CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS
DA USC (CIEDUS)

TESIS DE DOCTORADO

FABRICACIÓN MEDIANTE LÁSER DE UN ESTIMULADOR ELÉCTRICO PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS: FABRICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y SIMULACIÓN

Ángel Luis Aragón Beloso

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN LÁSER, FOTÓNICA Y VISIÓN

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2019

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Fabricación de un electroestimulador celular con aplicaciones en investigación biomédica

D. Ángel Luis Aragón Beloso

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
2) *En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
3) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
4) *Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Santiago de Compostela, 3 de octubre de 2019

Fdo D. Ángel Luis Aragón Beloso.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Fabricación de un electroestimulador celular con aplicaciones en investigación biomédica

Dña. María del Carmen Bao-Varela y D. Daniel Nieto García

INFORMAN:

Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por D. **Ángel Luis Aragón Beloso**, bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directores de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, 3 de octubre de 2019

Fdo. María del Carmen Bao-Varela

Fdo. Daniel Nieto García

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Agradecimientos

Esto ha sido duro.

Antes de empezar a escribir esta tesis tenía claro que iba a ser difícil. Durante la escritura, pensé que sería inviable. Ahora que ya está acabada sigo sin tener claro cómo ha sido posible que saliese algo decente. Hasta parece un trabajo del que uno pueda estar orgulloso de por vida, como si eso me fuese a hacer mejor persona. O simplemente bueno, con eso me conformaría. Una vez escuché a un sabio decir que *"los que son buenos, son buenos, saes"*, pero yo siempre he creído que el carácter de una persona lo forjan los demás. Y en esas yo he tenido la suerte de estar siempre rodeado de gente que me ha ayudado a sacar lo mejor de mí. Aquello que decía Newton de los enanos y los gigantes, y yo tengo demasiados gigantes a los que dar las gracias.

A Carmen y a Dani, los primeros, tengo demasiado que agradecerles por todo su apoyo cuando ni yo mismo creía en este trabajo y por tener siempre más paciencia que reproches. Esto no hubiera sido posible sin ellos.

A Maite, por ser la primera persona en darme una oportunidad (algún día tendré que pedirle explicaciones). A Justo, por tener siempre un poco de sabiduría para compartir. A Eliseo y a Antonio, por todo su trabajo y su ayuda, siempre perfecta aunque se la pidiese para ayer. A Ana, por no fallarme nunca cuando hacía falta material. A Suso y a Vicente, por tener siempre un ojo atento a todo lo que no se podía arreglar, pero se arreglaba. A Isabel y a Ricardo, por su ayuda para sacar adelante esta tesis. Y a Camilo, por enseñarme la lección más importante de todas.

A mis compañeros de despacho. Los que son, los que fueron y los que pudieron haber sido. A Ferran, amigo, mentor y amigo, en ese orden. A Inma, que podría dominar el mundo pero no lo sabe. A Manu, que sería la perfección hecha persona si le gustase el fútbol. A David, por no dejar nunca

que me aburra. A Bastián, a Ana, a Héctor, a Yago y a Damián, por estar ahí y alegrar el despacho un poco más cada día. A Rafa, que se marchó buscando una vida y encontró algo mejor. A Irene, quien me dio los mejores consejos, la alumna que superó al maestro. Al Sr. Pardo, por seguir llorando las derrotas como sólo unos pocos imbéciles recordamos llorar. Y muy especialmente a María, la que hizo posible esta tesis sin pedir nada a cambio y a quien nunca podré de pagar todas las cervezas que le debo.

Y a mi familia, por supuesto. A mi padre, por hacerme ser como él A mi madre, por ser como la suya. Y a mi hermano, por ser como le dio la gana. Los tres se merecen que los deje en paz y me busque la vida, que ya van siendo horas. Tranquilos, queda poco.

Por último y más importante (lo siento pero es así) agradezco y dedico especialmente este trabajo a la única persona a la que le hace más ilusión que a mí, la mujer que no deja pasar un día sin hacerme mejor de lo que malamente soy. Algún día tendré que rendir cuentas sobre la suerte que tuve.

Lo que viene a continuación es el trabajo de casi cuatro años. Cuatro largos dedicados a toda esta gente, cuatro años donde todos ellos, cada uno a su manera, me han ayudado a centrarme y a sacar adelante lo que me costaba un mundo sacar. Ha sido difícil, me ha quitado años de vida y ha tardado mucho más de lo que me hubiese gustado, pero como todo lo bueno de esta vida, por fin, se ha terminado.

Y, al menos, he acabado antes que Martin.

Este trabajo se ha realizado gracias a la financiación recibida desde la Xunta de Galicia y la Consellería de Cultura Educación e Ordenación Universitaria bajo los contratos ED431E 2018/08 y ED431B 2017/64 y Xunta de Galicia/FEDER (AGRUP2015/11)

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Listado de Siglas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

CPA: Chirped Pulse Amplification

DMEM: Dulbecco's Modified Medium

ELI: Extreme Light Infrastructure

IB: Inverse Brehmstralung

LASER: Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

LOC: Lab-on-a-Chip

MASER: Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation

PDMS: Polidimetilsiloxano

PI: Photoionization

PLA: Pulsed Laser Ablation

PLD: Pulsed Laser Deposition

PVD: Physical Vapor Deposition

TEM: Transversal Electromagnético

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE

RESUMEN 1

1 INTRODUCCIÓN 9

1.1-HISTORIA DEL LÁSER 9

1.2- HISTORIA DEL BIOELECTROMAGNETISMO 14

1.3- SISTEMA ACTUALES DE ELECTROESTIMULACIÓN CELULAR 16

REFERENCIAS 19

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA ABLACIÓN LÁSER 25

2.1-FUNDAMENTOS TEÓRICOS DEL LÁSER 26

2.1.1-Niveles de bombeo 29

2.1.2-Estructura del láser 30

2.1.3-Propiedades de la luz láser 33

2.2-PRINCIPALES PARÁMETROS DE ABLACIÓN 37

2.2.1-Parámetros del láser 37

2.2.2-Parámetros del material. 38

2.2.3-Parámetros ambientales. 41

2.3-MODELO TEÓRICO 41

2.3.1-Interacción láser-materia 43

2.3.2-Formación y expansión de la pluma de ablación 46

2.3.3-Interacción láser-plasma 47

2.4-RESUMEN DEL CAPÍTULO 50

REFERENCIAS 51

3 FABRICACIÓN DEL CIRCUITO ELECTROESTIMULADOR 55

3.1-MATERIALES Y MÉTODOS 56

3.1.1-Sistema láser de nanosegundos 56

3.1.2- Sistema láser de femtosegundos 58

3.1.3-Deposición de capas delgadas 59

3.1.3.1-Técnica del PVD 59

3.1.3.2-Técnica del PLD 61

3.1.3.3-Comparación entre ambas técnicas 62

3.1.4-Caracterización de capas delgadas 64

3.2-SIMULACIONES DEL CAMPO ELÉCTRICO 64

3.2.1-Influencia del material del circuito en el campo eléctrico 68

3.2.2-Influencia del espesor del circuito en el campo eléctrico 70

3.2.3-Influencia de las dimensiones de las pistas sobre el campo. 73

3.3-FABRICACIÓN DEL CIRCUITO 77

3.3.1 – Obtención de capas delgadas 78

3.3.2 – Parametrización láser 83

3.3.2.1 – Cálculo de la relación entre frecuencia de pulsos y velocidad de barrido del láser 87

3.3.2.2 – Cálculo de la relación entre frecuencia de pulsos y amperaje aplicado al láser 88

3.3.3 – Procesado láser 93

3.3.4 – Cableado del circuito 95

3.4- FABRICACIÓN DEL CIRCUITO CON UN LÁSER DE FEMTOSEGUNDOS 97

3.4.1 – Parametrización láser 97

3.4.2 – Procesado láser 100

3.5-RESUMEN 101

REFERENCIAS 103

4 RESULTADOS DE LA ELECTROESTIMULACIÓN CELULAR 105

4.1-MATERIALES Y MÉTODOS 106

4.1.1-Fabricación de los elementos del dispositivo 106

4.1.2-Control de la señal eléctrica 107

4.1.3-Protocolo del cultivo celular 108

4.1.4-Caracterización óptica del cultivo 109

4.2-ENSAMBLAJE Y DISEÑO DEL DISPOSITIVO 110

4.3-SOFTWARE GENERADOR DE SEÑALES 114

4.4-RESULTADOS DE LA ELECTROESTIMULACIÓN CELULAR 117

REFERENCIAS 129

CONCLUSIONES 131

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMEN

La estimulación eléctrica, o electroestimulación, es un tipo de terapia en donde se aplica un impulso eléctrico directamente sobre el paciente con la intención de forzar contracciones y la activación de ciertos órganos o músculos concretos[1]. Este tipo de tratamientos suelen usarse con el objetivo de acelerar procesos de rehabilitación muscular o para reducir el dolor de zonas concretas[2][3].

Además de estas técnicas, la electroestimulación se utiliza también en investigación médica mediante la inducción de impulsos eléctricos en cultivos celulares in vitro para estudiar su reacción ante señales que simulen diferentes anomalías del cuerpo humano[4]. Un ejemplo de este tipo de aplicaciones es el efecto de pulsos en células cardíacas que simulen diferentes patologías como arritmias o condiciones de estrés prolongadas[5], el estudio del crecimiento y del procesado de información de células neuronales[6] o el desarrollo de dispositivos para la separación de componentes bioquímicos[7]. En todos estos casos los electroestimuladores suelen presentar la misma estructura: dos o más electrodos en contacto directo con el cultivo celular donde el estímulo eléctrico consiste en un voltaje o corriente aplicada directamente sobre los mismos[8]. Esta situación no es siempre apropiada debido a los problemas de toxicidad que puedan causar los electrodos, por lo que el diseño de este tipo de dispositivos es extremadamente dependiente de estas restricciones[9][10].

Algunos electroestimuladores más sofisticados utilizan microcircuitos en lugar de simples electrodos[11][12]. La técnica más frecuente para su fabricación es la fotolitografía, una técnica altamente versátil que permite la fabricación de microestructuras con un amplio rango de

tamaños y formas. Como inconveniente, la fotolitografía requiere una elaboración compleja que incluye el uso de varios componentes químicos y en donde se necesitan varias horas de trabajo para conseguir fabricar con éxito los electrodos[13].

Como alternativa, la fabricación de microcircuitos mediante técnicas de ablación láser presenta considerables ventajas en cuanto a tiempo y material al ser una técnica relativamente accesible y económica[14]–[16]. Mientras la fotolitografía necesita varias horas para fabricar una única pieza, con el uso de la ablación láser se puede conseguir procesar la misma superficie en unos pocos minutos. Además, una vez se dispone de una capa de material sobre un sustrato únicamente es necesaria la interacción con el láser para obtener el circuito, sin necesidad de usar componentes químicos adicionales.

La técnica de fabricación láser se basa en el principio de ablación, por el cual a causa de la interacción de la energía del láser con un material conlleva una eliminación localizada de dicho material. Normalmente para producir este fenómeno es necesario considerar la dependencia de la absorción de la radiación por parte del material a procesar, lo que implica que la longitud de onda del láser debe ser escogida cuidadosamente para maximizar la absorción. Por suerte el uso de láseres ultrarápidos evita este inconveniente debido a que la ablación tiene lugar como resultado de la absorción de varios fotones a altas intensidades, lo cual permite procesar materiales que en condiciones normales serían transparentes para esa longitud de onda[17].

Con la intención de aprovechar las ventajas de esta técnica, en esta tesis se propone la fabricación de un electroestimulador celular fabricado mediante ablación láser aplicada a capas metálicas delgadas depositadas sobre sustratos de vidrio. Este dispositivo será además diseñado para evitar los problemas de biocompatibilidad derivados del contacto directo entre los electrodos y el cultivo celular. Para ello se presenta la incorporación de un vidrio delgado sobre el circuito en donde se ubicarán las células. De esta forma no sólo se evitan los problemas de toxicidad, sino que también se suprime el paso de una corriente eléctrica en el cultivo. En consecuencia, cualquier fenómeno

observado tras la electroestimulación será debido únicamente al campo electrostático y no al flujo de corriente.

Para obtener un electroestimulador celular completamente funcional y que aproveche todas estas ventajas, el objetivo de esta tesis será el de fabricar un circuito electroestimulador capaz de inducir un campo electrostático sobre la superficie de un vidrio delgado ubicado sobre el mismo. Para obtener el diseño del circuito se creará un modelo mediante el software COMSOL Multiphysics 5.2a donde se simulará el campo eléctrico que se genera sobre la superficie de un vidrio delgado. El circuito se fabricará mediante técnicas de ablación láser sobre una capa delgada de aluminio depositada sobre un sustrato de vidrio y se ensamblará de forma apropiada para permitir la inclusión de un cultivo celular en condiciones estables y biocompatibles. La última etapa de la tesis será la validación del electroestimulador mediante la obtención de una respuesta celular al campo electrostático.

