tanto, el error relativo, que esta aproximación proporciona en el ajuste de  $D$ , es una subestimación del  $-2.6\%$ .

## 2.8. Experimentos con flujo oscilatorio

Ya que uno de los objetivos de esta tesis es determinar el comportamiento de la difusión en las redes microfluídicas descritas bajo la acción de un flujo oscilatorio de promedio nulo mientras se produce la recuperación de la fluorescencia, continuamos con la descripción del procedimiento para este caso.

Para llevar a cabo estos experimentos, el flujo oscilatorio periódico fue generado usando una bomba de jeringa modelo Legato 180 (KDScientific), la cual permite ser programada para fases de flujo en inyección y en succión alternadamente. Los parámetros de control en la bomba fueron el caudal  $Q$  y el volumen de inyección/succión  $V$ ; con lo que queda

determinado, en primera instancia, el tiempo de inyección/succión.

Sin embargo, antes de realizar los experimentos FRAP bajo la influencia del flujo oscilatorio, se requiere una calibración previa que relacione el valor programado de volumen nominal a ser inyectado/succionado por la bomba con el periodo y la amplitud del desplazamiento del fluido durante el ciclo. Esto es necesario debido a que nuestro punto de interés es caracterizar la difusión en términos de la amplitud de la oscilación  $x$ , y no del volumen  $V$ .

Adicionalmente, existen factores propios de la disposición experimental usada que influyen en la relación entre  $x$  y  $V$ . Uno de estos factores es que la respuesta del fluido al flujo de inyección/succión no es instantánea ya que la bomba ocupa un intervalo de tiempo de transición entre inyección y succión. Así mismo, debemos recordar que las mangueras que conectan las jeringas con las entradas y salidas de chip microfluídico, son elásticas. Así que al introducir el flujo externo, los efectos elásticos en las mangueras (dilatación y/o contracción) hacen que la respuesta en el fluido que esta la red se vea afectada. En los experimentos de prueba pudimos observar que cuando trabajamos en regímenes en los que el tiempo de inyección/succión eran 1 s o menos, la respuesta del fluido era básicamente nula consecuencia de los efectos que acabamos de describir.

Para efectuar la calibración, escogimos una única red de microcanales, en este caso con longitud media de arista  $\langle L \rangle = 198 \mu\text{m}$  y ancho de canal  $w = 80.2 \mu\text{m}$ . Además, la red fue llenada con un solución acuosa de partículas fluorescentes con el propósito de realizar un seguimiento de ellas y así poder realizar la medición del periodo  $T$  y la amplitud de la oscilación  $x$ . Trabajamos con un caudal de inyección/succión fijo  $Q = 50 \text{ nL/s}$  y variamos el parámetro programable volumen inyectado/succionado  $V$  y con ello observamos la respuesta del fluido.

Bajo este protocolo tomamos imágenes de una porción de los microcanales para observar la trayectoria oscilatoria de las partículas fluorescentes de acuerdo a las fases de inyección y succión del flujo; la velocidad de adquisición fue de 15 Hz. Contando ya con las imágenes para cada valor de  $V$ , realizamos el seguimiento de varias partículas midiendo la longitud recorrida  $x$  en la fase de inyección y succión. Para la determinación de periodo  $T$  solamente nos fijamos en el número de imágenes que existen entre que la partícula parte de un extremo y llega al otro. Los resultados de la calibración se recogen en la tabla 2.2, en donde además incluimos el valor teórico del periodo, calculado como  $T_t = 2V/Q$ .

$V(nL)$	$T(s)$	$T_t(s)$	$x(\mu m)$
100	4.35	4.0	52.18
125	5.04	5.0	120.39
150	6.10	6.0	189.30
162.5	6.40	6.5	342.48
175	7.06	7.0	486.08
187.5	7.50	7.5	721.86
200	8.02	8.0	927.07
212.5	8.56	8.5	1109.57
225	9.24	9.5	1254.31
250	9.70	10.0	1510.21

Tabla 2.2: Calibración de respuesta del fluido en el periodo  $T$  y la amplitud  $x$  de oscilación respecto al parámetro de control volumen inyectado/succionado  $V$

En la medición de la amplitud de oscilación, se debe hacer notar que las partículas tuvieron una dirección preferencial de movimiento por los canales que mostraban mayor paralelismo con el gradiente de presión existente. En la figura 2.17, la flecha indica la dirección neta del gradiente de presión. En A, donde el canal es transversal a este gradiente, vemos que las trazas de las partículas son menores que en B, donde la trayectoria tiene mayor componente paralela. Esto nos muestra que en B las partículas tienen mayor velocidad que en A, siendo la primera dirección mencionada sobre la cual medimos la amplitud. Debemos recordar que existe una sola entrada de flujo y una sola salida lo que determina la dirección preferencial.

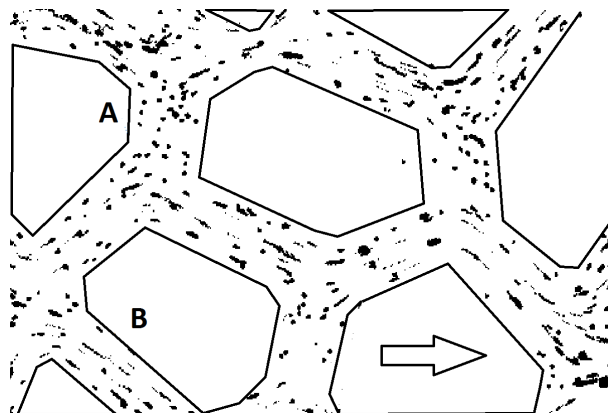


Figura 2.17: Trazas de las partículas fluorescentes sometidas a flujo en el microcanal

Vemos la diferencia de longitud de la trazas entre A y B, lo que nos indica una dirección favorable de movimiento coincidente con la dirección de la diferencia de presión, mostrada por la flecha en la figura.

La curva de calibración, figura 2.18, muestra un comportamiento aproximadamente lineal a partir de  $V = 150$  nL, para volúmenes de inyección/succión menores, la respuesta del flujo es más débil. Por debajo de  $V = 100$  nL, no se obtuvo respuesta del fluido.

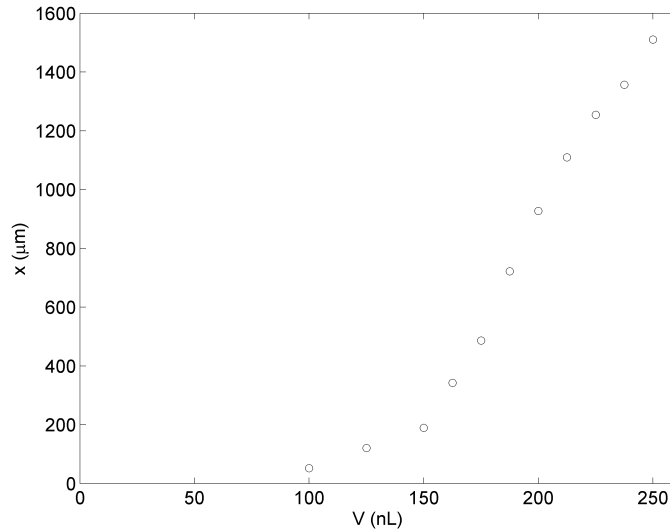


Figura 2.18: Curva de calibración entre el volumen inyectado/succionado  $V$  y la amplitud de oscilación  $x$

Esta calibración  $x$  vs  $V$  corresponde al caso específico en que usamos la red microfluídica con longitud media de arista  $\langle L \rangle = 198 \mu\text{m}$  y ancho de canal  $w = 80.2 \mu\text{m}$ . Para redes con otros parámetros se debería obtener una nueva calibración.

Una vez obtenida la calibración entre el parámetro de control  $V$  y la respuesta  $x$ , podemos realizar el experimento FRAP bajo esta nueva condición. Para ello, escogemos la misma red microfluídica para la cual fue obtenida la calibración. En esta red, ya llena de fluoresceína, realizamos el fotoblanqueo de la zona escogida para el análisis, sin introducir el flujo externo todavía. Los parámetros de iluminación y procedimiento de blanqueo son los mismos que los empleados para los experimentos FRAP y que están descritos en la sección 2.4. Ahora, sin embargo, luego de haber fotoblanqueado la zona en cuestión, inmediatamente procedemos a activar el flujo oscilatorio deseado. Este flujo oscilatorio causará que la zona blanqueada realice un cierto movimiento periódico, lo que podría tener efectos en la rapidez de difusión. Precisamente esta es la pregunta que tratamos de responder con estos experimentos.

Siguiendo con la descripción, una vez que el flujo periódico ha sido activado, grabamos la recuperación de la fluorescencia, teniendo en cuenta básicamente el mismo hecho ya mencionado en la sección 2.4. Esto es, grabamos continuamente durante los primeros 90 s posterior

al fotoblanqueo para captar la rápida evolución de la recuperación en estos instantes, y luego realizamos mediciones intermitentes alrededor de cada minuto, para reducir el blanqueo por observación.

Una diferencia que debemos mencionar es que la duración de las etapas intermitentes de grabación fueron de un periodo de oscilación  $T$ , de acuerdo al volumen  $V$  usado, tabla 2.2; mientras que para el caso de los experimentos FRAP sin el flujo habíamos fijado la duración de las etapas intermitentes en 3 s. La razón de fijar en un periodo  $T$  la duración de la grabación intermitente se debe a que en este intervalo de tiempo estamos seguros que la zona fotoblanqueada efectúa un ciclo completo y que, por lo tanto, en algún instante dentro de este intervalo  $T$ , se encuentra en la posición original en que fue blanqueada. Para un conjunto de imágenes tomadas bajo estas condiciones (movimiento de la zona blanqueada durante un periodo), nos resulta fácil ubicar la imagen en que la zona blanqueada coincide con la región de blanqueo original, esta imagen es la que menor nivel de gris promedio tenga dentro de la zona de interés especificada, definida como una máscara inicial en donde se realizó el fotoblanqueo (figura 2.19).

La extensión temporal de este proceso de grabación depende del valor de  $V$  (o  $x$ , de acuerdo a la calibración) usado, extendiéndose desde los 20 minutos hasta llegar a 1 hora de duración, ya que, adelantándonos a los resultados, observamos que la difusión se ve afectada con la variación de  $x$ , con lo que alcanzamos el equilibrio a mayor o menor tiempo de exposición al flujo.

De igual forma que para los experimentos FRAP sin el flujo, tomamos un conjunto de imágenes de referencia de la misma región de interés pero sin efectuar el fotoblanqueo, aunque sí bajo la acción del flujo oscilatorio correspondiente, con el fin de efectuar las correcciones debido al perfil no homogéneo de iluminación y al blanqueo por observación (sección 2.5).

Con las imágenes del FRAP bajo el flujo oscilatorio y las imágenes de referencia respectivas, continuamos con el tratamiento de ellas para obtener la curva de recuperación de fluorescencia. El método es muy similar al aplicado a los experimentos FRAP sin flujo, descrito en la sección 2.6. Es decir, primero obtenemos las máscaras de la zona blanqueada y complementaria a partir de las imágenes pre-blanqueo y primera post-blanqueo (figura 2.13),  $M$  y  $N$  respectivamente. Luego, éstas son aplicadas a las imágenes del FRAP, según las ecuaciones 2.13. Se obtiene el nivel medio de gris promediando en la zona blanqueada y complementaria usando las ecuaciones 2.14.