El desarrollo de esta tesis se presenta dividida en cuatro capítulos a los que se añade un apartado adicional con las conclusiones. El primer capítulo repasará la historia del nacimiento del láser y sus aplicaciones en la industria, analizando el contexto histórico de su invención y su posterior impacto en la sociedad. También se repasará la historia del bioelectromagnetismo desde sus orígenes para dar un estado del arte del estudio de la aplicación de campos eléctricos a cultivos celulares. Finalmente el capítulo ahondará en la creación de los dispositivos de investigación lab-on-a-chip, con un repaso por los principales métodos de fabricación y centrándonos en los beneficios de las técnicas basadas en herramientas láser.

El segundo capítulo de la tesis está destinado a explicar, desde sus conceptos más fundamentales, el proceso de ablación láser. Para ello se comenzará con un estudio básico de la interacción radiación-materia a partir del cual se explicará el mecanismo de amplificación de luz que da origen al láser. Posteriormente se describirán las propiedades únicas de la radiación generada con esta herramienta, destacando aquellas propiedades que la convierten en un instrumento tan esencial para el procesado de superficies y materiales. Después de

sentar las bases del funcionamiento y de las propiedades de un láser se pasará a explicar en detalle los fenómenos que ocurren durante la interacción láser-materia que dan lugar a la ablación láser.

El objetivo del tercer capítulo es mostrar en profundidad todo el proceso para producir desde cero un circuito electroestimulador completo y listo para funcionar. Este capítulo constará de dos bloques que a pesar de mostrarse por separado en la práctica se solapan mutuamente. El primero de ellos es el relativo a la fabricación del circuito. En este se explica el procedimiento para obtener capas delgadas de aluminio con un espesor de 200 nm sobre un sustrato de vidrio, estudiando su fabricación con dos métodos diferentes y justificando la elección del más adecuado para nuestro trabajo. Se explica el método de caracterización de las capas y se muestran los resultados. Posteriormente se detalla el proceso de parametrización para encontrar el conjunto de variables del láser adecuado para optimizar la calidad del circuito fabricado mediante ablación. Este proceso se realiza con dos láseres de diferentes propiedades, uno de ellos fabricado en el régimen de nanosegundo y otro en el de femtosegundo. Tras comparar los resultados de fabricación se justificará la elección de un láser sobre el otro en base a los beneficios de coste, tiempo y calidad.

El segundo bloque del capítulo está centrado en la simulación del campo electrostático generado por el circuito usando el software COMSOL Multiphysics 5.2a. En este subapartado se explicará la creación de un modelo que reproduzca la forma y la intensidad del campo eléctrico generado por un circuito de geometría y dimensiones predeterminadas en la región donde se ubicará el cultivo celular. Se estudiarán los resultados para diferentes parámetros del circuito, principalmente sus dimensiones y su material. Finalmente se buscará la configuración óptima del circuito para lograr el mejor campo posible y se justificarán los modelos escogidos. Las conclusiones de este apartado serán aplicadas en la fabricación del circuito.

El último capítulo tendrá como objetivo exponer los resultados de la exposición de un cultivo de células cardíacas al campo eléctrico generado por el circuito. En un primer apartado se explicará la

fabricación de los componentes necesarios para el ensamblaje del circuito fabricado en el capítulo 3 en una estructura compacta en donde tendrá lugar la estimulación eléctrica. Se hará un repaso por todos los modelos fabricados explicando los problemas surgidos durante su aplicación y las soluciones propuestas hasta llegar a la versión final. En un segundo subapartado se explicará el proceso por el cual se genera la señal eléctrica aplicada al circuito, en donde la forma de la señal es controlada por un programa externo creado en un entorno de LabVIEW, detallando la estructura del código y las funciones que realiza. En un último apartado se detallarán los resultados de la estimulación de diferentes señales eléctricas a cultivos celulares en diferentes tiempos de exposición, con las conclusiones extraídas de los experimentos.

Finalmente, la tesis se cerrará con un último apartado en donde se recopilen todas las conclusiones de la fabricación del dispositivo electroestimulador y de los experimentos llevados a cabo con él. Junto con las conclusiones se llevará a cabo una reflexión acerca de las opciones para las nuevas investigaciones que se han abierto a partir de los resultados de esta tesis y de nuevos experimentos que se podrían llevar a cabo para continuar esta línea de investigación.

REFERENCIAS

[1] V. M. Pomeroy, L. M. King, A. Pollock, A. Baily-Hallam, and P. Langhorne, "Electrostimulation for promoting recovery of movement or functional ability after stroke: Systematic review and meta-analysis," *Stroke*, vol. 37, no. 9, pp. 2441–2442, 2006.

[2] P. Dehail, C. Duclos, and M. Barat, "Electrical stimulation and muscle strengthening," *Ann. Readapt. Med. Phys.*, vol. 51, no. 6, pp. 441–451, 2008.

[3] T. A. Thrasher and M. R. Popovic, "Functional electrical stimulation of walking: Function, exercise and rehabilitation," *Ann. Réadaptation Médecine Phys.*, vol. 51, no. 6, pp. 452–460, 2008.

[4] V. Esteve *et al.*, "Efecto de la electroestimulación neuromuscular sobre la fuerza muscular, capacidad funcional y composición corporal en los pacientes en hemodiálisis," *Nefrología*, vol. 37, no. 1, pp. 68–77, 2017.

[5] N. Tandon, C. Cannizzaro, E. Figallo, J. Voldman, and G. Vunjak-Novakovic, "Characterization of electrical stimulation electrodes for cardiac tissue engineering.," *Conf. Proc. Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. Annu. Conf.*, vol. 1, no. 4, pp. 845–8, 2006.

[6] D. R. Merrill, M. Bikson, and J. G. R. Jefferys, "Electrical stimulation of excitable tissue: Design of efficacious and safe protocols," *J. Neurosci. Methods*, vol. 141, no. 2, pp. 171–198, 2005.

[7] N. M. Geremia, T. Gordon, T. M. Brushart, A. A. Al-Majed, and V. M. K. Verge, "Electrical stimulation promotes sensory neuron regeneration and growth-associated gene expression," *Exp. Neurol.*, vol. 205, no. 2, pp. 347–359, 2007.

[8] N. Tandon and A. C. Smith, "Biomimetic Electrical Stimulation for Cardiac Tissue Engineering," *Electr. Eng.*, vol. 25, no.2 pp. 26-41 2006.

[9] A. K. Dubey, S. D. Gupta, and B. Basu, "Optimization of electrical stimulation parameters for enhanced cell proliferation on biomaterial surfaces," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 98 B, no. 1, pp. 18–29, 2011.

[10] M. Hronik-Tupaj and D. L. Kaplan, "A Review of the Responses of Two- and Three-Dimensional Engineered Tissues to Electric Fields," *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 18, no. 3, pp. 167–180, 2012.

[11] Z. Zou, S. Lee, and C. H. Ahn, "A polymer microfluidic chip with interdigitated electrodes arrays for simultaneous dielectrophoretic manipulation and impedimetric detection of microparticles," *IEEE Sens. J.*, vol. 8, no. 5, pp. 527–535, 2008.

[12] Y. M. Chen, T. W. Chung, P. W. Wu, and P. C. Chen, "A cost-effective fabrication of iridium oxide films as biocompatible electrostimulation electrodes for neural interface applications," *J. Alloys Compd.*, vol. 692, pp. 339–345, 2017.

[13] B. Yafouz, N. A. di. Kadri, and F. Ibrahim, "Microarray dot electrodes utilizing dielectrophoresis for cell characterization," *Sensors (Basel).*, vol. 13, no. 7, pp. 9029–9046, 2013.

[14] C. W. D. Dodds, M. Schuettler, T. Guenther, N. H. Lovell, and G. J. Suaning, "Advancements in electrode design and laser techniques for fabricating micro-electrode arrays as part of a retinal prosthesis," *Proc. Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. EMBS*, pp. 636–639, 2011.

[15] J. Burt *et al.*, "Developments In The Microfabrication Of Biochips Using Laser Micromachining," *In Pract.*, vol. 2, pp. 2–6, 2010.

[16] A. D. Goater *et al.*, "Laser micromachining of optical biochips," *Laser-based Micro- Nanopackaging Assem.*, vol. 6459, p. 645909, 2007.

[17] E. N. Glezer and E. Mazur, "Ultrafast-laser driven micro-explosions in transparent materials," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 71, no. 7, pp. 882–884, 1997.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1 INTRODUCCIÓN

1.1-HISTORIA DEL LÁSER

> Todavía no se ha podido aclarar cómo lograban los marcianos matar hombres con tanta rapidez y tal silencio. Muchos opinan que en cierto modo pueden generar un calor intensísimo en una cámara completamente aislada. Este calor intenso lo proyectan en un rayo paralelo por medio de un espejo parabólico de composición desconocida, tal y como funcionaba el espejo parabólico de los faros. Sea como fuere, es seguro que lo esencial en el aparato es el rayo calórico. Calor y luz invisible. Todo lo que sea combustible se convierte en llamas al ser tocado por el rayo: el plomo corre como agua, el hierro se ablanda, el vidrio se rompe y se funde, y cuando toca el agua, ésta estalla en una nube de vapor.
>
> *The War of the Wolds*, H. G. Wells, 1896

Si tuviésemos que establecer un origen a la historia del láser muy probablemente sería el año 1917, veintiún años después de que H.G. Wells imaginase el concepto de un haz colimado de energía radiante. En ese año, Albert Einstein terminó de desarrollar el concepto de la emisión estimulada[1], el fenómeno de amplificación de luz en el que se basa su funcionamiento.

Como es habitual, la caracterización de este fenómeno no concluyó en un inmediato desarrollo del láser. La mayoría de los trabajos de espectroscopía necesarios para conocer en profundidad los niveles de energía atómicos se desarrollaron durante los años 30[2][3], y no sería hasta la década de 1940 cuando se acabarían de concretar todos los conceptos necesarios para la invención de esta herramienta. Sin embargo, debido a la Segunda Guerra Mundial la atención de la comunidad científica de la época se centró en la región de microondas del espectro electromagnético[4], retrasando la invención del láser.

No sería hasta 1954 cuando el equipo liderado por Charles Townes creó el dispositivo del cual nacería el láser, el máser[5], basado en el principio de emisión estimulada de ondas de microonda (y cuyo nombre viene del acrónimo **M**icrowave **A**mplification by **S**timulated **E**mission of **R**adiation). Townes sugirió entonces que el principio de emisión estimulada utilizado en el máser podría usarse del mismo modo en las regiones visible e infrarrojo del espectro, lo que atrajo de nuevo el interés de la comunidad científica. En consecuencia, no pasó demasiado tiempo hasta que en 1960 Theodore Maiman presentó el primer láser operativo de la historia[6] (Figura 1.1). Esta primera versión se trataba de un láser de rubí con una longitud de onda de 694.3 nm, siendo la primera fuente de radiación electromagnética coherente en la región del espectro visible.

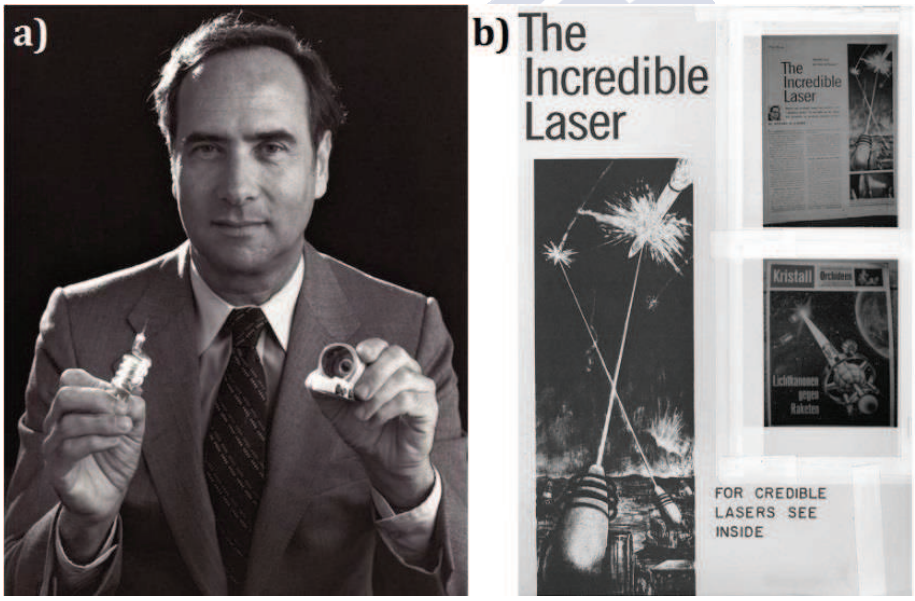


Figura 1.1: a) Theodore Maiman posando con el primer láser de rubí. b) Algunas portadas de la época reaccionando a su invención[7].

Al entusiasmo de la comunidad científica con las posibilidades que ofrecía esta nueva herramienta se le sumó el impaciente y creativo interés de la prensa estadounidense. El propio Maiman intentó sin éxito evitar que le preguntaran sobre las aplicaciones militares de su dispositivo durante la conferencia de prensa donde lo anunció. No mucho más tarde, un artículo de 1962 (figura 1.1b) presentaba el láser como una nueva arma "que puede matar al instante" o "iluminar la

Luna", llegando a citar incluso a altos cargos del ejército que hablaban de un "death-ray gun" portátil[7].

Mientras tanto en el mundo real, durante el período comprendido desde la invención del primer láser de rubí hasta 1968 se acabaron por desarrollar la mayoría de tipos de láseres importantes, desde el primer láser de gas, el helio-neon, modelos como el Nd-YAG o el láser de CO_2 y hasta los diferentes modelos de láser basados en semiconductores[8]. Junto con el desarrollo de los primeros modelos comenzaron a sugerirse y a estudiarse la mayoría de aplicaciones prácticas de esta herramienta, descubriéndose la capacidad del láser para el procesado de materiales, la espectroscopía, la interferometría e incluso las telecomunicaciones[9]. Sin embargo, debido a su fragilidad, los láseres quedaron restringidos a ser herramientas de investigación en ambientes de laboratorio, y no sería hasta que se mejoró su durabilidad y fiabilidad a principios de la década de 1970 cuando se abrirían paso en la industria[8]. A los pocos años el láser era ya una realidad en las cadenas de producción más avanzadas como herramienta de corte, marcado o de alineamiento, y hacia finales de la década irrumpía también en la cultura popular (aunque con escaso respeto por las leyes básicas de la física) con el estreno en 1977 de la película de George Lucas *Star Wars: A new Hope*.

El salto de las aplicaciones exclusivamente industriales a tecnologías más accesibles al gran público se llevó a cabo durante los años 80 y principios de los 90 con la llegada de nuevas tecnologías como el compact-disc, escáneres comerciales e impresoras láser[10]. De forma paralela la tecnología láser impulsó una revolución en el mundo de las telecomunicaciones con el uso de láseres de semiconductor y fibras ópticas[11].

En el mundo de la investigación, una nueva tecnología llegada a finales de los 80 iniciaría otra revolución en el campo de los láseres. La técnica de "Chirped Pulse Amplification" (CPA)[12] suponía una nueva forma de comprimir temporalmente pulsos láseres ultracortos aumentando su ratio de energía por unidad de tiempo, impulsando una notable aceleración al valor máximo de potencia que los láseres eran capaces de producir con el paso del tiempo (Figura 1.2) además de tener un

impacto directo muy favorable en la durabilidad de los láseres de la época.

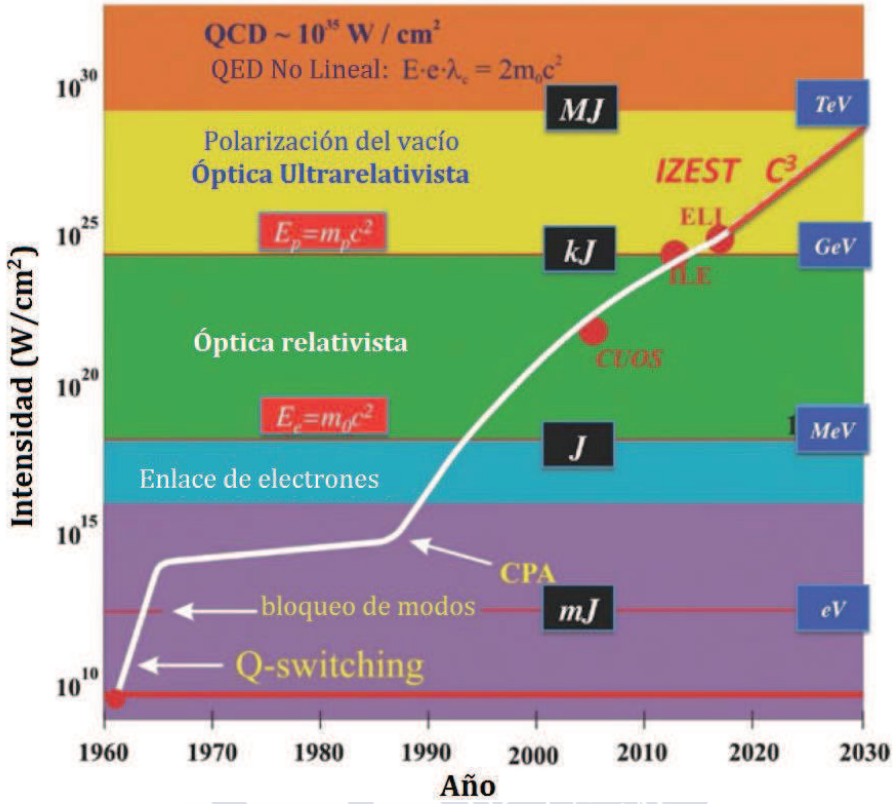


Figura 1.2: Evolución temporal de la máxima intensidad en foco del láser[13]

Con la llegada del CPA, durante la década de los 90 los láseres comenzaron a utilizarse como herramientas de procesado de superficies más avanzadas como taladrado, soldadura, tratamiento térmico, revestimiento de materiales o incluso en deposición de capas delgadas[14][15]. Mientras que los láseres previos no eran capaces de procesar tanta potencia sin sufrir daños internos en su núcleo, el desarrollo de nuevas tecnologías de generación de pulsos láser abrió un abanico de posibilidades para aplicaciones de procesado láser que hasta entonces estaban limitadas a un selecto grupo de materiales[16].

Pero ya desde su nacimiento la influencia e importancia del láser no ha sido exclusiva de la industria. Su presencia ha revolucionado la sociedad con aplicaciones antes impensables en el ámbito de la medicina, las telecomunicaciones y la investigación. Tan sólo desde su

aparición hasta nuestros días el láser ha estado presente en 12 premios Nobel, tal y como se resume en la tabla 1.1:

Tabla 1.1: Listado de Premios Nobel relacionados con el láser[17]

Año	Ganadores	Investigación
1964	N. C. Townes, A. P. Basov	Investigaciones fundamentales para el desarrollo del láser y el máser
1971	D. Gabbor	Holografía realizada con láser
1981	N. Bloemberg, A. Schalow	Desarrollo de espectroscopía láser
1997	S. Chu, W. Phillips, C. Cohen-Tannoudji	Enfriamiento atómico y creación de trampas atómicas mediante láser
1999	A. Zewail	Estudio de reacciones químicas en escalas temporales de femtosegundos
2000	Z. Alferov, H. Kroemer	Invención de heteroestructuras esenciales para optoelectrónica de altas velocidades
2001	E. Cornell, C. Wieman, W. Ketterle	Producción de condensados de Bose-Einstein
2005	R. Glauber	Teoría cuántica de la coherencia óptica
2005	J. Hall, T. Hänsch	Desarrollo de espectroscopía de precisión basada en el láser
2009	C. Kao	Transmisión de luz en fibras ópticas
2017	R. Weiss, B. Barish, K. Thorne	Contribuciones al detector láser LIGO de ondas gravitavionales
2018	D. Strickland, G. Mourou, A. Ashkin	Desarrollo de revolucionarias técnicas en el campo de la física láser

Las investigaciones actuales basadas en el uso del láser siguen siendo un referente internacional. Muchos de los descubrimientos y avances de hoy en día son posibles únicamente gracias a esta herramienta. Algunos de los campos donde el láser juega un papel fundamental son la creación de estructuras de nanotecnología[18], generación de fusión nuclear mediante láseres[19][20] o incluso aplicaciones más ambiciosas de cara al futuro como la transferencia de energía entre satélites[21].

En la actualidad, las instalaciones láser más avanzadas cuentan con láseres capaces de alcanzar intensidades inimaginables hace unas pocas décadas. Como ejemplo, en los laboratorios de la institución europea del ELI (Extremely Light Infrastructure) cuentan con láseres capaces de alcanzar hasta 10 PW de potencia, siendo el láser con mayor potencia disponible hoy en día[22].

1.2- HISTORIA DEL BIOELECTROMAGNETISMO

Históricamente, el ser humano siempre ha asociado la electricidad con la muerte y no con la vida. En la mitología griega, por ejemplo, Zeus lanzaba rayos a sus enemigos para destruirlos y no para revivirlos. No fue hasta 1786 cuando el médico italiano Luigi Galvani descubrió por casualidad la relación entre la electricidad y los seres vivos al inducir una contracción muscular en el cadáver de una rana mientras la manipulaba con unas tijeras metálicas durante una tormenta[23]. Con sus experimentos, Galvani no sólo fue pionero en el campo de la estimulación eléctrica de sistemas biológicos, sino que a largo plazo acabaría por cambiar la percepción social de la electricidad como fuerza puramente destructora, culminándose en 1823 con la creación del mito de Frankenstein por parte de Mary Shelley.

Pero los experimentos de Galvani no estuvieron exentos de cierta controversia. Mientras éste afirmaba que la electricidad era generada por los propios seres vivos y amplificada por el metal, Alessandro Volta había replicado los experimentos de Galvani con una interpretación muy diferente, sosteniendo que la reacción muscular al estímulo eléctrico no implicaba la existencia previa de una corriente generada por el propio animal. Esta polémica terminaría con los experimentos de Alexander Von Humboldt, quien replicando los trabajos de ambos investigadores demostró la existencia de una corriente animal intrínseca[24].

Como consecuencia de los trabajos de Galvani y de la invención de la primera batería por parte de Volta[25] comenzaron a comercializarse los primeros generadores de electricidad estática como parte de una serie de nuevos elementos terapéuticos. Durante más de un siglo se extendió el uso de métodos pseudo-científicos que generaban un “baño de aire eléctrico”, como el dispositivo de “brisa negativa”[26] usado como tratamiento contra el insomnio o las migrañas. Debido a la nula rigurosidad de estas terapias no fue de extrañar que el bioelectromagetismo fuese un campo con muy pobre consideración entre la comunidad científica durante más de un siglo[27].

No fue hasta 1935 cuando Burr y Northrop publicaron las primeras evidencias de la existencia de un voltaje estable en varios sistemas celulares[28]. En sus trabajos afirmaban que el patrón de organización de cualquier sistema biológico era establecido por un campo electromagnético complejo, de corto alcance y considerado cuasi-estático[27]. Investigaciones posteriores encontraron que estos voltajes de comunicación celular se alteran cuando el organismo se ve sometido a un proceso de cambio como el crecimiento o la reparación de una herida[29].

En los años posteriores, las nuevas tecnologías de generación de campos eléctricos desarrolladas durante la Segunda Guerra Mundial, como el uso de tubos fotomultiplicadores para bioluminiscencia[30] encontraron su aplicación en los laboratorios de investigación biológica, impulsando el estudio de la interacción de los campos con los tejidos celulares[24]. En 1941 el ganador del premio Nobel de Medicina Albert Szent-Györgyi[31] sugirió que la energía en los tejidos vivos podría ser transferida mediante electrones excitados moviéndose en matrices semiconductoras[32], y los experimentos llevados a cabo durante los siguientes 30 años le darían la razón[33].

Bajo este modelo se han llevado a cabo numerosos estudios durante las últimas décadas estudiando la estimulación de tejidos celulares con campos electromagnéticos de diferentes frecuencias e intensidades. Concretamente los estudios realizados con campos a bajas frecuencias han sido los que han acaparado mayor atención por tener una mayor penetración en los tejidos[34]. Algunos experimentos sobre aplicación de campos electrostáticos de entre 100 y 1000 V/m en cultivos celulares in vitro resultaron en una migración celular moviéndose en la dirección del campo[35], y otros estudios demostraron que un campo eléctrico de baja frecuencia puede inducir otros efectos a nivel celular como proliferación[30][31], síntesis del ADN[38] y efectos en la actividad metabólica[39] o la producción hormonal[40].