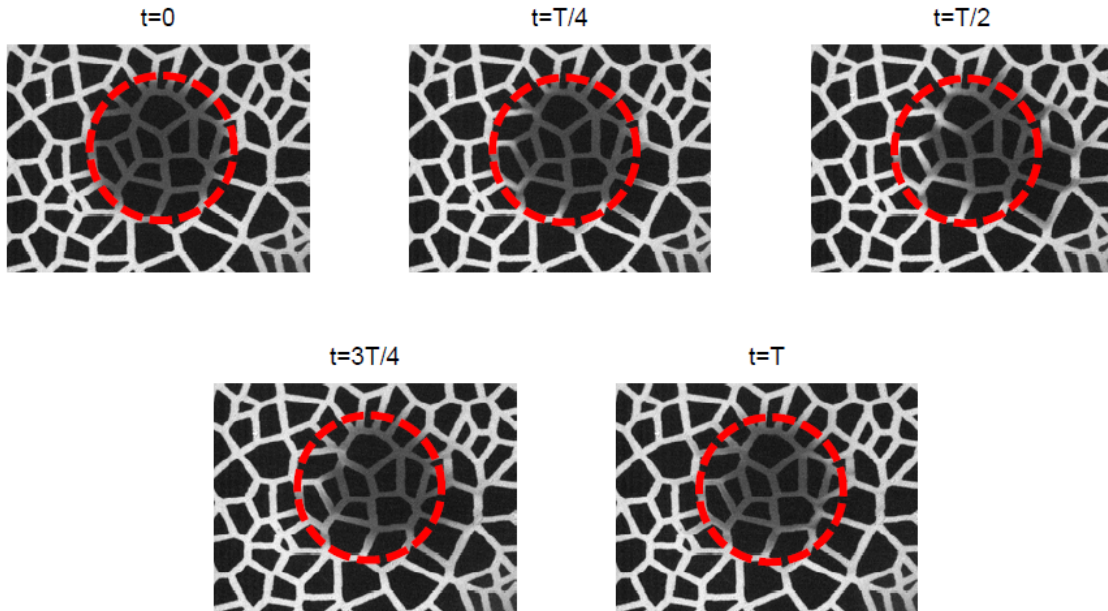


Figura 2.19: Movimiento periódico de la zona blanqueada debido a la acción de un flujo oscilante.

Dentro de un periodo de oscilación  $T$ , la zona blanqueada va a pasar por la región original del blanqueo, mostrado aquí como el círculo en línea de puntos para motivos explicativos. Cuando la zona blanqueada coincide con esta máscara, el nivel de gris es mínimo, lo que nos dice que ha llegado al sitio original del blanqueo. La etapa de grabación intermitente no la tomamos en fase con el ciclo de oscilación de la zona fotoblanqueada, debido a que existió un tiempo de tolerancia finito de respuesta de la bomba en cada ciclo. Las imágenes corresponden a la oscilación producida por un flujo de 50 nL/s con un volumen de inyección/succión de 200 nL.

Los factores de corrección por el perfil no homogéneo y al blanqueo por observación, se calculan de manera similar que el caso sin flujo, mediante las fórmulas 2.15, 2.16 y 2.17. Con esto calculamos la fracción recuperada normalizada, que aquí renombramos como  $f_T(t)$ , mediante las ecuaciones 2.18 y 2.19, es decir:

$$f_T(t) = \frac{frac(t) - frac(0)}{frac(\infty) - frac(0)} \quad (2.30)$$

En este punto, la curva de recuperación mostrará las oscilaciones de la zona blanqueada debido a su movimiento provocado por el flujo periódico. Para las fase grabada en etapa continua, los primeros  $t_c = 90$  s de recuperación de fluorescencia, estas oscilaciones son consecutivas, como lo vemos en la figura 2.20. Para la fase de grabación intermitente aparece solo una oscilación de periodo  $T$  cada minuto.



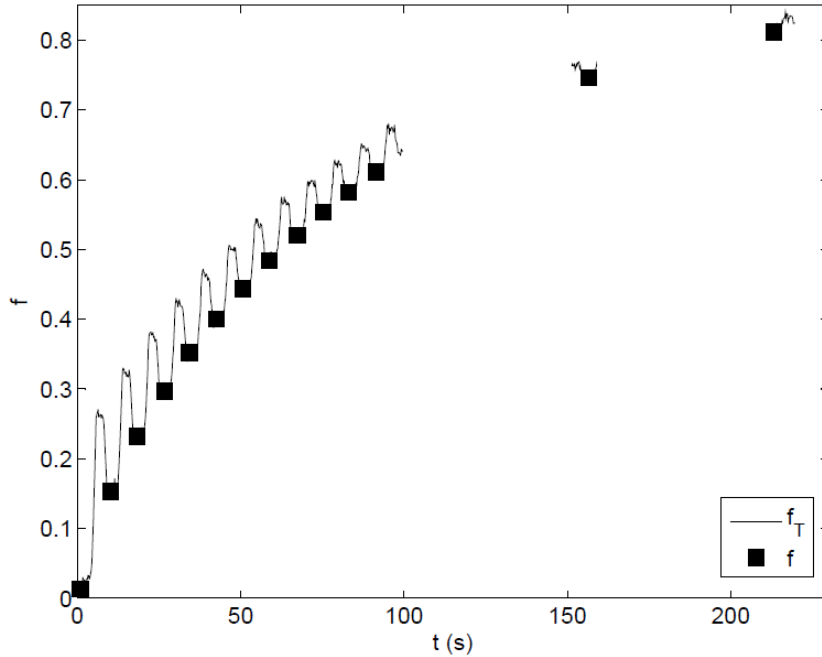


Figura 2.20: Curva de recuperación de fluorescencia bajo la acción de un flujo oscilatorio

Originalmente generamos la curva de recuperación  $f_T$  en la que observamos las oscilaciones provocadas por el flujo periódico. Luego efectuamos un procedimiento de filtrado para obtener los puntos representativos  $f$  de los valles de cada oscilación. En la etapa de medición continua las oscilaciones son consecutivas, mientras que en la etapa intermitente los ciclos están separados. La curva corresponde a un flujo de 50 nL/s con período de oscilación  $T = 8.02$  s

El propósito, sin embargo, es apreciar la evolución con la zona blanqueada en los instantes en que ésta regresa a la posición original en que fue blanqueada luego de haber cumplido cada ciclo. Como ya se mencionó en párrafos anteriores, la zona blanqueada llega al punto inicial de blanqueo cuando el nivel de gris es mínimo (más oscura) dentro de la máscara inicial, para un periodo  $T$ . Así, para aplicar este criterio en la etapa continua de la curva de recuperación, encontramos el número de oscilaciones efectuadas como  $n = t_c/T$ . Con este fraccionamiento podemos establecer claramente los límites temporales inferior  $t_{k-1}$  y superior  $t_k$  del  $k$ -ésimo ciclo como:

$$t_k = kT \quad \text{para} \quad k = 1, \dots, [n] \quad (2.31)$$

Siendo  $[n]$  la parte entera de  $n$ , y tomamos  $t_0 = 0$ . Luego, identificamos los valores de  $f_T(t)$  que están relacionados con los tiempos dentro de cada uno de los ciclos, generando los

$n$  subconjuntos  $f_{T_k}(t)$ , según:

$$f_{T_k}(t) = f_T(t), \quad t \in [t_{k-1}, t_k[ \quad (2.32)$$

Luego, para cada uno de estos ciclos se extrae los 9 valores menores de  $f_T$ , lo cual hacemos para tener una mejor estadística. Así, obtenemos los subconjuntos  $f_{T_k}^m(t)$  mas pequeños:

$$f_{T_k}^m(t) = \underset{9}{\text{mín}}\{f_{T_k}(t)\} \quad (2.33)$$

donde  $\underset{n}{\text{mín}}\{A\}$  significa los  $n$  valores mínimos del conjunto  $A$ .

Cabe aclarar que al tomar los 9 valores más pequeños no estamos cometiendo un error apreciable debido al movimiento de la zona blanqueada, ya que este punto corresponde a un extremo de la oscilación, donde la velocidad es pequeña. Complementariamente, existe un tiempo de respuesta finito ( $< 1$  s) cuando la bomba de jeringa pasa del modo de inyección a succión o viceversa, en donde el fluido tampoco ofrece respuesta, estando prácticamente quieto en este punto del ciclo.

Volviendo al procedimiento, con los conjuntos  $f_{T_k}^m(t)$  obtenemos un promedio de cada uno de ellos, que será el valor representativo del valle de la  $k$ -ésima oscilación:

$$f_k(t) = \frac{\sum_i \{f_{T_k}^m(t)\}_i}{9}, \quad i = 1, \dots, 9 \quad (2.34)$$

Complementariamente, obtenemos un valor promedio  $t_k$  para el tiempo de cada valle de la oscilación. Con esto tenemos los pares  $\{t_k, f_k\}$ . Finalmente, formamos los vectores de  $f(t)$  y  $t$ :

$$f(t) = \{f_1, f_2, \dots, f_n\} \quad \text{y} \quad t = \{t_1, t_2, \dots, t_n\} \quad \text{con} \quad k = 1, \dots, n \quad (2.35)$$

los cuales serán los datos que usaremos para efectuar el análisis de resultados de estos experimentos. En la figura 2.20 vemos tanto la curva original  $f_T$  con las oscilaciones debido al flujo, así como también los puntos de  $f$  obtenidos con el método descrito y que se ubican en los valles, instantes en que la zona blanqueada llega al punto de origen. Para mayor claridad se ha mostrado en mayor detalle la etapa de medición continua, aunque también podemos observar los 2 primeros puntos que corresponden a la etapa intermitente.

# Capítulo 3

## Resultados

En este capítulo iniciamos con la determinación del coeficiente absoluto de difusión para la fluoresceína mediante un FRAP en un espacio bidimensional homogéneo, resultado que nos servirá como validación del método usado y como valor de referencia frente a las demás condiciones experimentales que se mencionan más adelante. Continuamos después con el análisis del comportamiento de la difusión a nivel de la micro-geometría de las redes de canales, introducimos aquí la variable número de *alimentadores* para esta descripción. Posteriormente mostramos los resultados obtenidos ya con las redes de microcanales diseñados variando algunos parámetros geométricos (mesoescala) y realizamos la comparación del coeficiente de difusión efectivo con referencia al caso homogéneo. Finalmente, estudiamos la acción de introducir un flujo oscilante de promedio nulo y cómo afecta esto a la difusión para una determinada geometría.

### 3.1. Determinación del coeficiente absoluto de difusión

Para iniciar nuestro análisis, primeramente necesitamos determinar el coeficiente de difusión molecular de la fluoresceína  $D_0$ , con el propósito de validar las herramientas experimentales aquí utilizadas, además de servir como valor de referencia para las siguientes configuraciones.

Con tal fin, nos valemos del caso conocido de la difusión en una geometría bidimensional isótropa y homogénea, idealmente infinita. Usamos un chip microfluídico diseñado a manera

de un reservorio de 1.5 cm de largo, 1.0 cm de ancho y altura nominal de 50  $\mu\text{m}$ . La zona fotoblanqueada es circular.

Trabajamos con dos radios de fotoblanqueo:  $R_1 = 468 \mu\text{m}$  y  $R_2 = 790 \mu\text{m}$ ; y dos intensidades de luz de observación suministrada por la lámpara:  $/8x$  y  $/4x$  (la octava y la cuarta parte de la máxima intensidad respectivamente), con el fin de comprobar la independencia de  $D_0$  respecto a estas variables experimentales. Así mismo, usamos los perfiles de iluminación obtenidos según el procedimiento descrito en la sección 2.5.1 para los radios mencionados.