1.3- SISTEMAS ACTUALES DE ESTIMULACIÓN CELULAR

Los mecanismos predominantes en la interacción entre células y campos eléctricos siguen siendo un misterio a día de hoy[41]. Sí se conoce que en general los cambios sufridos en la célula debido a la exposición a campos eléctricos afectan a la membrana celular, interfiriendo en su distribución de carga y en consecuencia alterando la recepción de señales[36][37]. De forma más específica, la interacción de un campo eléctrico externo con la célula puede generar al menos una de estas respuestas:

- El campo puede actuar intracelularmente, afectando al movimiento y concentración de las moléculas del interior de la célula[44].
- El campo puede perturbar el potencial de reposo transmembrana (el potencial establecido a ambos lados de la superficie celular generado por los iones del interior y exterior de la célula). Esto puede alterar la respuesta de la membrana y activar señales para su crecimiento[45].
- El campo puede causar una acumulación de ciertas moléculas sobre la membrana celular, afectando a su constitución[46].

Actualmente en el mundo de la investigación biomédica existen diferentes tipos de estimulación celular para cultivos in vitro. Las más habituales consisten en la aplicación directa de una corriente eléctrica en el medio de cultivo o en el tejido, que suelen alterar la forma de las células e incluso promover su migración[47]. Para conseguir este tipo de estimulación el medio de cultivo debe estar en contacto directo con los electrodos, lo cual presenta ciertos problemas que deben ser evitados. En primer lugar los electrodos deben ser biocompatibles para evitar problemas de toxicidad, y en segundo lugar deben transferir la carga de manera eficiente para evitar su degradación mediante fenómenos electroquímicos[48].

Para crear un entorno apto para la aplicación de campos eléctricos en cultivos celulares (e incluso estudios de naturaleza diferente) muchos laboratorios de investigación desarrollan dispositivos denominados

Lab-On-a-Chip (LOC), dispositivos que integran varias funciones de un laboratorio en un microcircuito de unos pocos milímetros o centímetros cuadrados de superficie. La producción de estos dispositivos comenzó en 1979 con la fabricación del primer dispositivo destinado a aplicaciones en la cromatografía de gases[49] y desde entonces se han estado desarrollando de manera cada vez más compacta y precisa.

La característica principal por la que sobresalen los dispositivos LOC es su capacidad para realizar funciones y operaciones clásicas de un laboratorio en una escala menor. El hecho de poder simular en un volumen tan reducido condiciones concretas de experimentos por lo general más masivos presenta dos claras ventajas: en primer lugar ofrece un gran control sobre las concentraciones moleculares y sus interacciones, y en segundo lugar permite un ahorro considerable tanto económico como en recursos[50].

La irrupción de estos dispositivos ha sido posible gracias a los avances en el ámbito de la microfabricación. La mayoría de ellos se fabrican usando la técnica de la fotolitografía[51]. Esta técnica se basa en la erosión óptica de una resina fotosensible con un patrón predeterminado. La figura 1.3a muestra un esquema de esta técnica:

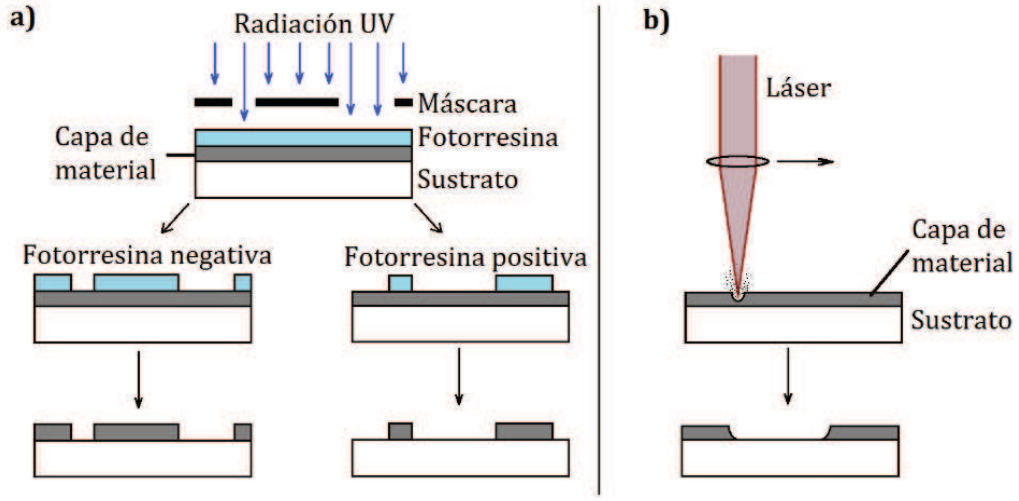


Figura 1.3: Esquema del proceso de fabricación de microestructuras a) mediante fotolitografía y b) mediante ablación láser

Para poder realizar correctamente la técnica de la fotolitografía es necesario un nivel de limpieza exigente en sustrato sobre el que se

obtiene la capa de material con la fotorresina, además de unas condiciones de ambiente y temperatura ideales[52]. Una vez se han preparado todos los componentes se irradia la fotorresistencia con luz ultravioleta con un patrón marcado por la máscara ubicada sobre la misma. En consecuencia, parte de la fotorresina será erosionada debido a la exposición a la radiación, y el patrón resultante puede ser fácilmente procesado para obtener la microestructura diseñada. Esta se trata de una técnica muy precisa con la que es posible una sencilla fabricación de todo tipo de microcircuitos, pero que requiere del uso de varios componentes químicos en unas condiciones muy rigurosamente cuidadas de limpieza y temperatura, además de necesitar varias horas para fabricar por completo una pieza[53].

Como alternativa, la figura 1.3b presenta un esquema de la fabricación de microestructuras mediante técnicas de ablación láser. Se trata de una técnica con muchos menos requisitos ya que únicamente es necesaria la interacción entre una capa delgada de material y un láser focalizado con precisión sobre su superficie[54]. La energía del haz concentrada sobre el material genera un proceso de ablación donde el material es eliminado de forma muy localizada. Si se controla el movimiento y la trayectoria del haz es posible marcar con precisión micrométrica cualquier tipo de patrón o estructura sobre la capa.

En resumen, la técnica de fabricación de microestructuras mediante ablación láser presenta varias ventajas sobre la fotolitografía, donde es necesario un menor uso de componentes y siendo además una técnica mucho más rápida, ya que el procesado láser de una superficie puede realizarse en unos pocos minutos[55].

REFERENCIAS

[1] A. Einstein, "Quantum Theory of Radiation," *Phys. Z.*, vol. 18, pp. 121–128, 1917.

[2] L. W. Strock, "Quantitative dc Arc Spectrochemical Analysis: History of its Development in the Decade 1930--40," Appl. Spectrosc., vol. 23, no. 4, pp. 309–316, 1969.

[3] N. M. Geremia, T. Gordon, T. M. Brushart, A. A. Al-Majed, and V. M. K. Verge, "Electrical stimulation promotes sensory neuron regeneration and growth-associated gene expression," Exp. Neurol., vol. 205, no. 2, pp. 347–359, 2007.

[4] J. Landt, "The history of RFID," IEEE Potentials, vol. 24, no. 4, pp. 8–11, 2005.

[5] A. J. Gross and T. R. W. Herrmann, "History of lasers," World J. Urol., vol. 25, no. 3, pp. 217–220, 2007.

[6] T. H. Maiman, "Stimulated Optical Radiation in Ruby," Nature, vol. 187, no. 4736, pp. 493–494, 1960.

[7] J. Hecht, "A short history of laser development Short history of laser development of Photo-Optical Instrumentation," Opt. Eng., vol. 49, no. 49, pp. 99–122, 2010.

[8] J. L. Bromberg, "The Laser in America, 1950-1970," Bull. Sci. Technol. Soc., vol. 13, no. 2, p. 116, 1993.

[9] J. F. Holzrichter, "High-power solid-state lasers," Nature, vol. 316, no. 6026, pp. 309–314, 1985.

[10] J. F. Ready, Industrial Applications of Lasers. Elsevier, San Diego, 1978.

[11] B. Culshaw and A. Kersey, "Fiber-Optic Sensing: A Historical Perspective," J. Light. Technol., vol. 26, no. 9, pp. 1064–1078, May 2008.

[12] D. Strickland and G. Mourou, "Compression of amplified chirped optical pulses," Opt. Commun., vol. 56, no. 3, pp. 219–221, 1985.

[13] G. Mourou, "Invited paper The ultrahigh-peak-power laser : present and future," vol. 211, pp. 205–211, 1997.

[14] M. Stafe, A. Marcu, and N. N. Puscas, Pulsed Laser Ablation on Solids: Basics, Theory and Applications. Springer, Berñin, 2014.

[15] M. S. Brown and C. B. Arnold, "Laser Precision Microfabrication," Springer Series in Material Sciences, vol. 135, pp. 91–120, 2010.

[16] J. Meijer, "Laser beam machining (LBM), state of the art and new opportunities,"

J. Mater. Process. Technol., vol. 149, no. January, pp. 2–17, 2004.

[17] "https://www.nobelprize.org/." . Fecha de consulta: 01/10/2019

[18] V. K. Pustovalov and V. A. Babenko, "Optical properties of gold nanoparticles at laser radiation wavelengths for laser applications in nanotechnology and medicine," Laser Phys. Lett., vol. 1, no. 10, pp. 516–520, 2004.

[19] R. Kodama et al., "Fast heating scalable to laser fusion ignition," Nature, vol. 418, no. 6901, pp. 933–934, 2002.

[20] T. Ditmire, J. Zweiback, V. P. Yanovsky, T. E. Cowan, G. Hays, and K. B. Wharton, "Nuclear fusion from explosions of femtosecond laser-heated deuterium clusters," Nature, vol. 398, no. 6727, pp. 489–492, 1999.

[21] C. De Santi et al., "GaN-based laser wireless power transfer system," Materials (Basel)., vol. 11, no. 1, 2018.

[22] N. V. Zamfir, "Nuclear Physics with 10 PW laser beams at Extreme Light Infrastructure - Nuclear Physics (ELI-NP)," Eur. Phys. J. Spec. Top., vol. 223, no. 6, pp. 1221–1227, 2014.

[23] M. Bresadola, "Medicine and science in the life of Luigi Galvani (1737-1798)," Brain Res. Bull., vol. 46, no. 5, pp. 367–380, 1998.

[24] M. Bischof, "The History of Bioelectromagnetism," in Bioelectrodynamics And Biocommunication, H. M. W., P. F.A., and U. Warnke, Eds. World Scientific, 1994, pp. 13–47.

[25] G. Pancaldi, "Electricity and Life. Volta's Path to the Battery," Hist. Stud. Phys. Biol. Sci., vol. 21, no. 1, pp. 123–160, 1990.

[26] J. W. Vanable Jr, "A history of bioelectricity in development and regeneration," A Hist. Regen. Res., pp. 151–177, 1991.

[27] C. D. McCaig, A. M. Rajnicek, B. Song, and M. Zhao, "Controlling cell behavior electrically: Current views and future potential," Physiol. Rev., vol. 85, no. 3, pp. 943–978, 2005.

[28] H. S. Burr and F. S. C. Northrop, "The Electro-Dynamic Theory of Life," Q. Rev. Biol., vol. 10, no. 3, pp. 322–333, 1935.

[29] M. Cifra, J. Z. Fields, and A. Farhadi, "Electromagnetic cellular interactions," Prog. Biophys. Mol. Biol., vol. 105, no. 3, pp. 223–246, 2011.

[30] J. N. Abelson, M. I. Simon, M. M. Ziegler, and T. O. Baldwin, Bioluminescence and chemiluminescence, vol. 305. Elsevier, San Diego, 2000.

[31] A. Grzybowski and K. Pietrzak, "Albert Szent-Györgyi (1893-1986): The scientist who discovered vitamin C," *Clin. Dermatol.*, vol. 31, no. 3, pp. 327–331, 2013.

[32] A. Szent–Györgyi, "The study of energy-levels in Biochemistry," *Nature*, vol. 148, no. 3745, pp. 157–159, 1941.

[33] F. W. Cope, "A review of the applications of solid state physics concepts to biological systems," *J. Biol. Phys.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–41, 1975.

[34] A. A. Marino and R. O. Becker, "Biological effects of extremely low frequency electric and magnetic fields: a review.," *Physiol. Chem. Phys.*, vol. 9, no. 2, pp. 131–147, 1977.

[35] R. H. W. Funk and T. K. Monsees, "Effects of electromagnetic fields on cells: Physiological and therapeutical approaches and molecular mechanisms of interaction. A review," *Cells Tissues Organs*, vol. 182, no. 2, pp. 59–78, 2006.

[36] S. M. Ross, "Combined DC and ELF magnetic fields can alter cell proliferation," *Bioelectromagnetics*, vol. 11, no. 1, pp. 27–36, 1990.