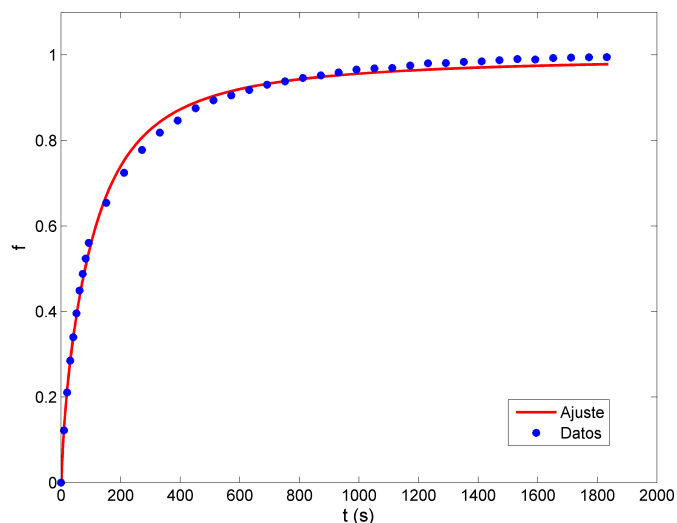


Figura 3.1: Datos de la curva de recuperación y su ajuste. Espacio bidimensional homogéneo. Radio circular de fotoblanqueo  $R_1 = 468 \mu\text{m}$ , a intensidad de observación  $/4x$

En la figura 3.1, vemos los datos obtenidos para la curva de recuperación de fluorescencia y su correspondiente ajuste para el caso  $R = R_1$  a intensidad de luz de observación  $/4x$ . El ajuste lo realizamos usando el procedimiento numérico usado en la sección 2.7. Los valores para el coeficiente de difusión  $D_0$ , calculados partir de  $D_0 = R^2/4\tau_0$  se resumen en la siguiente tabla:

	$R_1$	$R_2$
Iluminación $/4x$	4.62	6.05
Iluminación $/8x$	3.69	4.16

Tabla 3.1: Coeficiente de difusión  $D_0$  ( $\times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ) de la fluoresceína para dos radios de blanqueo y dos intensidades de observación.

De estos resultados vemos que el valor  $D_0 = 6.05 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  es el que más se desvía respecto a los demás, los cuales son muy próximos al valor reportado anteriormente,  $D_0 = 4.25 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ , (Culbertson et al., 2002). Esta diferencia obtenida en el caso mencionado pudo haberse causado debido a que el microcanal era lo bastante nuevo, lo que significa que el PDMS era muy permeable a la solución, comportamiento que ha sido encontrado en otros trabajos. Así, descartando este dato, el valor medio del coeficiente de difusión medido para la fluoresceína disodio es:

$$D_0 = (4.16 \pm 0.47) \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}. \quad (3.1)$$

Usaremos este coeficiente  $D_0$  para efectuar las comparaciones con las siguientes configuraciones experimentales mostradas en este capítulo. Por otro lado, la curva de recuperación de la figura 3.1 muestra que el método numérico descrito nos da un buen ajuste tanto en su comportamiento temporal como de los valores optimizados obtenidos de los parámetros.

## 3.2. Difusión en la microgeometría de los canales

En esta sección nos enfocamos a identificar la influencia que tiene el número de aristas que confluyen en un determinado vértice de las redes microfluídicas complejas, lo que llamaremos *alimentadores*, sin importar el ángulo entre las aristas. Iniciamos con dos alimentadores, es decir, difusión en una línea, hasta llegar al caso límite de infinitos alimentadores que corresponde al espacio bidimensional homogéneo visto en el apartado anterior.

Para efectuar este experimento, fijamos un chip de trabajo, en este caso escogimos una red con una longitud media de arista  $\langle L \rangle = 418.5 \text{ } \mu\text{m}$ , ancho de canal  $w = 120 \text{ } \mu\text{m}$ , y el radio de abertura del diafragma para el fotoblanqueo se fijó en  $R = 251 \text{ } \mu\text{m}$ . Con estos valores,  $\gamma = 0.60$ , lo que nos determina que estamos trabajando en la micro-escala de la red microfluídica. En la figura 3.2 se observa las regiones blanqueadas para 2, 3, 4, 5 e infinitos alimentadores (círculo). La recuperación de la fluorescencia se midió por 45 minutos, excepto para el caso de la región blanqueada circular, donde medimos por 200 s. Se repitió tres veces cada experimento.

Una vez obtenidas las curvas de recuperación de fluorescencia podemos observar que existen diferencias en la tasa de crecimiento, especialmente en las etapas intermedias, figura 3.3. Se ve además un orden secuencial en la rapidez de la recuperación respecto al número de

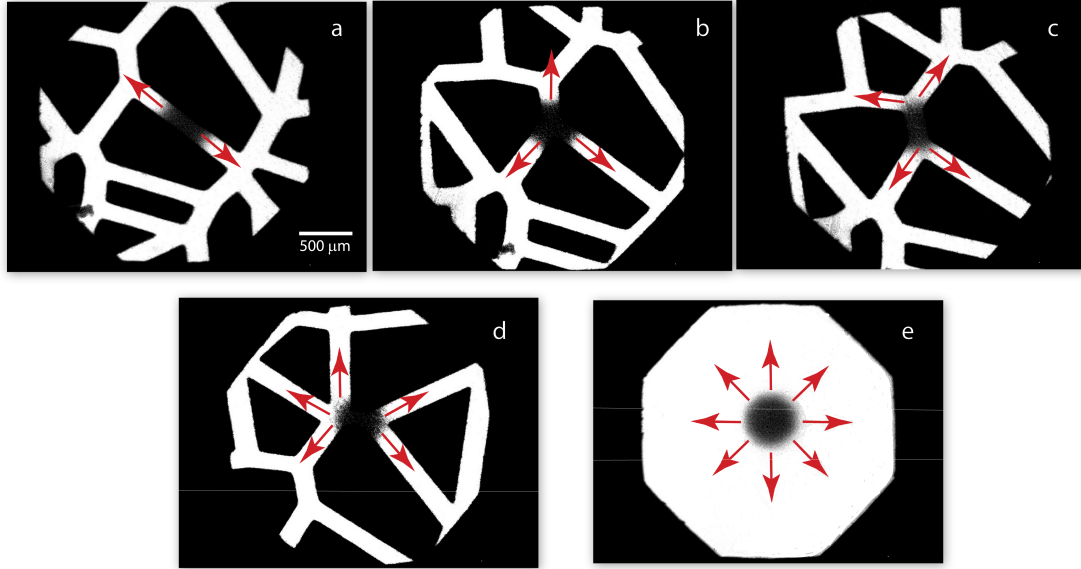


Figura 3.2: Zonas de blanqueo con varios alimentadores

Con 2 alimentadores (a) tenemos el caso de difusión unidimensional. Luego escogimos zonas de blanqueo con 3, 4 y 5 alimentadores, (b), (c), y (d) respectivamente. Como límite tenemos el caso bidimensional homogéneo (e), donde usamos el microcanal ya diseñado para el estudio de la sección anterior.

alimentadores. Recordemos que  $\tau$  es un tiempo efectivo que toma en cuenta la geometría del medio, el cual, en la aproximación de campo medio está relacionada con un coeficiente de difusión efectivo  $D$  (lo que en la sección 1.7 habíamos llamado  $D_{eff}$ ) tal que  $D = R^2/4\tau$ . Así, realizamos el respectivo ajuste de las curvas de recuperación e introducimos un coeficiente de difusión efectivo normalizado  $D/D_0$ . Los valores obtenidos mostraron que existe una influencia neta de los alimentadores. Así,  $D \sim 0.4 D_0$  cuando el fluido solo puede difundir a través de dos alimentadores, y cuando tenemos cinco alimentadores ya se alcanza un  $D \sim 0.8 D_0$ , muy cercano al valor asintótico  $D/D_0 \rightarrow 1$  para muchos alimentadores, figura 3.3.

El caso de 2 alimentadores corresponde al proceso de difusión en una dimensión descrita en la sección 1.5. Así que, únicamente para esta configuración, realizamos el ajuste de  $D$  utilizando una aproximación numérica unidimensional análoga al caso bidimensional detallado en la sección 2.7. Según este tratamiento, el valor obtenido es  $D = 1.65 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ , por lo que  $D/D_0 = 0.4$ . Este resultado no está de acuerdo al valor que deberíamos esperar, ya que teniendo en cuenta el desarrollo teórico para el caso unidimensional (ecuaciones 1.20 y 1.21), el coeficiente de difusión que se cita es  $D = D_0$ . Esta diferencia obtenida puede deberse a un importante proceso de adsorción entre las moléculas fluorescentes y las paredes del

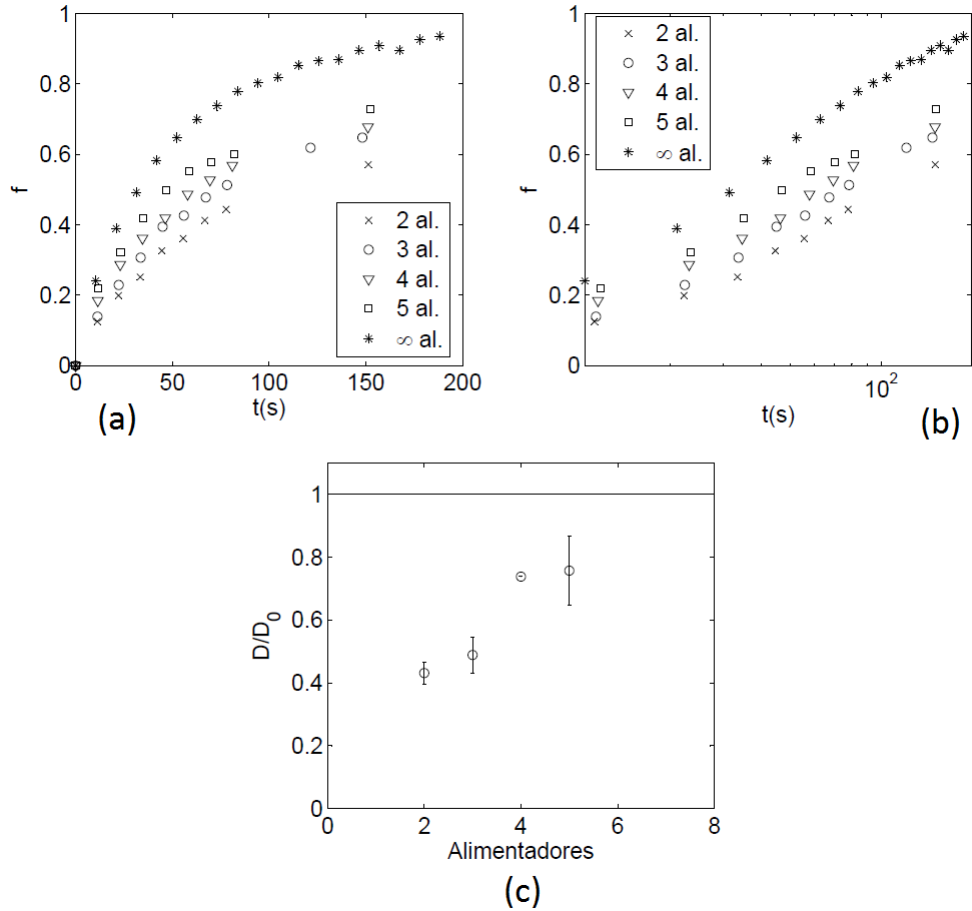


Figura 3.3: Efecto del número de alimentadores en la difusión

(a) La diferencia cuantitativa en la recuperación de la fluorescencia se observa a tiempos intermedios. (b) La recuperación en una escala logarítmica del tiempo muestra estas diferencias en forma más clara. (c) Se observa el efecto de los alimentadores en el coeficiente efectivo de difusión  $D/D_0$ .

canal, hecho que no está considerado en el desarrollo teórico y que provoca que la difusión sea más lenta que lo esperado. O por otro lado, puede deberse al efecto de la geometría lejos de la zona de blanqueo, ya que como vemos, la línea del canal tiene ramificaciones en sus extremos, lo que podría causar una alteración en el comportamiento de la difusión respecto al caso unidimensional citado. Adicionalmente, cabe la posibilidad que exista un artefacto numérico en nuestra herramienta de análisis que subestima el ajuste de  $D$ .

### 3.3. Difusión en la mesoescala de los canales

Ahora se prosigue con el desarrollo de experimentos FRAP en una región más grande, lo que hemos llamado mesoescala. En esta sección trabajamos con los dos parámetros adimensionales ya definidos: la homogeneidad  $\gamma = R/\langle L \rangle$ , que describe el efecto colectivo que la geometría del canal, y el aspecto reticular  $\eta = \langle L \rangle/w$ , que toma en cuenta el efecto del área efectiva ocupada por el fluido. En esta descripción colectiva, determinamos el comportamiento de  $D/D_0$  en función de  $\eta$  y  $\gamma$ , además también medimos las variaciones de la difusión de acuerdo a la zona específica de interés.

#### 3.3.1. Efecto colectivo: Zonas de blanqueo y dispersión

En este apartado, nos enfocamos a determinar la variación existente en la rapidez de recuperación de la fluorescencia de acuerdo a la zona específica en que el fotoblanqueo fue realizado. Es decir, para una determinada red microfluídica queremos cuantificar las diferencias en el tiempo de recuperación cuando, manteniendo fijo el radio de apertura del diafragma  $R$ , realizamos fotoblanqueos en varias zonas de la red. Nuestra hipótesis es que si estamos en la escala donde la micro-geometría se ve promediada dentro de una región más grande (la mesoescala), los parámetros que caracterizan a esta última, determinarán el comportamiento de la difusión en esta mesoescala. Por lo que independiente de la micro-geometría de la zona específica, el efecto colectivo de la mesoescala de la red en la difusión debería ser equivalente para cualquier zona.

Para efectuar estos experimentos, el radio de la región blanqueada es fijada en  $R = 790 \mu\text{m}$ . Trabajamos con varias redes de microcanales de distinto valor  $\gamma$ , en cada red escogimos cuatro regiones de fotoblanqueo para efectuar la comparación, figura 3.4. La recuperación de la fluorescencia fue captada por una hora siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.4. Para cada región de blanqueo, se repitió hasta por tres veces el experimento FRAP.

En la tabla 3.2, para cada región de blanqueo se muestra los valores del coeficiente efectivo de difusión normalizado  $D/D_0$  junto con su desviación standard porcentual  $s^* = s/D \times 100\%$  por las tres repeticiones. En la última columna se calcula el promedio y desviación entre las cuatro zonas para cada red microfluídica.

De la tabla 3.2, para un mismo canal y una misma región, podemos observar que la



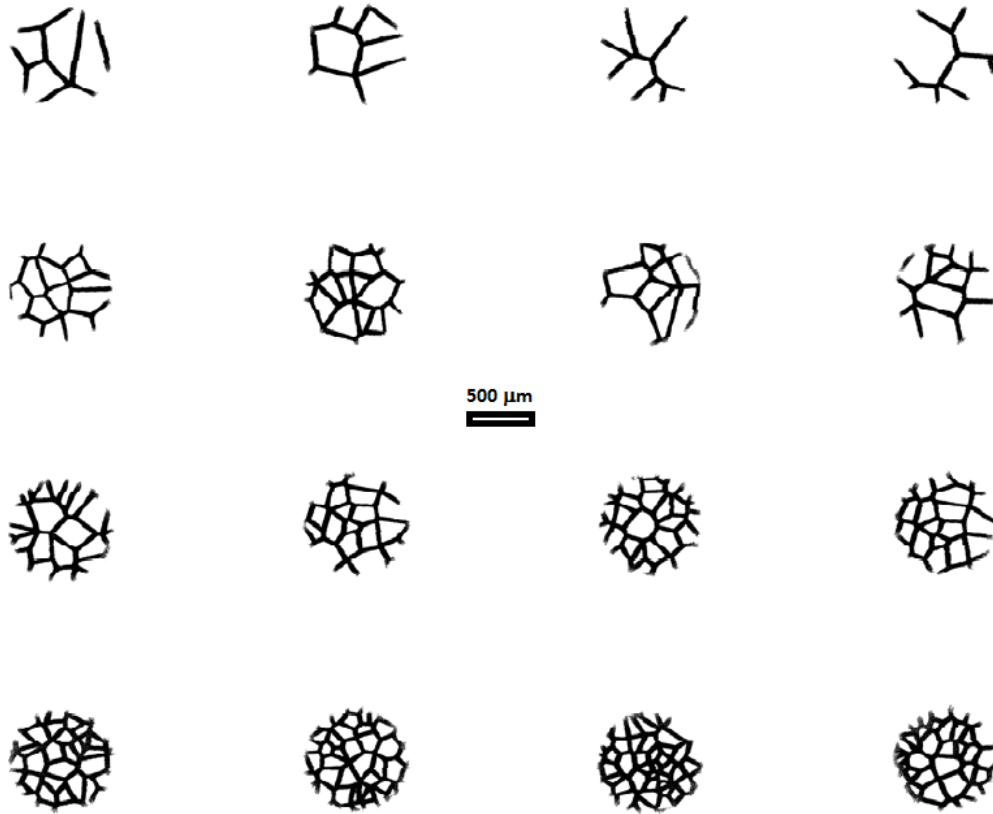


Figura 3.4: Las 16 regiones analizadas.

En la primera fila constan las 4 regiones con  $\eta = 10.46$  y  $\gamma = 1.89$ ; en la segunda fila, las regiones con  $\eta = 7.43$  y  $\gamma = 2.66$ ; en la tercera fila con  $\eta = 4.95$  y  $\gamma = 3.99$ ; para la cuarta fila con  $\eta = 3.64$  y  $\gamma = 5.45$ . Todas las zonas fueron expuestas a un radio de fotoblanqueo  $R = 790 \mu\text{m}$

		Región 1		Región 2		Región 3		Región 4		Promedio	
$\eta$	$\gamma$	$D/D_0$	$s^*$	$D/D_0$	$s^*$	$D/D_0$	$s^*$	$D/D_0$	$s^*$	$D/D_0$	$s^*$
10.46	1.89	0.47	0.68	0.51	8.01	0.53	3.19	0.53	4.71	0.51	6.62
7.43	2.66	0.54	3.98	0.48	5.82	0.49	5.65	0.53	5.64	0.51	7.08
4.95	3.99	0.88	10.05	0.52	4.23	0.71	6.55	0.56	3.24	0.65	22.44
3.64	5.45	0.82	5.61	0.77	1.02	0.60	2.83	0.75	7.96	0.72	12.51

Tabla 3.2: Coeficiente efectivo de difusión normalizado  $D/D_0$  y su desviación standard porcentual  $s^*$  para cuatro zonas de blanqueo en distintas redes microfluídicas caracterizadas por  $\langle L \rangle$  y  $w$ .

dispersión en  $D/D_0$  a lo sumo un 10%. Es decir, el error debido a las repeticiones cae dentro de este margen. Ahora, al promediar en las cuatro regiones para un mismo canal, vemos

sorpresivamente que el valor de esta desviación aumenta al incrementar el valor de  $\gamma$ , el cual es el parámetro que nos indica el nivel de colectividad en que estamos trabajando. En la red con  $\gamma = 3.99$ , la dispersión es 22%, lo que refleja la variabilidad de  $D/D_0$  en cada región. No obstante, un mayor muestreo debería ser realizado para reafirmar este hallazgo. Además un hecho que apreciamos es que el coeficiente efectivo de difusión  $D/D_0$  para las redes con  $\gamma = 1.89$  y  $\gamma = 2.66$  es estadísticamente el mismo. Esto nos puede dar la idea de que a esta escala, la geometría colectiva de la red, descrita por  $\gamma$ , aun no influye en la rapidez de la difusión. Tomando en cuenta estas apreciaciones podemos decir, que para una misma red microfluídica y a estas escalas de  $\gamma$ , la región específica escogida para realizar el fotoblanqueo influye en el ajuste del coeficiente efectivo de difusión a lo sumo en un 13%, si no tomamos en cuenta el valor atípico descrito para  $\gamma = 3.99$ .

### 3.3.2. Efecto colectivo: Dependencia en $\gamma$

Para este caso fijamos un único chip de trabajo, caracterizado con longitud media de arista  $\langle L \rangle = 145.5 \mu\text{m}$  y ancho  $w = 40 \mu\text{m}$ , es decir  $\eta = 3.64$ . Luego escogemos una zona de interés y realizamos los experimentos FRAP para varios radios de blanqueo, desde  $R = 280 \mu\text{m}$  hasta  $R = 1134 \mu\text{m}$ . Con este rango efectuamos un barrido de  $R$  desde la escala micrométrica hasta el máximo ya indicado, que está limitado por las restricciones experimentales y metodológicas usadas.

En la figura 3.5 se muestran las zonas fotoblanqueadas para los radios indicados. Como podemos observar, la zona blanqueada incluye un mayor detalle de la geometría del canal a medida que incrementamos el radio, hasta llegar tener una descripción característica del tamaño de celda, su dispersión, la forma, entre otros factores geométricos de la red. Los resultados obtenidos al optimizar el parámetro  $\tau$  de las curvas de recuperación correspondientes constan en la tabla 3.3. Cabe decir que el ajuste de los parámetros se realiza usando el mismo modelo que el usado para el caso de la difusión en el espacio homogéneo bidimensional, sección 3.1, ya que estamos usando una aproximación de campo medio para estas geometrías, es decir, describimos el fenómeno como si se tratara de una geometría homogénea en el cual difunde el fluido con una tasa de difusión efectiva a ser conocida.

En estos resultados, podemos ver que el coeficiente efectivo de difusión  $D$  siempre es menor que  $D_0$ , lo que nos indica cuán atenuada es la difusión debido a la presencia de la geometría reticular. En otras palabras la difusión es más lenta, por lo que el tiempo característico

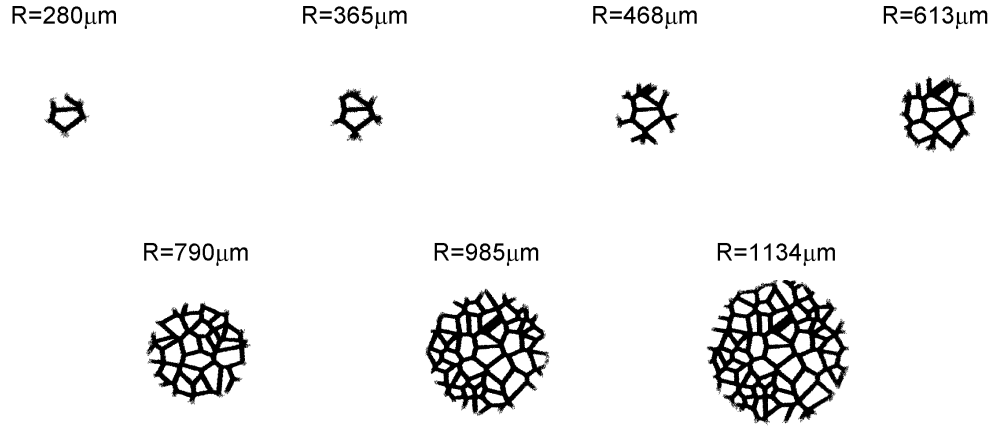


Figura 3.5: Zonas fotoblanqueadas para el mismo microcanal a distintos radios de blanqueo

Para investigar el efecto colectivo en estas geometrías, escogimos una determinada región de la red e incrementamos el radio de la zona a ser blanqueada. Las imágenes corresponden a la red microfluídica con  $\langle L \rangle = 145.5 \mu\text{m}$  y  $w = 40 \mu\text{m}$ .

$R$ ( $\mu\text{m}$ )	$\gamma$	$\tau$ (s)	$D/D_0$
280	1.92	86.34	0.55
365	2.51	138.74	0.58
468	3.22	184.16	0.71
613	4.21	285.11	0.79
790	5.43	516.91	0.73
985	6.77	885.63	0.66
1134	7.79	1081.40	0.71

Tabla 3.3: Coeficientes de difusión normalizados  $D/D_0$  según el parámetro adimensional  $\gamma$ , con  $\eta = 3.64$  fijo.

de difusión  $\tau$  crece respecto a su valor en el espacio libre (sin obstáculos). En la figura 3.6a, podemos ver claramente la diferencia. Además, tomando en cuenta que el coeficiente de difusión efectivo  $D/D_0$  responde a un comportamiento promedio de toda la zona blanqueada, figura 3.6b, tenemos que  $D/D_0$  tiende a un valor representativo de 0.7 en los valores más grandes de  $\gamma$ , donde ya el efecto colectivo de la geometría del canal interviene.