[37] A. Foletti, A. Lisi, M. Ledda, F. de Carlo, and S. Grimaldi, "Cellular ELF Signals as a Possible Tool in Informative Medicine," *Electromagn. Biol. Med.*, vol. 28, no. 1, pp. 71–79, 2009.

[38] K. Takahashi, I. Kaneko, M. Date, and E. Fukada, "Effect of pulsing electromagnetic fields on DNA synthesis in mammalian cells in culture," *Experientia*, vol. 42, no. 2, pp. 185–186, Feb. 1986.

[39] M. Milani *et al.*, "Magnetic field effects on human lymphocytes," *Electromagn. Biol. Med.*, vol. 20, no. 1, pp. 81–106, 2001.

[40] K. Paksy, T. Gy, Z. Forgacs, P. Lázár, and G. I, "Influence of sinusoidal 50-Hz magnetic field on cultured human ovarian granulosa cells," *Electromagn. Biol. Med.*, vol. 19, pp. 91–97, 2000.

[41] G. Thrivikraman, S. K. Boda, and B. Basu, "Unraveling the mechanistic effects of electric field stimulation towards directing stem cell fate and function: A tissue engineering perspective," *Biomaterials*, vol. 150, pp. 60–86, 2018.

[42] J. C. Seegers, C. A. Engelbrecht, and D. H. va. Papendorp, "Activation of signal-transduction mechanisms may underlie the therapeutic effects of an applied electric field," *Med. Hypotheses*, vol. 57, no. 2, pp. 224–230, 2001.

[43] K. Nie and A. Henderson, "MAP Kinase Activation in Cells Exposed to a 60 Hz Electromagnetic Field," *J. Cell. Biochem.*, vol. 90, no. 6, pp. 1197–1206, 2003.

[44] M. S. Cooper, J. P. Miller, and S. E. Fraser, "Electrophoretic repatterning of charged cytoplasmic molecules within tissues coupled by gap junctions by externally applied electric fields," *Dev. Biol.*, vol. 132, no. 1, pp. 179–188, 1989.

[45] J. C. Gumbart, F. Khalili-Araghi, M. Sotomayor, and B. Roux, "Constant electric field simulations of the membrane potential illustrated with simple systems.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1818 2, pp. 294–302, 2012.

[46] N. Patel and M. M. Poo, "Orientation of neurite growth by extracellular electric fields," *J. Neurosci.*, vol. 2, no. 4, pp. 483–496, 1982.

[47] S. J. Pelletier *et al.*, "The morphological and molecular changes of brain cells exposed to direct current electric field stimulation," *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, vol. 18, no. 5, pp. 1–16, 2015.

[48] N. Tandon, C. Cannizzaro, E. Figallo, J. Voldman, and G. Vunjak-Novakovic, "Characterization of electrical stimulation electrodes for cardiac tissue engineering.," *Conf. Proc. ... Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. Annu. Conf.*, vol. 1, no. 4, pp. 845–8, 2006.

[49] J. Castillo-León, "Microfluidics and Lab-on-a-Chip Devices: History and Challenges," in *Lab-on-a-Chip Devices and Micro-Total Analysis Systems: A Practical Guide*, J. Castillo-León and W. E. Svendsen, Eds. Cham: Springer International Publishing, Kongens Lyngby, 2015.

[50] J. G. E. Gardeniers and A. Van Den Berg, "Lab-on-a-chip systems for biomedical and environmental monitoring," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 378, no. 7, pp. 1700–1703, 2004.

[51] A. Revzin *et al.*, "Fabrication of poly(ethylene glycol) hydrogel microstructures using photolithography," *Langmuir*, vol. 17, no. 18, pp. 5440–5447, 2001.

[52] T. Adrega and S. P. Lacour, "Stretchable gold conductors embedded in PDMS and patterned by photolithography: Fabrication and electromechanical characterization," *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 20, no. 5, pp 156-162, 2010.

[53] M. H. Wu and G. M. Whitesides, "Fabrication of arrays of two-dimensional micropatterns using microspheres as lenses for projection photolithography," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 78, no. 16, pp. 2273–2275, 2001.

[54] F. Rey-Garcia *et al.*, "Fabrication of metal-on-glass high-pitch adapters between VLSI electronics and semiconductor sensors by laser ablation," *J. Light. Technol.*, vol. 31, no. 14, pp. 2327–2331, 2013.

[55] A. Aragón *et al.*, "Fabrication of a Cell Electrostimulator Using Pulse Laser

Deposition and Laser Selective Thin Film Removal," in *Laser Ablation - From Fundamentals to Applications*, T. E. Itina, Ed.: IntechOpen, Rijeka, 2017.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA ABLACIÓN LÁSER

El interés actual en el uso del láser está relacionado con las propiedades únicas que presenta esta herramienta. Su altísima coherencia espacial permite focalizar y direccionar la energía de forma extremadamente eficiente, conservando altas densidades de energía. Su monocromacidad, además, permite ajustar y seleccionar excitaciones concretas de bandas de electrones. En conjunto, todas estas propiedades convierten al láser en una herramienta altamente versátil para todo tipo de aplicaciones.

El procesado láser de materiales se aprovecha de todas estas ventajas, obteniendo regiones muy localizadas con enormes incrementos de temperatura, lo cual permite tratamientos específicos con resoluciones espaciales muy bajas. Ya desde poco después de su invención, el láser fue reconocido como una herramienta muy valiosa para la eliminación de material. La ablación láser, es decir, el proceso de eliminación de material causado por procesos térmicos microlocalizados a causa de pulsos de nano hasta femtosegundos, se alzó pronto como una de las propuestas más interesantes para la fabricación de microcircuitos o el microprocesado de superficies con aplicaciones en electrónica, en industria, biomedicina, nanotecnología…

La principal ventaja de este proceso deriva de su capacidad para localizar temporal y espacialmente la interacción láser-materia, la cual puede producir altísimas ratios de calentamiento/enfriamiento del material, hasta llegar a 1000 K/ns en volúmenes muy reducidos[1][2]. Esta propiedad única de focalizar la absorción de energía en regiones tan pequeñas hace que el material cercano a la zona de ablación quede

prácticamente intacto, consiguiendo una resolución espacial de apenas unas micras con un control altísimo sobre todo el proceso.

2.1-FUNDAMENTOS TEÓRICOS DEL LÁSER

Para entender cómo funciona un láser debemos entender las bases de la interacción radiación-materia. Al hablar de la materia partiremos del hecho de que los sistemas atómicos existen en niveles discretos de energía, por lo que para realizar una transición entre dos niveles necesitarán absorber o emitir la cantidad de energía correspondiente en forma de fotón[3]. La frecuencia ($\boldsymbol{\nu}$) de ese fotón, absorbido o emitido, está relacionada con la diferencia de energía entre ambos niveles ($\mathbf{E_2}$ y $\mathbf{E_1}$) según la ecuación de Bohr:

$$E_2 - E_1 = h\nu \tag{2.1}$$

Donde **h** es la constante de Planck. Con este modelo de transición entre dos estados energéticos se explican los tres fenómenos fundamentales de la interacción radiación-materia: absorción, emisión espontánea y emisión estimulada [4]. Los tres casos se representan en el esquema de la Figura 2.1:

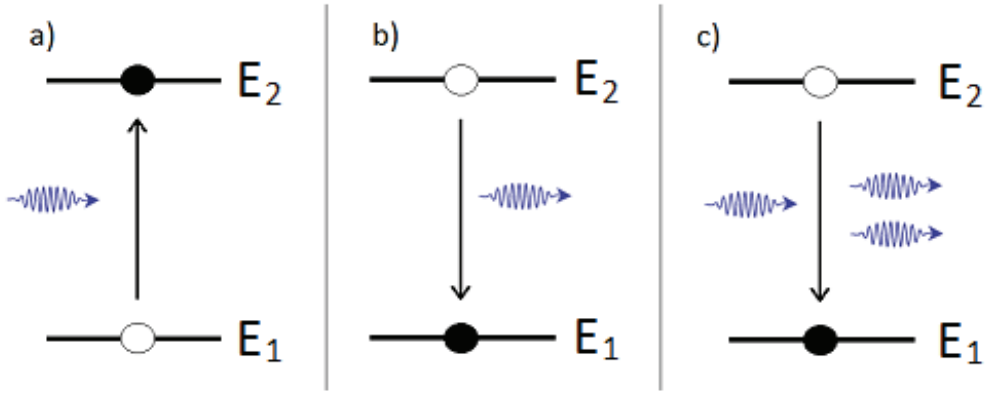


Figura 2.1: Esquema de los principales procesos de interacción radiación materia: a) absorción, b) emisión espontánea y c) emisión estimulada.

El primero de los fenómenos de interacción radiación-materia, la absorción, está representado en la figura 2.1a y se produce cuando un electrón interacciona con un fotón cuya longitud de onda, de acuerdo

con la ecuación de Bohr, corresponde a la diferencia de energía entre los niveles en los que se produce la transición. El electrón absorberá al fotón para alcanzar un estado energético mayor, obedeciendo a las leyes de conservación de la energía. En la figura 2.1b se representa el fenómeno de emisión espontánea, en el que un electrón realiza una transición hacia un nivel menos energético, y en donde la diferencia de energía se emite en forma de fotón.

El fenómeno fundamental de los tres para explicar el funcionamiento del láser es el representado en la figura 2.1c, el de la emisión estimulada[5]. Este caso se produce cuando la interacción entre el fotón y el electrón induce una transición atómica hacia un estado de menor energía, emitiéndose un segundo fotón en el proceso. Para que se produzca la emisión estimulada es necesario que la energía del fotón incidente corresponda a la diferencia de energía entre ambos niveles[6].

Un tratamiento cuántico de la interacción radiación materia demuestra que el campo generado por emisión estimulada es completamente indistinguible del campo incidente, conservando las mismas características espectrales y todas sus propiedades de direccionalidad, fase y polarización[7].

El proceso de emisión estimulada es también el menos común en la naturaleza, ya que en condiciones normales un cuerpo en equilibrio térmico tiene la mayoría de sus átomos en el estado de menor energía[6], por lo que ante la presencia de un campo eléctrico la interacción radiación-materia estará dominada por los fenómenos de absorción y posterior emisión espontánea. Un haz incidente propagándose en la dirección $\mathbf{z}$ con una intensidad $\mathbf{I(z)}$ a través de un material con una densidad de átomos $\mathbf{N_1}$ y $\mathbf{N_2}$ en dos niveles de energía que satisfagan la ecuación (2.1) sufrirá un decrecimiento en su intensidad debido a la absorción dado por [1]:

$$I(z) = I(0)e^{-\alpha z} \tag{2.2}$$

Donde $\boldsymbol{\alpha}$ es el coeficiente de absorción, el cual para un haz gaussiano viene dado por la ecuación:

$$\alpha = \left(\frac{c^2}{4\pi\nu^2\tau}\right)\sqrt{\frac{ln2}{\pi}}\left(\frac{N_1}{\Delta\nu}\right) \tag{2.3}$$

En donde $\boldsymbol{\tau}$ es el tiempo de vida media para la emisión espontánea, $\mathbf{c}$ está referido a la velocidad de la luz en el interior del material y $\boldsymbol{\Delta\nu}$ es la anchura-mitad de la frecuencia del haz.

La amplificación por emisión estimulada, sin embargo, aumenta la intensidad del haz de acuerdo con la siguiente expresión:

$$I(z) = I(0)e^{gz} \tag{2.4}$$

Donde $\mathbf{g}$ es el coeficiente de ganancia, el cual se calcula de forma muy similar al coeficiente de absorción como:

$$g = \left(\frac{c^2}{4\pi\nu^2\tau}\right)\sqrt{\frac{ln2}{\pi}}\left(\frac{N_2}{\Delta\nu}\right) \tag{2.5}$$

La similitud entre ambas expresiones denota que son procesos inversos. En conjunto, uniendo ambas expresiones se obtiene que la intensidad del haz a lo largo del material variará según la siguiente ecuación[1]:

$$I(z) = I(0)exp\left\{\left(\frac{c^2}{4\pi\nu^2\tau}\right)\sqrt{\frac{ln2}{\pi}}\left(\frac{1}{\Delta\nu}\right)(N_2 - N_1)z\right\} \tag{2.6}$$

De la expresión 2.6 se deduce que si $\mathbf{N_1 > N_2}$ la intensidad del haz disminuirá debido a la predominancia de la absorción, y sólo en el caso de que $\mathbf{N_2 > N_1}$ existirá amplificación. Para obtener pues un láser será necesario modificar el equilibrio energético de un material para que los niveles más altos sean también los más poblados, actuando así los átomos como almacenes de energía. Esta situación es sostenible sólo si el material está recibiendo energía de una fuente externa, denominada bombeo, que permitirá una absorción constante de energía superpoblando los niveles mayores[8]. Este estado se denomina inversión de población, y será imprescindible para obtener luz láser.