Mientras tanto que en la escala microscópica,  $D/D_0$  tiene un valor menor ( $\approx 0.57$ ), donde el efecto es netamente local. En  $\gamma \approx 4$  tenemos un máximo de  $D/D_0$ , aunque aun comparable al

valor asintótico. Bajo esta consideración y de acuerdo a lo mencionado en la sección anterior, podemos decir que existe un valor crítico  $\gamma_c \approx 2.7$  que separa la descripción microscópica de la mesoscópica, ya que cerca de este valor vemos un cambio de régimen en los valores normalizados del tiempo de difusión.

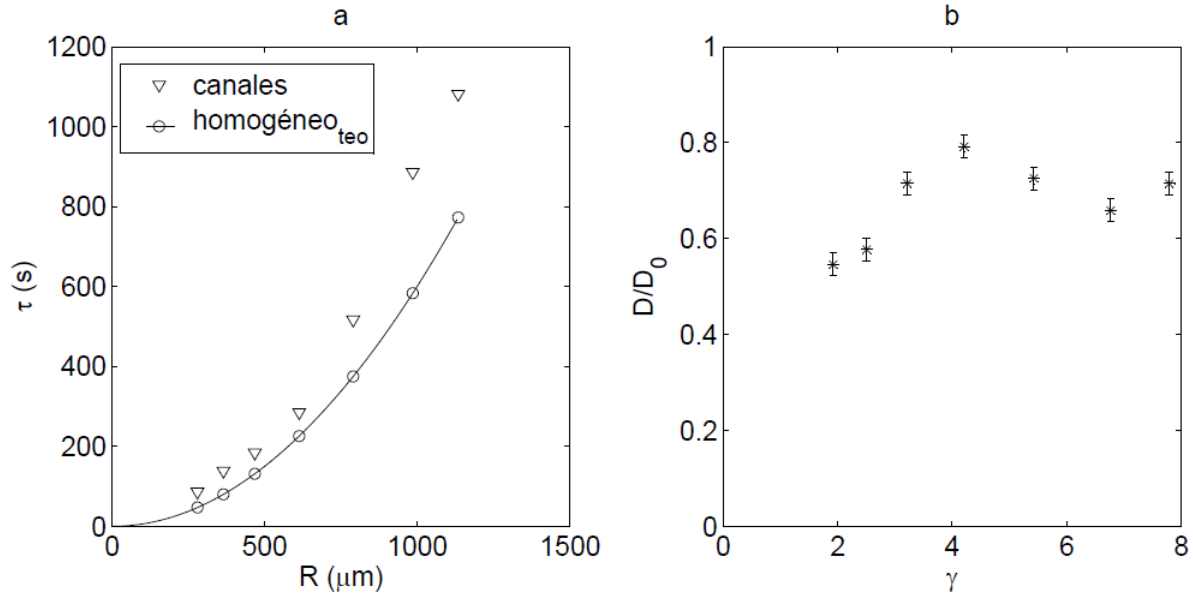


Figura 3.6: Tiempos de difusión característico y coeficientes de difusión efectivos

A esta escala, (a) la recuperación usando los microcanales es más lenta en comparación a una zona blanqueada homogénea del mismo radio. (b) En cuanto al coeficiente de difusión efectiva del microcanal, éste corresponde a alrededor 0.7 veces el valor en el espacio bidimensional homogéneo cuando  $\gamma$  alcanza valores mayores que 5. Las barras de error son estimativas basadas en los resultados de la dispersión que obtuvimos en el análisis de la variabilidad por regiones de blanqueo, sección 3.3.1

### 3.3.3. Método alternativo de determinar el límite entre la micro y la mesoescala

Una metodología para determinar el límite entre la micro y la mesoescala a partir de la imágenes, sin inclusive utilizar el FRAP, consiste en medir el nivel de gris promedio, incluyendo las zonas accesibles y no accesibles al fluido, en un intervalo de valores  $\gamma$ . De acuerdo a la descripción de un medio efectivo, este nivel de gris (que correspondería al nivel de fluorescencia o concentración), debe converger a un valor estacionario cuando la escala en

la que se toma el promedio es equivalente a la escala donde el medio puede ser descrito como efectivo.

En tal razón, la metodología implementada para llevar a cabo este procedimiento se basa en utilizar las imágenes de los diseños de las redes microfluídicas (figura 2.5) caracterizadas por  $\langle L \rangle$  y  $w$ , con lo que  $\eta$  queda definido. Es decir, únicamente utilizamos las imágenes digitales de las redes, no construimos los microcanales. En otras palabras, trabajamos con redes microfluídicas virtuales donde los canales, en color blanco, representan el fluido con una concentración uniforme, y el color negro son las zonas inaccesibles al fluido virtual. Luego, en estas imágenes, escogemos varias regiones de interés al azar para medir el nivel de gris (concentración) promedio, con el fin de observar como evoluciona este nivel en función del tamaño de la región.

Detallando, para una determinada red, generamos computacionalmente 100 zonas circulares sobre ella. El centro de cada círculo es aleatoriamente escogido y su radio  $q$  va creciendo progresivamente en razón de 1 pixel ( $10.9 \mu\text{m}$  en escala métrica), hasta un radio máximo  $Q$ . El algoritmo fue escrito de tal forma que los círculos queden totalmente en el interior de la red, figura 3.7. Para cada incremento de radio calculamos el nivel promedio de gris  $P$ , incluyendo las zonas accesibles y zonas no accesibles. Este proceso lo repetimos hasta alcanzar el radio máximo, con lo que tenemos una curva que relaciona el nivel de gris promedio  $P$  en dependencia de  $q$ .

Ahora, para este caso, el nivel colectivo es cuantificado por  $\gamma = q/\langle L \rangle$ , donde  $q$  ahora representa la talla de la zona considerada. Por lo tanto, representamos las curvas obtenidas como  $P$  en función de  $\gamma$ . Para nuestro análisis escogimos una red de  $\langle L \rangle = 145.5 \mu\text{m}$  y variamos  $w$  de acuerdo a lo mostrado en la tabla 3.4, con lo que se define varios valores de  $\eta$ . Una vez que tenemos las 100 curvas, realizamos un promedio estadístico entre ellas con el fin de obtener un comportamiento característico de todas las zonas. Además, a partir de este análisis, podemos ser capaces de encontrar un valor crítico  $\gamma_c$  que establezca el punto a partir del cual el medio puede ser descrito como efectivamente homogéneo.

Calculamos el *gran promedio*  $\bar{P}$  definido como el promedio de  $P$  entre todas las zonas para un determinado  $\gamma$ . Además, obtenemos también su respectiva desviación standard  $s$ . En la figura 3.8 podemos ver el resultado obtenido para el caso  $\eta = 3.64$ . En ella, claramente podemos ver que  $s$  se va reduciendo a medida que  $\gamma$  crece, lo que nos muestra que las zonas son efectivamente equivalentes.

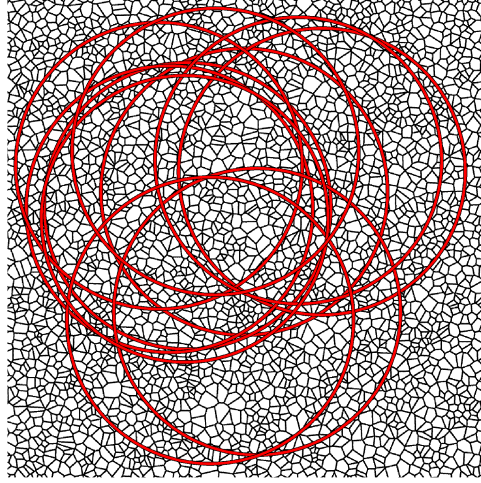


Figura 3.7: Círculos generados aleatoriamente sobre un red microfluídica

Se muestran 10 círculos generados mediante el algoritmo mencionado en el texto, donde el radio ha alcanzado su máximo valor. A medida que los círculos van creciendo, se calcula el nivel de gris promedio en su interior. La red corresponde a  $\langle L \rangle = 145.5 \mu\text{m}$  y  $w = 40 \mu\text{m}$ . Los colores de la red han sido invertidos.

Una vez que tenemos  $\bar{P}$  y  $s$ , definimos la desviación standard normalizada  $\sigma = s/\bar{P}$ , la cual es decreciente en  $\gamma$ . Vemos en la figura 3.9, que si graficamos  $\sigma$  versus  $\gamma$  en escala logarítmica para ambas variables, esta relación es aproximadamente lineal. Este resultado nos sugiere que podría existir una relación de ley de potencia entre ellas, es decir,  $\sigma \propto \gamma^b$ , donde  $b$  es un número real. Sin embargo, este tipo de ley no tienen una escala característica, lo que no permite obtener un parámetro crítico  $\gamma_c$  basado en esta cualidad. Dado este impedimento, en este punto, decidimos elegir un valor arbitrario de corte  $\sigma_c$  para el cual  $\gamma_c$  quede definido. Escogimos el nivel  $\sigma_c = 0.05$ , es decir, cuando las diferencias son menores al 5% del gran promedio, podemos decir que ya estamos en la mesoescala. En el punto en que  $\sigma = \sigma_c$ , el valor crítico  $\gamma_c$  queda definido. Realizamos este procedimiento para redes con distintos  $\eta$ . En la figura 3.9 mostramos las curvas de  $\sigma$  y la recta de corte. Los resultados de  $\gamma_c$  se recogen en la tabla 3.4.

De estos resultados, vemos que el valor crítico  $\gamma_c$  depende de  $\eta$ . Sin embargo, para anchos de canal entre  $20 \mu\text{m}$  y  $60 \mu\text{m}$ ,  $\gamma_c$  prácticamente se mantiene en un valor constante de 6. Para anchos de canal mayores, vemos que  $\gamma_c$  se alcanza a valores más pequeños. Esto se debe a que al aumentar  $w$ , los detalles reticulares de la geometría se van perdiendo, por lo que el medio se vuelve más homogéneo.

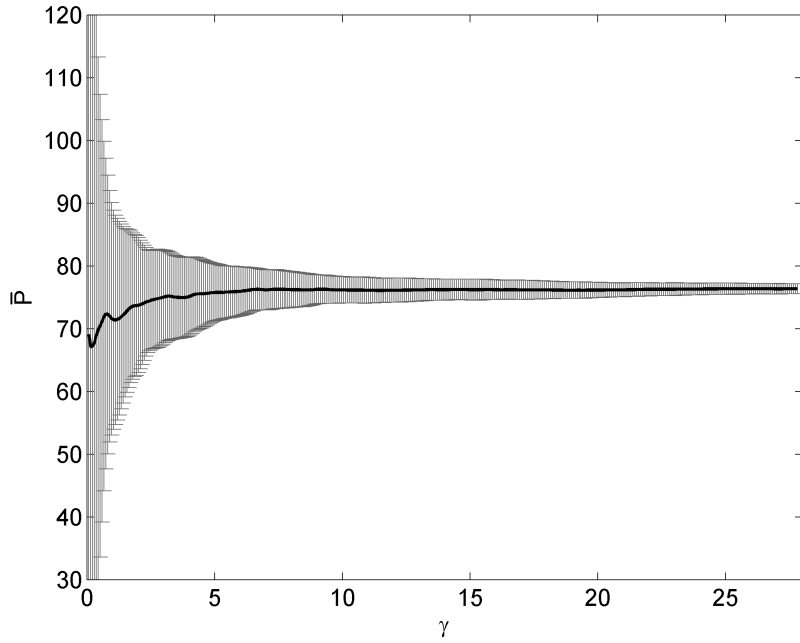


Figura 3.8: Nivel de gris promedio  $P$  en función de  $\gamma$ .

Se muestra el gran promedio  $\bar{P}$  para las 100 zonas en cada valor  $\gamma$ , las barras de error corresponden a la desviación standard respectiva. Vemos que la dispersión se va reduciendo a medida que  $\gamma$  crece. El caso presentado corresponde a  $\eta = 3.64$

$w$ ( $\mu\text{m}$ )	$\eta$	$\gamma_c$ ( $\sigma_c = 5\%$ )
20	7.28	6.30
40	3.64	6.15
60	2.43	5.99
100	1.46	4.65
150	0.97	3.07
250	0.58	0.76

Tabla 3.4: Valor del valor crítico  $\gamma_c$  en función de  $\eta$  a un nivel de significación  $\sigma_c = 5\%$ .

No obstante del criterio puramente arbitrario en el que nos basamos para obtener  $\gamma_c$ , es decir  $\sigma_c = 0.05$ , debemos notar que las curvas que relacionan  $\sigma$  con  $\gamma$  son distinguibles. Así que si escogemos un  $\sigma_c$  distinto, obtendremos diferentes  $\gamma_c$ . Inclusive, otros criterios pueden tenerse en cuenta, tales como observar la variación de  $s$  en términos absolutos o relativos, o ajustar modelos matemáticos con parámetro de ajuste  $\gamma_c$ .

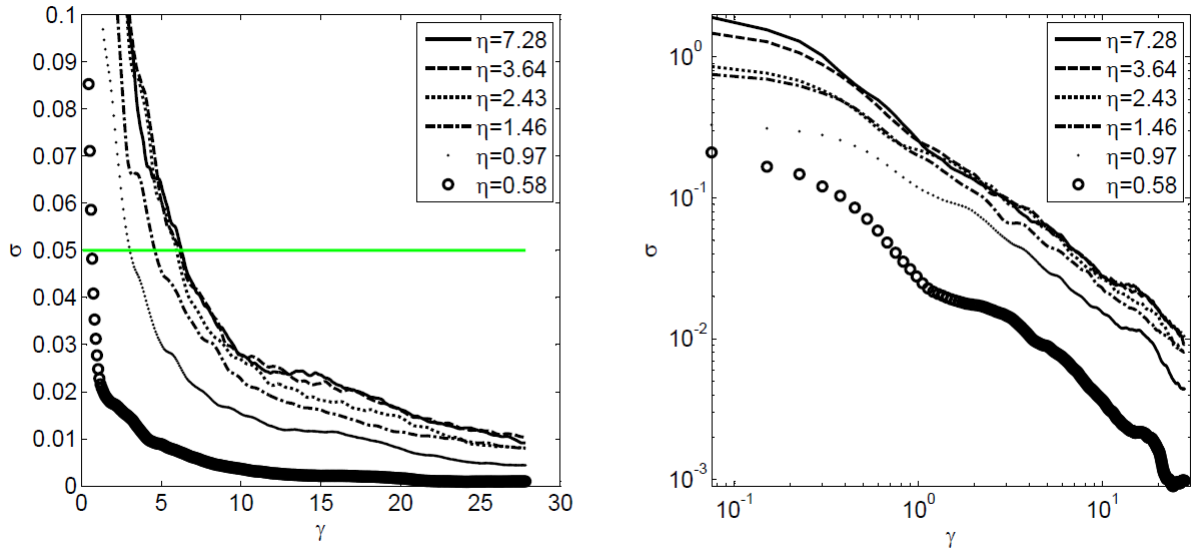


Figura 3.9: Curva de  $\sigma$  vs  $\gamma$

A la derecha: Se muestra la relación entre  $\sigma$  y  $\gamma$  en escala logarítmica para ambos ejes. Se observa una relación lineal, lo que sugiere que una relación en ley de potencia para estas variables. A la izquierda: La desviación standard normalizada  $\sigma$  decae con  $\gamma$ . Al establecer un valor de corte  $\sigma_c$ , el valor crítico  $\gamma_c$  queda determinado.

### 3.3.4. Efecto del área efectiva

En esta sección nos interesamos en el efecto que el área efectiva de la zona blanqueada tiene sobre la difusión. Así nuestro propósito es analizar la recuperación de la fluorescencia en términos del parámetro adimensional  $\eta = \langle L \rangle / w$ . Experimentalmente hablando, ahora fijamos un único radio de fotoblanqueo,  $R = 790 \mu\text{m}$ , y usamos varios microcanales con una misma longitud media de arista,  $\langle L \rangle = 198 \mu\text{m}$ , variando el ancho de los microcanales  $w$ . Con esto fijamos  $\gamma = 3.99$ , y  $\eta = \langle L \rangle / w$  varía de acuerdo a  $w$ . En la figura 3.10 vemos las zonas expuestas al fotoblanqueo con sus respectivos anchos del microcanal. La recuperación de fluorescencia fue medida durante una hora.

Los coeficientes efectivos de difusión adimensionales  $D/D_0$  obtenidos para estos experimentos se muestran en la tabla 3.5. En la última fila se muestra un valor de  $w = 630 \mu\text{m}$  que corresponde a un grosor de canal en el que la geometría de la red desaparece debido a que al aumentar  $w$ , cada celda de Voronoi se hace más pequeña, efecto que lo podemos apreciar en figura 3.10. Por lo tanto, en este límite se alcanza el caso de difusión en el espacio homogéneo, donde  $D = D_0$  dado por 3.1.



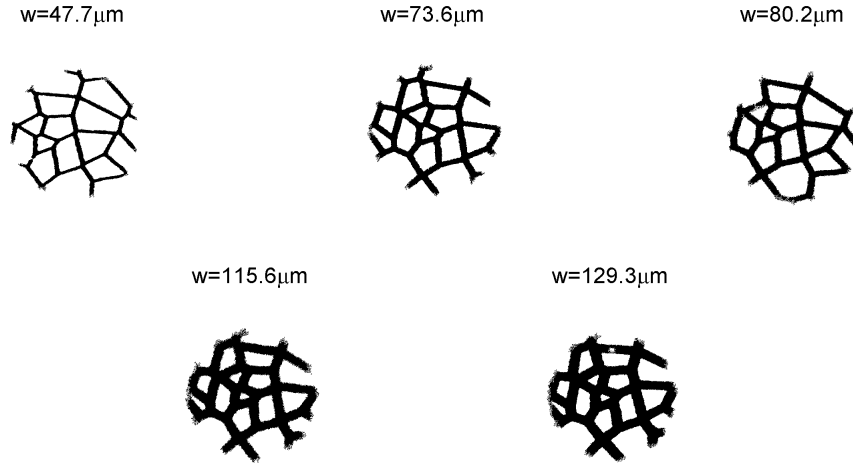


Figura 3.10: Zonas fotoblanqueadas para diferentes anchos de canal  $w$ . La longitud de arista  $\langle L \rangle$  y el radio de blanqueo  $R$  se mantienen constantes

El hecho de aumentar el ancho  $w$  de los canales causa que el área (o volumen) accesible se incremente dentro de un mismo radio de observación  $R$ .

$w(\mu\text{m})$	$\eta$	$D/D_0$
47.7	4.15	0.42
73.6	2.69	0.52
80.2	2.47	0.46
115.6	1.71	0.51
129.3	1.53	0.57
630	0.31	1

Tabla 3.5: Coeficientes de difusión normalizados  $D/D_0$  según el parámetro adimensional  $\eta$ , con  $\gamma = 3.99$  fijo.

De los resultados podemos observar, que la difusión es más lenta a medida que  $\eta$  crece, es decir, mientras más angostos son los microcanales; estos puntos experimentales se muestran en la figura 3.11. Vemos que el coeficiente efectivo de difusión  $D/D_0$  toma aproximadamente un valor de 0.6 aun cuando  $\langle L \rangle$  y  $w$  son comparables. Para canales más angostos,  $D/D_0$  llega a estar alrededor de 0.44 en promedio, en cuyo régimen parece variar muy poco.

Sin embargo, podemos además mostrar el comportamiento del coeficiente efectivo de difusión en función del área estrictamente blanqueada, para ello introducimos el parámetro  $\kappa = A_b/A_0$  (fracción de superficie accesible por el fluido), donde  $A_b$  es el área blanqueada

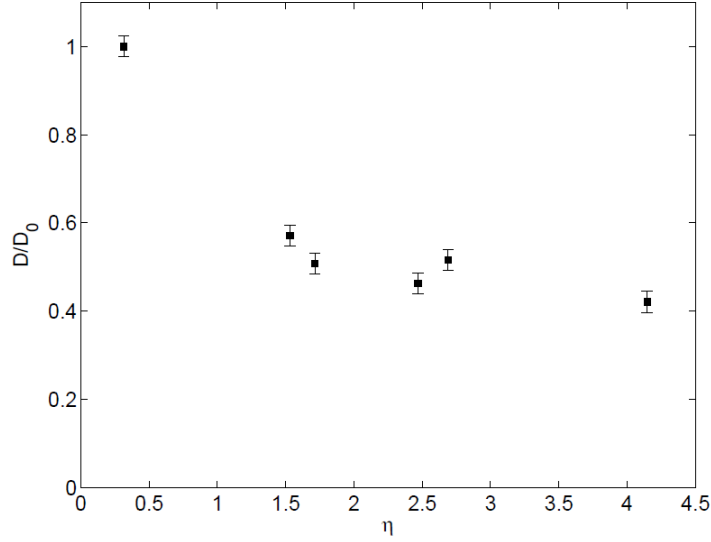


Figura 3.11: Coeficiente efectivo de difusión  $D/D_0$  en función de  $\eta$

Al ser más angostos los canales, el coeficiente efectivo de difusión  $D/D_0$  es menor. A este rango de valores de  $\eta$ ,  $D/D_0$  parece llegar a un valor estacionario. De nuevo, las barras de error son estimativas.

ocupada por el fluido y  $A_0$  es el área del círculo que encierra tanto la superficie blanqueada como la superficie de las zonas de Voronoi incluidas. Como mantenemos  $R$  fijo, el área  $A_0 = \pi \times R^2 = 19.61 \times 10^{-7} \text{ m}^2$ . Mientras que el valor de  $A_b$  se muestra en la tabla 3.6 para cada microcanal de trabajo.

$w$ ( $\mu\text{m}$ )	$A_b (\times 10^{-7} \text{ m}^2)$	$\kappa$
47.7	4.75	0.24
73.6	7.38	0.38
80.2	7.82	0.40
115.6	10.66	0.54
129.3	11.02	0.56
630	19.61	1

Tabla 3.6: Area  $A_b$  blanqueada y la fracción accesible por el fluido  $\kappa$

Ahora, relacionando la fracción efectiva de área  $\kappa$  con el coeficiente efectivo de difusión  $D/D_0$  de la tabla 3.5, obtenemos la curva mostrada en 3.12. Vemos principalmente que entre  $0.25 < \kappa < 0.55$ , el coeficiente efectivo de difusión esta entre  $0.4 < D/D_0 < 0.6$ . Físicamente deberíamos esperar que a menores  $\kappa$ , la difusión sea más lenta, para lo que tendríamos que explorar anchos de canal menores a los construidos. Sin embargo, con el equipamiento

actual del laboratorio y metodología usada resulta más complicado construir microcanales con anchos menores a  $40 \mu\text{m}$  considerando estas geometrías de trabajo; y más aún, entramos en un rango en que la desviación típica del ancho de canal ( $\approx 9 \mu\text{m}$ ) es comparable con el promedio por lo que el control experimental sobre esta variable sería muy pobre.

Por otra parte, con los anchos de canal  $w$  especificados en la tabla 3.5, y considerando que la profundidad del canal tiene un valor nominal de  $50 \mu\text{m}$ , vemos que la relación ancho-profundidad de canal va entre 1 y 3. Es decir, en este rango de variación de  $w$ , el hecho que el fluido tenga el espacio correspondiente a su profundidad puede causar que no observamos una disminución pronunciada en  $D/D_0$ . Este aspecto abre un posible futuro trabajo relativo a obtener el comportamiento de la difusión a regímenes donde la relación de aspecto entre el ancho y la profundidad sea menor que lo aquí establecido.