Como consecuencia a la inversión de población, una onda electromagnética incidente con una frecuencia adecuada será

amplificada por el medio debido a que el fenómeno predominante será la emisión estimulada, emitiendo fotones adicionales. El resultado es que la energía bombeada inicialmente al material es extraída de los átomos y proporcionada al campo eléctrico.

En resumen: cuando un material es estimulado por una fuente externa de forma que la mayoría de sus átomos se encuentren en los niveles más energéticos dicho material será capaz de amplificar radiación incidente a la frecuencia correspondiente a la diferencia de niveles energéticos. De este proceso se deriva el conocido acrónimo "**L**ight **A**mplification by **S**timulated **E**mission **R**adiation".

2.1.1-Niveles de bombeo

A la hora de explicar los fundamentos de la generación de un láser hemos asumido la hipótesis de un material con dos niveles de energía y sus transiciones. Sin embargo, para cualquier medio sólido existen muchos más niveles de energía con procesos de excitación y relajación complejos. Cualquier esquema que represente con exactitud el funcionamiento de un láser debe incluir varios niveles de energía. Los principios de su funcionamiento, sin embargo, pueden ser entendidos a través de los idealizados modelos de tres y cuatro niveles, representados en la figura 2.2:

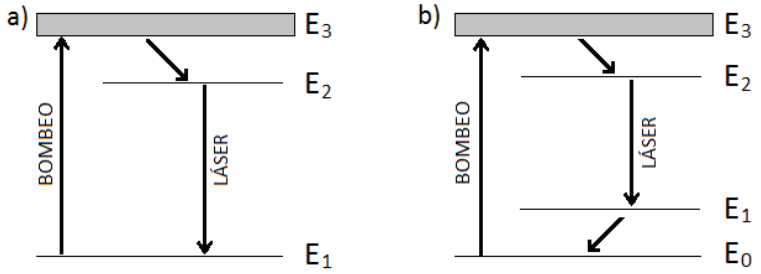


Figura 2.2: Esquema de bombeo láser de a) sistema de tres niveles y b) sistema láser de cuatro niveles.

En la figura 2.2a se representa el modelo de tres niveles. En este modelo los átomos del material se encuentran inicialmente en el estado energético E_1 y son excitados mediante el bombeo al nivel E_3.

En general esta energía corresponde a un conjunto de bandas de energía muy cercanas entre sí, de modo que el bombeo pueda ser proporcionado por una banda de frecuencias más ancha que en el caso idealizado de dos niveles. En este caso la mayoría de los átomos son transferidos en rápidas transiciones a la banda de energía E_2 sin emitir radiación en el proceso, de forma que la energía perdida por el electrón se transfiere directamente a la red mediante otros mecanismos. Finalmente, el electrón vuelve a la banda de valencia original E_1, siendo esta transición la responsable de la emisión láser.

En el sistema de cuatro niveles (figura 2.2b), a diferencia del caso anterior la transición láser no se realiza desde un estado excitado hacia el fundamental (representado aquí por E_0), sino hacia otro estado de energía intermedio E_1. Por lo demás este sistema funciona igual que el de tres niveles, con rápidas transiciones $E_3 \rightarrow E_2$ y $E_1 \rightarrow E_0$, ambas sin radiación. Lo interesante de este sistema es que debido a que la banda E_1 está tan escasamente poblada la probabilidad de absorción $E_1 \rightarrow E_2$ es muchísimo más reducida, por lo que la eficiencia del proceso aumenta considerablemente.

2.1.2-Estructura del láser

A pesar de que la producción de luz láser puede obtenerse de varias maneras existen ciertos elementos que, por imprescindibles, son comunes a todos los láseres. El primero de ellos es el denominado medio activo, un cuerpo en donde se amplificará la luz incidente y en el que la inversión de población sea fácilmente alcanzable. Para ello es necesario el segundo elemento, la fuente de bombeo, que proporcione la energía que absorba el medio activo[9].

En función del medio activo utilizado se distinguirán distintos tipos de láseres con sus correspondientes características únicas. En el caso de los láseres de medio activo gaseoso, por ejemplo, presentan la ventaja de que el material es relativamente barato, con un volumen adaptable y homogéneo de material que no sufrirá daños en su estructura y en donde cualquier sobrecalentamiento se puede solventar expulsando gas del recinto.

En el caso de los láseres de estado sólido su estructura más representativa es la de un oscilador láser, es decir, un medio activo de forma habitualmente cilíndrica situado entre dos superficies reflectantes (una de ellas parcialmente) tal y como se representa en la figura 2.3[8]:

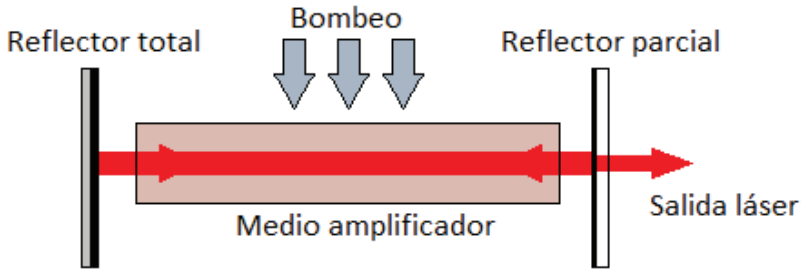


Figura 2.3: Esquema de un oscilador láser.

La luz láser oscila constantemente entre ambos espejos, siendo realimentada a cada paso por el medio activo. Uno de los reflectores permite la transmisión de una parte de la luz, siendo esta la salida del sistema láser. En esta estructura caracterizamos tres elementos principales para la producción de luz láser:

1. El material principal que ejerce como medio activo para la amplificación.
2. El activador, consistente en iones con los que se dopa al material principal y cuya distintiva configuración electrónica favorece las condiciones para la emisión estimulada.
3. La fuente de bombeo óptica.

Para este último punto los láseres de estado sólido con fuentes de bombeo de diodo presentan contundentes ventajas sobre otros mecanismos, de entre las que se destacan especialmente las siguientes:

- Gran eficiencia en la conversión de energía eléctrica – óptica (de aproximadamente el 50%), por lo que no es necesaria una fuente de alimentación tan potente como en otros casos, disminuyendo tanto el consumo eléctrico como el sobrecalentamiento del sistema.

- Una mayor vida media en comparación con las lámparas de bombeo, superando con frecuencia las más de 10.000 horas de uso.
- La estrecha región espectral de emisión de los diodos láser hace posible excitar directamente transiciones electrónicas concretas sin malgastar potencia emitiendo en otras regiones del espectro.

El prototipo de láser de estado sólido es el de rubí, por ser el primer láser fabricado, pero en la actualidad el cristal de granate de itrio y aluminio dopado con impurezas de neodimio (Nd:YAG) es el de uso más común.

Los iones usados típicamente como activadores corresponden a los metales de transición, como el cromo o el cobalto, o a los elementos denominados tierras raras, correspondientes al grupo de elementos cuyo número atómico va del 58 al 71[6]. El motivo es que estos elementos comparten una capa interior con huecos sin ocupar electrónicamente que implican la presencia de bandas de fluorescencia estrechas, las cuales según la ecuación 2.5 favorecen la ganancia y reducen los requisitos para alcanzar la inversión de población.

Como materiales principales los cristales resultan ser una opción muy interesante al presentar muchas de las características deseables en un medio activo. Pueden ser fabricados en piezas de gran variedad en forma y tamaño, desde fibras con diámetros de unas pocas micras hasta cilindros de gran longitud, siempre con una gran calidad óptica, y disponen además de una conductividad térmica menor que la mayoría de otros medios. Otra diferencia importante es que las líneas de emisión de los iones en cristales son más amplias, aumentando la inversión de población necesaria para producir la misma ganancia en comparación con otros medios. Sin embargo, este incremento en la anchura de las líneas de emisión conlleva un incremento en la absorción de la luz de bombeo y permite un mayor almacenamiento de la energía.

Con estas características, el cristal de ortovanadato de itrio dopado con neodimio, $Nd:YVO_4$, presenta propiedades que son especialmente relevantes para ejercer como medio activo en un láser de diodo[10]:

una gran tendencia a la emisión estimulada (hasta cinco veces mayor que en Nd:YAG) y una fuerte absorción para luz de 809 nm. Los espectros de absorción y emisión y sus transiciones se muestran en la figura 2.4:

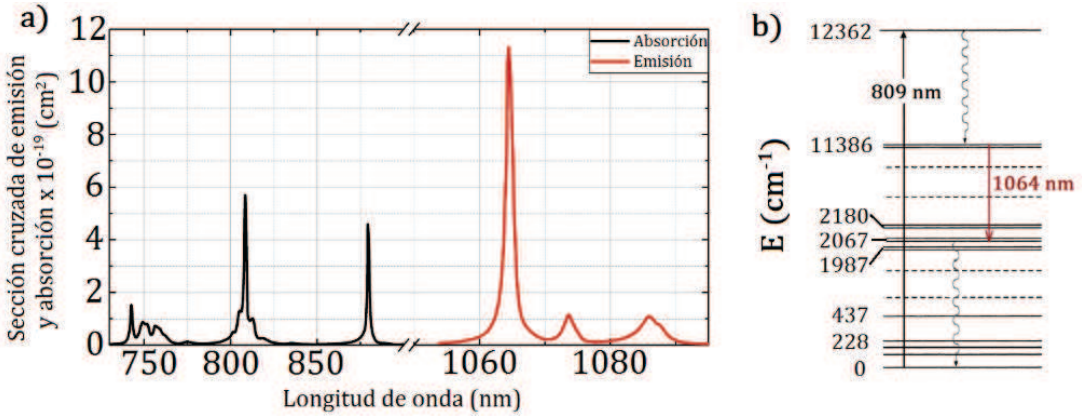


Figura 2.4: a) Espectros de absorción y emisión y b) esquema de niveles energéticos para un cristal de Nd:YVO_4[11][12].

Como se observa en la figura 2.4a, el cristal de Nd:YVO_4 presenta una fuerte capacidad de absorción para una longitud de onda de 809 nm. Un diodo láser ejerciendo de fuente de bombeo a esa misma longitud de onda tendrá siempre una eficiencia mucho mayor que la de una lámpara que abarque un espectro mucho más amplio en frecuencias cuya absorción es considerablemente menor. La figura 2.4b muestra el sistema de 4 niveles para la emisión láser del Nd:YVO_4, con un bombeo a una energía de 809 nm, una transición sin emisión de radiación hacia el nivel $^4F_{3/2}$ y la transición láser de 1064 nm desde este nivel hacia el $^4I_{11/2}$, seguido de otra transición sin radiación hasta el nivel fundamental.

2.1.3-Propiedades de la luz láser

Las aplicaciones de los láseres dependen de las inusuales características de este tipo de luz, significativamente diferentes de las fuentes convencionales. Y aunque sus principales características no son independientes entre sí, sino que están fuertemente relacionadas

unas con otras, por simplicidad es conveniente estudiarlas por separado.

Monocromacidad: La capacidad de los láseres de emitir luz con un espectro tan definido alrededor de una única frecuencia se debe a dos circunstancias. La primera se deriva de la ecuación 2.1, según la cual sólo la frecuencia correspondiente a la diferencia de energía de la transición entre niveles es amplificada. La segunda circunstancia deriva de la propia cavidad en donde se genera la luz y en donde únicamente son permitidas las frecuencias correspondientes a la de resonancia. Esta última es precisamente la que permite alcanzar un espectro mucho más estrecho (con un valor $\Delta\nu_L$ de apenas unos pocos herzios) que la propia anchura correspondiente a la de la transición energética[13].

Colimación: Una de las características más importantes de la radiación láser es su capacidad para ser colimada, dirigida e incluso focalizada con mucha facilidad. Para fuentes de luces convencionales, cuya luz se esparce en todas las direcciones en un ángulo sólido de 4π estereorradianes (sr), es casi imposible recoger de forma eficiente toda esa energía. Para un láser, sin embargo, debido a su pequeño ángulo de divergencia resulta muy sencillo recoger y redirigir su energía incluso a grandes distancias de la fuente de emisión.

Es importante destacar que la divergencia de un láser, si bien es muy pequeña, nunca es cero. La existencia de un valor mínimo para este parámetro no nace de limitaciones en ingeniería sino de las limitaciones físicas del proceso debido al fenómeno de la difracción[14].