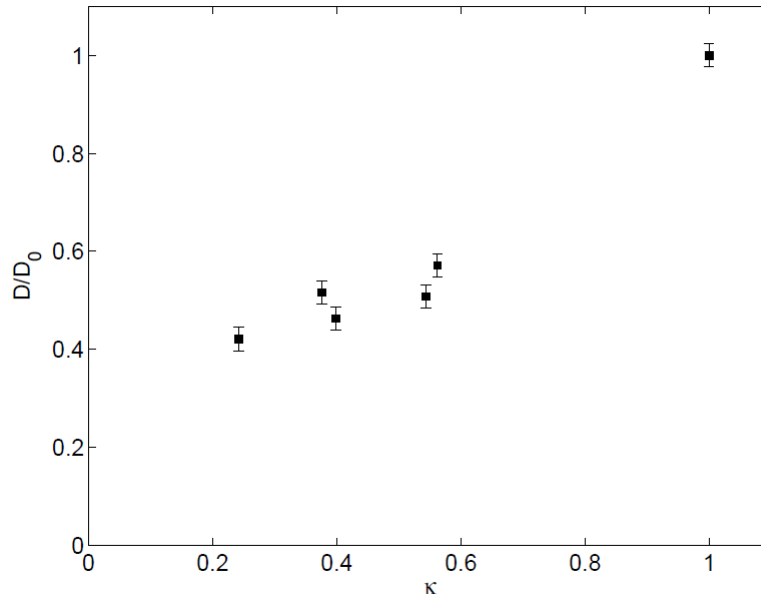


Figura 3.12: Coeficiente efectivo de difusión  $D/D_0$  en función de la fracción de superficie accesible  $\kappa$

En el intervalo de  $\kappa \in [0.25, 0.55]$ , el coeficiente efectivo de difusión tiene una variación de  $\approx 0.2$ . Futuros trabajos en un rango mayor de  $\kappa$  serían relevantes.

### 3.4. Difusión bajo un flujo de promedio nulo

Luego de haber descrito la difusión en relación a las variables adimensionales geométricas en la sección precedente, ahora nos proponemos conocer qué efecto tiene en la difusión el introducir un flujo periódico de promedio nulo mientras tiene lugar la recuperación de la fluorescencia.

Para ello usamos el proceso experimental descrito en la sección 2.8. El canal microfluídico usado para estos experimentos es único, caracterizado por su longitud media de arista  $\langle L \rangle = 198 \mu\text{m}$  y ancho de canal  $w = 80.2 \mu\text{m}$  ( $\eta = 2.47$ ). El radio de blanqueo fue  $R = 790 \mu\text{m}$  ( $\gamma = 3.99$ ), incidiendo la luz fluorescente siempre sobre la misma zona del microcanal, previamente escogida. El caudal de inyección/succión fue fijado en 50 nL/s, y variamos la amplitud de oscilación  $x$  de acuerdo a la calibración obtenida en la tabla 2.2.

En estos experimentos FRAP bajo la acción de un flujo oscilatorio también estamos interesados conocer la descripción efectiva de la recuperación de la fluorescencia; por lo que caracterizamos este proceso en función del coeficiente de difusión normalizado  $D/D^*$ , donde  $D^*$  es el coeficiente de difusión cuando no existe flujo oscilatorio. Usando la misma herramienta numérica de los casos anteriores, se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 3.7, donde hemos introducido el parámetro adimensional  $x/\langle L \rangle$ , que da cuenta de la amplitud de la oscilación en unidades de  $\langle L \rangle$ .

Además, calculamos el número de Reynolds  $Re$  y el número de Strouhal  $St$  de estos experimentos para mostrar el comportamiento de  $D/D^*$  en términos de estos parámetros que describen la relación entre el caudal oscilatorio externo, la difusión y los efectos viscosos. Para el número de Reynolds,  $Re = LU/\nu$  donde  $U = 2x/T$  es la velocidad característica del fluido con  $T$  su periodo de oscilación (Tabla 2.2); tomamos la altura nominal del canal  $h = 50 \mu\text{m}$  como la longitud característica  $L$  de variación de  $U$  (perfil parabólico de velocidad), y estimamos la viscosidad cinemática de un medio acuoso como  $\nu = 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ . Para el cálculo del número de Strouhal, el cual relaciona los efectos del flujo oscilatorio en comparación a la difusión, usamos  $St = \tau_w/T$ , donde  $\tau_w$  es el tiempo en que una molécula difunde una distancia  $w$  (ancho del canal), es decir  $\tau_w = w^2/2D_0$ . Los valores obtenidos de  $Re$  y  $St$  también se incluyen en la tabla 3.7.

En la figura 3.13a podemos apreciar cómo a valores de  $x/\langle L \rangle$  inclusive menores a la unidad, el coeficiente de difusión aumenta ya hasta 2.5 veces respecto al valor referencial (sin flujo).

$V(nL)$	$x$ ( $\mu\text{m}$ )	$x/\langle L \rangle$	$D/D^*$	$Re$	$St$
100	52.18	0.26	1.02	0.0012	1.84
125	120.39	0.61	2.06	0.0024	1.59
150	189.30	0.96	2.61	0.0031	1.31
162.5	342.48	1.73	4.02	0.0054	1.25
175	486.08	2.46	5.94	0.0069	1.13
187.5	721.86	3.65	5.82	0.0096	1.07
200	927.07	4.68	4.99	0.0116	0.99
212.5	1109.57	5.60	7.79	0.0130	0.93
225	1254.31	6.33	9.73	0.0136	0.87

Tabla 3.7: Coeficiente efectivo de difusión normalizado  $D/D^*$  en función de la amplitud de oscilación  $x$

Esto nos dice que aún en amplitudes de oscilación menores a la longitud de un lado de zona de Voronoi, los efectos del flujo oscilatorio en la difusión son ya apreciables. Además, nos podemos fijar que en valores de  $x/\langle L \rangle$  entre 2.5 y 5, el comportamiento de la curva es diferente que en el resto de valores, donde se tiene un régimen de variación característico. Ya en valores de  $x/\langle L \rangle$  superiores a 5.5,  $D$  ya es 8 veces  $D^*$ . Así, en general, vemos que cuando se tiene flujos a amplitudes mayores, el coeficiente de difusión normalizado  $D/D^*$  crece, acelerando el proceso de difusión, aun cuando el flujo externo, en promedio, es nulo.

En referencia a  $Re$ , vemos que se mantiene en órdenes de  $10^{-2}$  a  $10^{-1}$  por lo que aún podemos considerar que existe un flujo laminar al realizar estos experimentos. El comportamiento de  $D/D^*$  en función de  $Re$  se mantiene similar a lo descrito en el párrafo anterior, es decir, un comportamiento creciente en general, figura 3.13b. Tomando en cuenta el número de Strouhal  $St$ , vemos que éste se mantiene cercano a 1, con lo cual estamos en el régimen en que el fluido tiene un movimiento colectivamente oscilatorio. En este caso, el comportamiento de  $D/D^*$  es inverso con  $St$  ( $St \propto 1/T$ ), figura 3.13c. Vemos que para  $St < 1$ , el efecto de la difusión tiene mayor influencia dentro de cada ciclo de la oscilación. Esto debido a que las moléculas, en tal caso, tienen tiempo para difundir una distancia  $w$  mientras se efectúa una oscilación completa, lo que puede dar lugar a un incremento de  $D/D^*$ .

Concluyendo, vemos que existe un efecto muy claro del flujo periódico en la rapidez de recuperación de la fluorescencia. Esto nos quiere decir, que a pesar que el flujo neto es nulo, dentro de cada ciclo de oscilación se produce proceso de mezclado entre las partículas

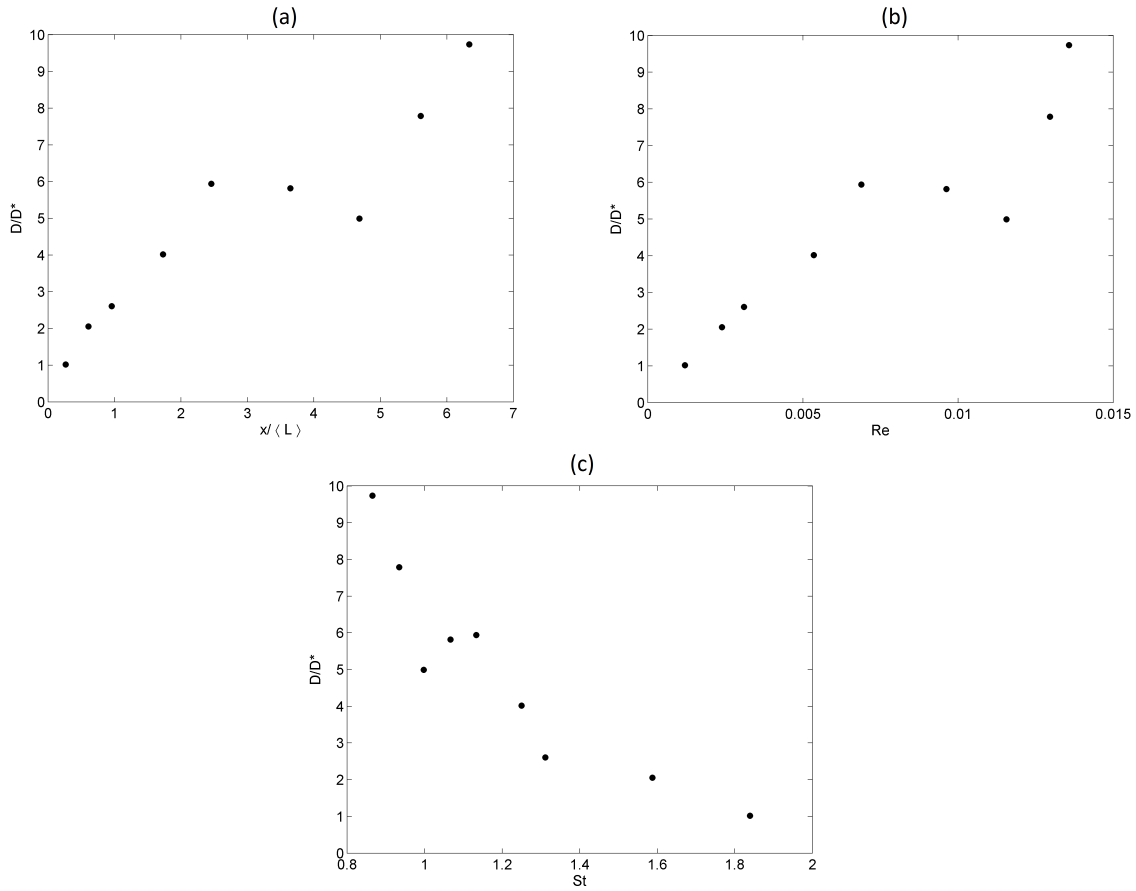


Figura 3.13: Coeficiente efectivo de difusión normalizado  $D/D^*$  en función de varios parámetros adimensionales.

(a) Se muestra  $D/D^*$  en función de la amplitud de oscilación normalizada  $x/L$ , vemos que una rápida variación de  $D/D^*$  al incrementar la amplitud de oscilación  $x$ . (b) El comportamiento de  $D/D^*$  con el número de Reynolds  $Re$  es similar a los visto en (a). (c)  $D/D^*$  en términos del número de Strouhal  $St$ , se observa que a  $St \approx 1$  ocurre un comportamiento atípico, no obstante el rango de variación de  $St$  es pequeño.

blanqueadas y no blanqueadas que acelera la recuperación. Este proceso podría deberse además a la acción de la fluctuaciones térmicas (choques entre moléculas de fluoresceína o con moléculas de agua) en el sentido que dada una partícula que originalmente se encontraba en la zona blanqueada, al llegar al otro extremo de la oscilación, no necesariamente vuelve por la misma trayectoria de ida, y en su lugar otra partícula realiza tal recorrido. Recordemos que existe inclusive un tiempo finito de respuesta entre la inyección/succión de fluido, dando espacio a que ocurran estas fluctuaciones en los extremos de la oscilación.