Perfil espacial: Existen ciertos perfiles distintivos para la intensidad de un haz de luz láser a lo largo de la sección transversal. Estos perfiles espaciales, denominados modos transversales electromagnéticos (TEM), tienen su origen en la resonancia de la luz amplificándose en el interior del oscilador y está relacionada con la propia geometría de la cavidad.

Los modos TEM se nombran con dos subíndices (TEM_{mn}) que representan los nodos de los modos de oscilación perpendiculares a la dirección de propagación. De este modo, e independientemente de la forma de la cavidad de oscilación, el modo TEM_{00} corresponderá siempre a un perfil de haz gaussiano, mientras que los modos de orden superior presentarán patrones que dependen de la geometría de la cavidad[15].

Comportamiento temporal: Mientras que la mayoría de fuentes de luz convencionales presentan un comportamiento de emisión continuo, los láseres ofrecen la posibilidad de trabajar en un amplio rango de pulsos de diferente duración temporal. Aún incluso cuando trabajan en modo continuo, los láseres presentan fluctuaciones en su intensidad debido a diferentes factores tales como efectos térmicos en el medio activo o a causa de los diferentes modos longitudinales del interior de la cavidad.

Los láseres de estado sólido operan en su mayoría en modo pulsado, con pulsos de duración de milisegundos, en el caso de los láseres de Rubí, hasta pulsos de decenas de picosegundos para el caso de algunos cristales dopados con neodimio. Los intervalos de tiempo entre pulsos varían en frecuencias desde emisiones de un pulso por segundo hasta varias decenas de kilohercios[16], [17].

Coherencia: La coherencia espacial se define de forma simple como una propiedad que presenta una onda electromagnética cuando es capaz de mantener constante la diferencia de fase entre dos puntos separados en el espacio. El alto grado de coherencia espacial de la radiación láser es consecuencia del hecho de que la distribución espacial del campo del haz generado por emisión estimulada es un modo del oscilador óptico.

La coherencia temporal, por otra parte, existe si para un mismo punto en dos momentos de tiempo diferentes (t y $t+\tau$) la diferencia de fase entre ambos tiempos para un retardo τ concreto permanece constante independientemente del valor de t. Si esto último ocurre para cualquier retardo τ se dice que la onda presenta una coherencia espacial perfecta, mientras que si esto ocurre únicamente para

tiempos menores que τ_0 se definirá este como el tiempo de coherencia de una onda.

El concepto de coherencia temporal está estrechamente ligado al de monocromacidad, ya que se puede demostrar que el tiempo de coherencia de una onda está relacionado con la anchura de su espectro mediante la simple relación $\tau_0 \approx 1/\Delta\nu_L$. El alto grado de coherencia temporal de un láser es entonces debido a su altísimo grado de monocromacidad[18].

Radiancia: La radiancia de una fuente de luz se define como la potencia emitida por unidad de área y por ángulo sólido. La altísima radiancia de los láseres deriva precisamente de su capacidad para emitir elevados picos de potencia en ángulos sólidos muy pequeños, del orden de 10^{-6} sr[19].

La importancia de esta magnitud está en que una alta radiancia deriva en la capacidad de proporcionar una alta irradiancia (potencia emitida por unidad de área) en una superficie, el cual es un factor imprescindible para realizar aplicaciones de procesado de materiales. En este campo, el desarrollo de sistemas láser diseñados específicamente para maximizar la radiancia ha llegado a producir láseres de cristales con neodimio capaces de alcanzar radiancias de $2x10^{17}$ W/cm^2 sr. Para láseres más sencillos de He-Ne, los valores están en torno a los 10^6 W/cm^2 sr. Por comparar, el sol presenta una radiancia de alrededor de 130 W/cm^2 sr[1].

Potencia: Uno de los aspectos más decisivos a la hora de diferenciar los láseres del resto de fuentes de luz es su capacidad para generar elevadísimas potencias. Esto se debe a su capacidad para concentrar la energía tanto espacial como temporalmente en regiones de unas pocas micras de diámetro y en intervalos del orden de hasta femtosegundos.

Los láseres de estado sólido son los que alcanzan picos de mayor potencia en la actualidad. Para los láseres de neodimio comerciales de pulsos de nanosegundos de pueden obtener potencias de hasta 10^{11} W [6]. En la actualidad, los láseres experimentales más potentes pueden alcanzar potencias de hasta 10^{16} W[20][21].

2.2-PRINCIPALES PARÁMETROS DE ABLACIÓN

Cuando se estudia el proceso de interacción láser-materia que deriva en el proceso de ablación tan importante es tener en cuenta los parámetros del láser como del material a procesar. Las magnitudes más relevantes serán pues su respuesta ante la radiación incidente y su respuesta ante el aumento de temperatura localizado en su interior. En general, podemos dividir las magnitudes más relevantes en tres categorías en función de si dependen del láser, del material o del ambiente en el que se produce la interacción.

2.2.1-Parámetros del láser

En esta categoría se engloban los parámetros que dependen exclusivamente del láser utilizado para el proceso de ablación:

- **Longitud de onda:** este parámetro está predeterminado por las propias características del láser. En la mayoría de sistemas láser no se tiene ningún control sobre el mismo, aunque algunos láseres permiten la opción de elegir entre varias longitudes de onda posibles. Cabe destacar el caso de los osciladores paramétricos ópticos en cuyo caso la longitud de onda del láser puede variar en un rango continuo.
- **Frecuencia de pulsos:** la cantidad de pulsos por segundo que emite el láser. Cuando la densidad temporal de pulsos relativamente baja no existe interacción entre pulsos consecutivos y el resultado del proceso de ablación se puede explicar con la interacción de cada pulso por separado. Cuando esta frecuencia de pulsos alcanza un valor lo suficientemente alto el material no es capaz de disipar por completo el aumento de temperatura localizado debido al primer pulso, influyendo esto en la interacción con el segundo, apareciendo efectos de acumulación que influyen en el resultado final del proceso.
- **Duración de pulso:** este parámetro definirá el régimen de ablación en el que nos encontremos. Para pulsos relativamente largos (nanosegundos) la ablación se producirá en una transición del material de fase sólida a fase líquida y de ahí a vapor,

mientras que para pulsos ultracortos (femtosegundos) la transición será de sólido a vapor directamente, lo cual influye de manera directa tanto en la calidad como en la eficiencia del proceso.

- **Tamaño del spot:** para una misma energía por pulso el tamaño del spot definirá la densidad espacial de energía que recibe el material. Este parámetro no es intrínseco al láser y depende directamente del sistema óptico utilizado a la salida del sistema Para optimizar el proceso de ablación se buscará que la superficie del material se encuentre en el plano focal del sistema, donde el tamaño del spot será mínimo, de forma que se maximice la irradiancia del haz.
- **Energía:** la energía de cada pulso láser está directamente relacionada con la cantidad de energía absorbida por el material y en consecuencia con la cantidad de material eliminado. A partir de la energía y del tamaño del spot se calcula un nuevo parámetro, la fluencia[22], definido como la energía por unidad de área. Este parámetro adquiere especial relevancia en el área del tratamiento láser de superficies.

Por lo general, a la hora de ablacionar un sólido el sistema láser es el sistema que más flexibilidad ofrece a la hora de parametrizar. Mientras que en las condiciones ambientales la única regulación es el nivel de vacío que podemos alcanzar (suponiendo que el proceso se realice en el interior de una cámara de vacío) y cada material presenta sus propias propiedades, un mismo sistema láser ofrece la suficiente versatilidad como para conseguir diferentes tipos de aplicaciones. La fluencia, el tamaño del haz y la frecuencia de repetición usualmente permiten modularse en un rango suficientemente grande para permitir procesar toda clase de materiales con diferentes resultados.

2.2.2-Parámetros del material.

La importancia del material seleccionado como blanco de ablación reside tanto en su respuesta a la radiación incidente como la facilidad con la que la energía se propaga en su interior[23]. Para ello

se define la profundidad de penetración del pulso láser como la suma de las profundidades de penetración óptica y térmica, definidas como[1]:

$$\Delta h = l_\alpha + l_{th} = \frac{1}{\alpha} + 2\sqrt{D\tau_P} \tag{2.7}$$

En donde $\boldsymbol{\alpha}$ es el coeficiente de absorción del material, $\boldsymbol{D}$ su coeficiente de difusión térmica y $\boldsymbol{\tau_P}$ es la duración del pulso. Para materiales con alta conductividad térmica (metales y semiconductores) el procesado de alta calidad sólo puede conseguirse con pulsos de pico o femtosegundos[24]. Esto se debe a que la zona afectada térmicamente crece con la duración de pulso. En estos casos la profundidad de penetración óptica suele ser del orden del 10% de la térmica, pudiendo despreciarse en la mayoría de los casos.

Es necesario aclarar que estos valores de penetración son siempre estimados y el valor real depende de otros factores como la densidad de energía. Esta aproximación también se debe tener en cuenta a la hora de calcular el diámetro del cráter generado, el cual raramente coincide con el diámetro del pulso láser ($\boldsymbol{\phi_L}$). Para un haz gaussiano de fluencia **F** determinada, el cráter generado dependerá de la fluencia umbral del material de esta forma[6]:

$$\phi(F) = \phi_L \sqrt{\frac{1}{2} ln \frac{F}{F_{th}}} \tag{2.8}$$

Los bordes del haz con energía inferior a la del umbral de ablación del material pueden operar sobre la pieza de forma no deseada, causando daños térmicos. Por ello cuando se desea optimizar la calidad del procesado se desea un perfil abrupto del haz.

En resumen, el volumen eliminado en el proceso de ablación depende de la profundidad de penetración y del diámetro del spot. Se espera pues que reduciendo el diámetro y la duración del pulso (manteniendo constante la energía) el proceso aumente en precisión y definición. Por otra parte, la composición de fase del material eliminado depende fuertemente de la fluencia del haz. A mayor intensidad del láser mayor es la ratio a favor del estado de vaporización. Desde este punto de vista un procesado de mayor precisión se alcanza con láseres de alta

fluencia. La conclusión para optimizar el proceso con la mayor definición posible es evidente: alta energía lo más localizada posible, tanto espacial como temporalmente[25][26].

Si tenemos en cuenta la calidad de la estructura producida, los experimentos de Ablación por Laser Pulsado (en inglés PLA) indican que las de mayor calidad se consiguen para fluencias apenas un poco mayor que la fluencia umbral, que para pulsos de nanosegundos en metales suele ser del orden de 1 a 10 J/cm^2[27]. En estas condiciones la ratio o tasa de ablación es considerablemente pequeño (del orden de decenas o centenares de nm por pulso), lo cual implica velocidades de procesamiento pequeñas para superficies grandes. Esta tasa de ablación crece con la fluencia en detrimento de la calidad. A grandes fluencias (10-100 J/cm^2) y dependiendo del material, los parámetros del láser y las condiciones ambientales entran en juego condiciones termodinámicas importantes como la interacción láser-plasma y sus fenómenos derivados, los cuales influyen enormemente en las dimensiones y calidad de las estructuras.

Así pues, el criterio principal a la hora de elegir ciertas condiciones de irradiación para un material se encuentra en la tasa de ablación (2.7), concretamente en la duración de pulso, la cual tiene una influencia enorme en la calidad del proceso. En el caso de pulsos de nanosegundos o picosegundos el proceso de ablación induce localmente los estados de líquido, gas y plasma, y tras el paso del haz se puede observar como el material fundido se aglutina posteriormente alrededor del cráter una vez se ha sobreenfriado. En los pulsos de femtosegundo, sin embargo, el proceso es más eficiente y no deja evidencias del material fundido[28].

Explicado más en detalle, la presencia de una fase líquida conlleva un proceso de eliminación de material inestable debido a que el proceso de vaporización crea una presión de retroceso que expulsa el líquido. Esto sucede porque la onda térmica ha tenido tiempo para propagarse y crear una capa relativamente gruesa de material fundido. Es por ello que en el régimen de nanosegundos, el proceso de ablación está dominado por la clásica interacción láser-materia basada en fusión, evaporación y formación de plasma. La evaporación y expulsión de

material derretido ocurren desde el inicio del proceso, expulsando una cantidad muy significativa de material. Sin embargo, a medida que aumenta la profundidad del cráter debido a pulsos sucesivos el proceso se vuelve menos eficiente por el confinamiento de material derretido en el interior del cráter.

2.2.3-Parámetros ambientales.

Los procesos de ablación láser se realizan por lo general o bien en el interior de una cámara de vacío o bien simplemente en las condiciones ambientales propias de un laboratorio, es decir, en aire. Los estudios experimentales muestran que la ratio de ablación para fluencias altas es mayor en vacío que en aire. Esto puede atribuirse tanto a la interacción del haz con el aire, en donde inevitablemente se perderá parte de la energía, y al hecho de que los átomos ablacionados serán expulsados más fácilmente en el vacío[29]. Para bajas fluencias, la ratio de ablación sigue siendo mayor en el vacío, pero las diferencias son menos abruptas en estos casos.