# Capítulo 4

## Conclusiones y perspectivas

De acuerdo a lo mostrado en el presente trabajo, podemos concluir primeramente que la metodología experimental del FRAP aplicada al estudio de difusión en escalas microfluídicas puede ser implementada. En esta metodología vemos que existen procesos complementarios como el fotoblanqueo por observación, o detalles experimentales como los perfiles de blanqueo y de observación, los cuales deben ser considerados en el análisis de los datos experimentales.

Por otro lado, hemos visto que, mediante la generación de mosaicos de Voronoi, podemos obtener redes de microcanales con un grado de aleatoriedad controlado mediante el parámetro de regularidad  $\chi$ . Estas redes fueron caracterizadas por la longitud media de arista  $\langle L \rangle$  y por el ancho de los microcanales  $w$ . Además el tamaño característico de la difusión fue controlada por el radio de la zona fotoblanqueada  $R$ . Con ellos, definimos dos parámetros adimensionales: la homogeneidad  $\gamma = R/\langle L \rangle$  que da cuenta de los detalles geométricos colectivos de la red y, el aspecto reticular  $\eta = \langle L \rangle/w$  que da una medida del volumen efectivo accesible al fluido.

En cuanto a los resultado experimentales, pudimos determinar el coeficiente molecular de difusión de la fluoresceína  $D_0 = 4.16 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ , el cual es comparable con mediciones anteriores, lo que valida nuestra metodología de análisis.

En lo concerniente a la difusión en las redes microfluídicas, para el parámetro de homogeneidad  $\gamma$ , dentro de un rango  $1.89 < \gamma < 5.45$ , mostramos que el coeficiente de difusión efectivo  $D$  varía a lo sumo en un 13 %, en promedio, al medir la difusión en varias regiones del canal. Sin embargo, para  $\gamma = 3.99$  se encontró que la dispersión es más grande (22 %), aunque un mayor tamaño estadístico debería ser tomado para afirmar este hecho. Es decir, a

estas escalas, la difusión en cualquier región de la red donde se efectúe el proceso tiene este rango de variación, el cual es similar al error por repetición ( $\sim 10\%$ ). Más aún, al medir el comportamiento del coeficiente efectivo de difusión  $D/D_0$  en función de  $\gamma$ , establecimos que para  $\gamma > \gamma_c \approx 2.7$ , el medio puede ser descrito como un medio efectivo. Es decir, a estas escalas ya existe una invariancia espacial y  $D/D_0$  converge a un valor estacionario; para el caso en que  $\eta = 3.64$ , este valor es  $D/D_0 \approx 0.7$ .

Con respecto al parámetro  $\eta$ , vemos una rápida saturación hacia  $D/D_0 \approx 0.4$  desde valores  $\eta > 2$ . En términos de la fracción de volumen accesible  $\kappa$ , vemos que  $D/D_0$  varía entre 0.4 a 0.6 en un rango de  $\kappa$  de 0.2 a 0.6, donde los efectos de la profundidad de los canales pueden influir en el hecho de que  $D/D_0$  sature en estos valores.

En escalas menores,  $\gamma = 0.6$ , vemos que el número de alimentadores que confluyen en un determinado nodo inciden en  $D/D_0$ . Con dos alimentadores tenemos que  $D/D_0 \approx 0.4$ , valor que va aumentando a medida que agregamos más alimentadores. Con cinco alimentadores ya tenemos  $D/D_0 \approx 0.8$ , lo cual está de acuerdo con la tendencia asintótica  $D/D_0 = 1$  para muchos alimentadores, es decir, el espacio libre.

La acción de flujo externo periódico de promedio nulo tiene una notable influencia en la aceleración de la difusión. Inclusive para amplitudes de oscilación normalizadas pequeñas  $x/\langle L \rangle \approx 0.6$ , ya observamos que el coeficiente efectivo de difusión  $D$  se duplica respecto al valor sin flujo  $D^*$ . Para valores más altos de  $x/\langle L \rangle$ ,  $D$  aumenta hasta  $\sim 10D^*$  cuando  $x/\langle L \rangle \approx 6.5$ . No obstante, en el intervalo  $2.5 < x/\langle L \rangle < 5$  se observa una región de distinta variación. En todo caso, el flujo externo provoca un incremento de la difusión probablemente debido a un proceso de mezclado efectivo entre las moléculas blanqueadas y no blanqueadas en el transcurso de cada oscilación. Este mezclado puede deberse a procesos de irreversibilidad, sobre todo en los puntos extremos de la oscilación donde el flujo se detiene momentáneamente. En tal intervalo de tiempo, las moléculas blanqueadas y no blanqueadas pueden intercambiar momentum de forma que exista un cambio en sus posiciones, y luego la acción del flujo cause que las trayectorias adquiridas sean distintas que en el ciclo previo.

Haciendo referencia a las posibles aplicaciones en la biología celular u otros campos, usando el método de análisis del FRAP propuesto en este trabajo, se debe tener en cuenta varios aspectos. La aproximación aquí establecida es bidimensional lo que, dependiendo de la estructura biológica, puede no cumplirse adecuadamente. Otro aspecto es el hecho que la herramienta numérica usada se basa en un modelo donde se asume que la fluorescencia recuperada



vuelve a ser igual a la inicial, debido a la suposición que el espacio es suficientemente grande. Además no se han tomado en cuenta procesos de interacción entre las moléculas difusivas y las paredes que podrían subestimar el valor de  $D$ , o por el contrario, en caso de existir procesos activos de transporte,  $D$  sería sobreestimado. Adicionalmente, basado en los resultados presentados, se debe considerar que al realizar un experimento de estas características, la respuesta difusiva obtenida depende de región específica bajo estudio. Mas aún, cuando en el tratamiento numérico descrito, se encontró que podría no existir una escala característica de estas redes.

Uno de los siguientes pasos que resultarían interesantes, sería establecer la respuesta de  $D/D_0$  en función de  $\chi$ , es decir, el comportamiento de la difusión de acuerdo al nivel de dispersión de la red. Adicionalmente, se puede extender el estudio acerca del efecto del volumen accesible al fluido sobre la difusión, específicamente trabajando en un más amplio rango de valores de  $\eta$ .

En el tema del flujo externo periódico, se puede hacer un estudio más profundo de la respuesta de  $D/D^*$ , en dependencia a la forma del ciclo (sinusoidal, triangular) o a su frecuencia. También se puede experimentar con el comportamiento de la difusión bajo un mismo caudal externo a distintos niveles de desorden  $\chi$ .

# Bibliografía

Milton Abramowitz and Irene A. Stegun. *Handbook of Mathematical Functions with Formulas, Graphs, and Mathematical Tables*. Dover, New York, Ninth Dover printing, Tenth GPO printing edition, 1964.

D. Axelrod, D.E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, and W.W. Webb. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical Journal*, 16(9): 1055 – 1069, 1976.

A. Bensoussan, J. L. Lions, and G. Papanicolaou. *Asymptotic Analysis for Periodic Structures*. North Holland, Amsterdam, 1978.

Clifford P. Brangwynne, Gijsje H. Koenderink, Frederick C. MacKintosh, and David A. Weitz. Intracellular transport by active diffusion. *Trends in Cell Biology*, 19(9):423–427, 2009.

George Chiu and Jane Shaw. Optical lithography: Introduction. *IBM Journal of Research and Development*, 41(1&2):3 – 6, 1997.

Jhon Crank. *The Mathematics of Diffusion*. Oxford University Press, New York, 1975.

Tingting Cui-Wang, Cyril Hanus, Tao Cui, Thomas Helton, Jennifer Bourne, Deborah Watson, Kristen Harris, and Michael Ehlers. Local zones of endoplasmic reticulum complexity confine cargo in neuronal dendrites. *Cell*, 148(2):309–321, 2012.

Christopher T Culbertson, Stephen C Jacobson, and J Michael Ramsey. Diffusion coefficient measurements in microfluidic devices. *Talanta*, 56(2):365 – 373, 2002.

Mark J Dayel, Erick F Hom, and A S Verkman. Diffusion of green fluorescent protein in the aqueous-phase lumen of endoplasmic reticulum. *Biophys. Journal*, 76(5):2843–2851, 1999.

- Alberto Diaspro, editor. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Springer Science Business, New York, 2006.
- Cindy E. J. Dieteren, Stan C. A. M. Gielen, Leo G. J. Nijtmans, Jan A. M. Smeitink, Herman G. Swarts, Roland Brock, Peter H. G. M. Willems, and Werner J. H. Koopman. Solute diffusion is hindered in the mitochondrial matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(21):8657–8662, 2011.
- G.A. Frank, M.C. Marconi, and H.R. Corti. An alternate solution of the fluorescence recovery kinetics after spot-bleaching for measuring diffusion coefficients: 1. Theory and numerical analysis. *Journal of Solution Chemistry*, 37(11):1575–1591, 2008.
- Adolfas K. Gaigalas and Lili Wang. Measurement of the fluorescence quantum yield using a spectrometer with an integrated sphere detector. *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.*, 113(1):17 – 28, 2008.
- Raymond E. Goldstein, Idan Tuval, and Jan-Willem van de Meent. Microfluidics of cytoplasmic streaming and its implications for intracellular transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(10):3663–3667, 2008.
- W.G. Gray and P.C.Y. Lee. On the theorems for local volume averaging of multiphase systems. *International Journal of Multiphase Flow*, 3(4):333 – 340, 1977.
- K Jacobson, E Wu, and G Poste. Measurement of the translational mobility of concanavalin a in glycerol-saline solutions and on the cell surface by fluorescence recovery after photobleaching. *Biochim. Biophys. Acta*, 433(1):215–22, 1976.
- F.K. Lehner. On the validity of Fick’s law for transient diffusion through a porous medium. *Chemical Engineering Science*, 34(6):821 – 825, 1979.
- A. Lesne and M. Lagues. *Scale Invariance: From phase transitions to turbulence*. Springer, Berlin, 2012.
- Charles Nicholson. Diffusion and related transport mechanisms in brain tissue. *Reports on Progress in Physics*, 64(7):815, 2001.
- Ivo F. Sbalzarini, Anna Mezzacasa, Ari Helenius, and Petros Koumoutsakos. Effects of organelle shape on fluorescence recovery after photobleaching. *Biophysical Journal*, 89(3):

1482 – 1492, 2005.

Jane M. Shaw, Jeffrey D. Gelorme, Nancy C. LaBianca, Will E. Conley, and Steven J. Holmes. Negative photoresists for optical lithography. *IBM Journal of Research and Development*, 41(1&2):81–94, 1997.

D.M. Soumpasis. Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophysical Journal*, 41(1):95 – 97, 1983.

Patrick Tabeling. *Introduction to microfluidics*. Oxford University Press, New York, 2005.

Matthias Weiss. Challenges and artifacts in quantitative photobleaching experiments. *Traffic*, 5(9):662–671, 2004.

Mengjie Wu, Feng Xiao, Rebecca M. Johnson-Paben, Scott T. Retterer, Xiaolong Yin, and Keith B. Neeves. Single- and two-phase flow in microfluidic porous media analogs based on Voronoi tessellation. *Lab Chip*, 12:253–261, 2012.

Younan Xia and George M. Whitesides. Soft lithography. *Angewandte Chemie International Edition*, 37(5):550–575, 1998.

H X Zhu, S M Thorpe, and A S Windle. The geometrical properties of irregular two-dimensional Voronoi tessellations. *Philosophical Magazine*, 81(12):2765–2783, 2001.