Para aplicaciones muy concretas el proceso de ablación puede llevarse a cabo en una cámara con otro tipo de gas o incluso líquido. Este tipo de aplicaciones buscan que el medio actúe como reactivo en experimentos que busquen algún tipo de modificación o tratamiento de la superficie del sólido o aplicaciones como síntesis de nanopartículas. Sin embargo, el interés que presentan estas aplicaciones está lejos de las aplicaciones de eliminación de material objeto de esta tesis.

2.3-MODELO TEÓRICO

Los modelos teóricos para describir en su totalidad el proceso de ablación láser son altamente complicados debido a todos los fenómenos diferentes que tienen lugar durante el proceso, donde además de la interacción láser-materia se incluyen la formación y expansión de plasma y su interacción con el haz incidente.

De forma muy simplificada, el proceso de ablación láser se puede resumir a partir del esquema mostrado en la figura 2.5:

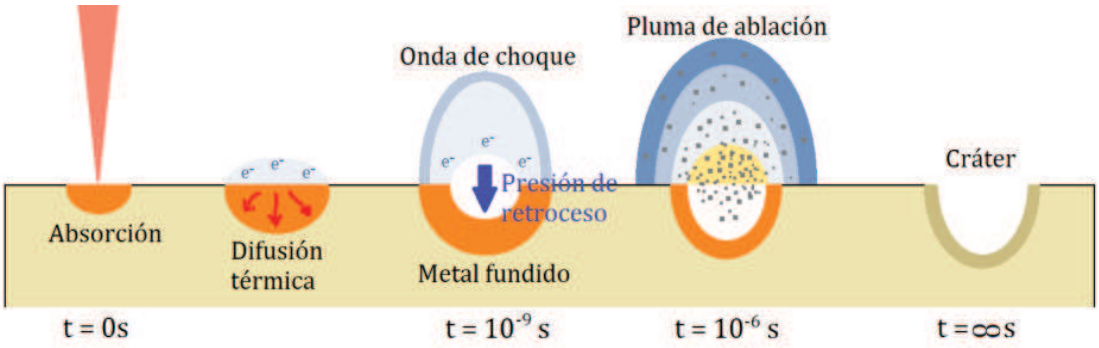


Figura 2.5: Esquema de las etapas del proceso de ablación láser

El esquema de la figura 2.5 muestra las etapas del proceso de ablación explicado de forma simple. Inicialmente la radiación incidente es absorbida en la superficie del material, provocando un aumento muy localizado de su temperatura. En la siguiente etapa la altísima temperatura provoca la vaporización del metal y la formación de plasma, el cual debido a su forma ovalada se conoce comúnmente como pluma de ablación. Posteriormente las partículas son expulsadas de la superficie del material hasta que la energía se ha disipado por completo y únicamente queda el cráter generado sobre la superficie[30].

Durante el análisis de este proceso es útil considerar la denominada expansión adiabática cuando usamos pulsos de nanosegundos (o incluso más cortos). En este caso se considera que el calentamiento del material y la formación del plasma ocurren mucho más rápido que la expansión del material ablacionado. Debido a esto el proceso se puede dividir en dos partes consideradas independientes[2]:

a) Evaporación del sólido y formación de plasma.

b) Expansión de la pluma de ablación.

Esta aproximación es el equivalente a la versión simplificada del proceso de ablación. Primero, la energía del láser se transforma en energía interna del sólido, hasta llegar al plasma. En segundo lugar, parte de la energía del láser es absorbida en forma de energía cinética

de la pluma de ablación. En la práctica, estos dos sucesos ocurren de forma simultánea, implicando un análisis complejo de la expansión de la pluma interaccionando con el propio haz.

2.3.1-Interacción láser-materia

A bajas fluencias los fenómenos principales del proceso de ablación son la fusión y la vaporización del material, ya que en este régimen la pluma de vapor generada actúa simplemente como un medio óptico delgado que apenas atenúa de forma imperceptible la intensidad del haz.

Para el caso de pulsos ultracortos, debido a que la penetración térmica escala con la duración temporal del pulso se puede despreciar la expansión térmica. Por ello, la ablación láser para pulsos de pico o femtosegundo se puede considerar como una transición directa de sólido a vapor, permitiendo un procesado altamente preciso[31].

En contraste, para pulsos de nanosegundos el calentamiento del metal debido a la expansión térmica de la energía absorbida produce que en este caso primero se funda el material y luego se vaporice. Una de las consecuencias de este proceso es que la expansión térmica a través del sólido resulta ser la mayor causa de pérdida de energía en el proceso.

Matemáticamente estos fenómenos pueden representarse a través de la asunción de que los electrones y fonones presentan una distribución que se puede caracterizar en base a las temperaturas de los electrones, $\mathbf{T_e}$, y a la de la red, $\mathbf{T}$. El transporte de energía al metal se puede modelizar unidimensionalmente a través de las siguientes ecuaciones de difusión[2][33]:

$$C_e \frac{\partial T_e}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial z}\left(K_e \frac{\partial T_e}{\partial z}\right) - \Gamma_{e-p}(T_e - T) + (1 - R)\alpha I(t) e^{-\alpha z} \qquad (2.9)$$

$$C \frac{\partial T}{\partial t} = \Gamma_{e-p}(T_e - T) \qquad (2.10)$$

En las ecuaciones 2.9 y 2.10 definimos los siguientes parámetros[32]:

- $\mathbf{C_e}$ y **C** como las capacitancias térmicas por unidad de volumen de electrones y fonones respectivamente.
- **R** como la reflectividad del material.
- **I(t)** como la intensidad del láser en la superficie en función del tiempo **t**.
- $\mathbf{\Gamma_{e\text{-}p}}$ como la ratio de intercambio de energía electrones – red.
- $\mathbf{K_e}$ como un parámetro de conductividad térmica que se relaciona con la conductividad en equilibrio térmico $\mathbf{K_o(T)}$ como $\mathbf{K_e=T_eK_o(T)/T}$.

Las ecuaciones de difusión presentan tres escalas de tiempo características: el tiempo de "enfriamiento" de los electrones ($\boldsymbol{\tau_e}$), el tiempo de calentamiento de la red ($\boldsymbol{\tau_p}$) y la duración del pulso ($\boldsymbol{\tau_L}$). Estos parámetros se calculan como[33]:

$$\tau_e = \frac{C_e}{\Gamma_{e-p}} \tag{2.11}$$

$$\tau_p = \frac{C}{\Gamma_{e-p}} \tag{2.12}$$

Siendo $\boldsymbol{\tau_e << \tau_p}$, estos tiempos definen tres regímenes de la interacción láser-materia en función de la duración del pulso. En el caso del régimen de femtosegundo tenemos que $\boldsymbol{\tau_L << \tau_e}$. En este caso se puede despreciar el acoplamiento de los electrones y la red. Debido a las cortas escalas temporales del proceso, este puede considerarse como una transición directa del sólido al vapor. Para el caso del régimen de picosegundos, la condición es $\boldsymbol{\tau_e << \tau_L << \tau_p}$, lo cual implica que la temperatura de los electrones puede considerarse cuasi-estacionaria y su enfriamiento se debe al intercambio de energía con la red[33][34]. Al final este proceso se ve acompañado de una conducción térmica por parte de los electrones al material, formando una región en fase líquida. Y aunque se pueda considerar que en la superficie del material la transición es de sólido a vapor, la presencia de fase líquida en el interior resta precisión a la ablación producida en este régimen.

En el caso del régimen de nanosegundos se cumple que $\boldsymbol{\tau_L >> \tau_p}$ y que $\mathbf{T_e=T}$, lo cual reduce la ecuación de difusión térmica a[34]:

$$C\frac{\partial T}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial z}\left(K\frac{\partial T}{\partial z}\right) + (1-R)\alpha I e^{-\alpha z} \tag{2.13}$$

De la ecuación 2.13 se deduce que durante la duración del pulso de nanosegundos la energía láser absorbida primero calienta el material hasta el punto de fusión (en la superficie) y después hasta la temperatura de vaporización. En el caso de los metales se necesita mucha más energía para vaporizar el material que para derretirlo. Durante la interacción láser-materia por tanto la principal fuente de pérdida de energía es la conducción térmica hacia el sólido. Ocurre también que para estos pulsos se cumple la condición de que la profundidad de penetración térmica es mucho mayor que la óptica.

La energía por unidad de masa depositada en el interior del material viene dada por la siguiente ecuación[35]:

$$E = \frac{I_\alpha t}{\rho l_{th}} \tag{2.14}$$

Donde a partir de cierto tiempo la energía se vuelve comparable al calor latente de vaporización, $\mathbf{H_V}$, y por tanto ocurre una evaporación significativa. De esta condición podemos derivar una relación con la fluencia umbral necesaria para la evaporación del metal:

$$F_{th} = \rho H_V l_{th} \tag{2.15}$$

En caso de la ablación láser para pulsos de nanosegundos relativamente largos hay tiempo suficiente para que la onda térmica se propague a través del metal y pueda crear una capa relativamente grande de material derretido. En este caso la evaporación se produce desde la fase líquida, no desde la sólida, reduciendo considerablemente la precisión del proceso, especialmente si lo comparamos con los resultados de pulsos más cortos.

Desde un punto de vista termodinámico la evaporación del material ocurre cuando la capa superficial de espesor $\mathbf{l_{th}}$ se calienta hasta la temperatura de fusión. Igualando la ecuación calorífica con la fluencia recibida obtenemos que[36]:

$$\rho c_P (T_{metal} - T_{amb}) l_{th} = (1-R) F_{th} \tag{2.16a}$$

$$F_{th} = \frac{2\rho c_P \sqrt{D\tau_P}(T_{metal} - T_{amb})}{1-R} \quad (2.16b)$$

Se puede obtener de esta forma un valor teórico para la fluencia umbral de un material para un láser concreto con unas condiciones de pulso conocidas.

2.3.2-Formación y expansión de la pluma de ablación

La interacción entre el láser y la materia produce una extracción de partículas (átomos, iones o incluso grandes clústeres de material) cuyo conjunto es denominado pluma de ablación. Esta puede considerarse, de forma muy simplificada, como un conjunto de átomos e iones donde los iones representan menos del 5% del total de los componentes[29][36].

Los componentes de la pluma de ablación presentan la característica común de ser expulsados a una velocidad perpendicular a la superficie del material. Si estos componentes no sufriesen ninguna interacción, el resultado sería una pluma de material moviéndose en la dirección perpendicular a la superficie del sólido ablacionado.

En la práctica, incluso en un ambiente controlado como puede ser una cámara de vacío en donde se elimina la interacción con el aire, es necesario tener en cuenta que las partículas de la pluma tienen diferentes tamaños, carga y momentos iniciales. Debido a que un gran número de elementos son expulsados en un volumen muy reducido y durante un espacio de tiempo muy pequeño, será inevitable que los componentes de la pluma acaben por interaccionar unos con otros, afectando directamente a su propagación. Además, aún en el caso ideal de que la expulsión ocurra de forma perfectamente perpendicular a la superficie del material, dicha superficie presentará irregularidades, tanto propias como consecuencias de la ablación, incrementando la posibilidad de que trayectorias de partículas no paralelas conlleven una colisión. En consecuencia, los efectos más visibles son que la pluma aumente sus dimensiones en todas las direcciones,

expandiéndose lateralmente a causa de sus propias interacciones internas.

En el caso de una pluma de ablación propagándose en un ambiente normal (mayoritariamente en aire) las partículas expulsadas perderán energía debido a la colisión con las propias partículas del ambiente, frenándose en consecuencia. Como resultado de estas interacciones la pluma sufrirá una expansión lateral más pronunciada y se formará una onda de choque entre la pluma y el gas ambiental[37].

Para algunas aplicaciones puede resultar de gran interés recoger estas partículas expulsadas sobre una superficie concreta, normalmente un sustrato plano, para generar la deposición de una capa de metal de apenas unas pocas micras o incluso nanómetros de espesor. Este es el principio en el que se basa la técnica del Depósito por Láser Pulsado, más conocida como PLD (del inglés, pulsed laser deposition), en donde las partículas expulsadas del proceso de ablación colisionan y se adhieren a un cuerpo situado muy cerca de la pluma de ablación, formando una fina capa del mismo material que el ablacionado pero con algunas de sus propiedades ligeramente diferentes[1][38].

2.3.3-Interacción láser-plasma

Cuando trabajamos a bajas fluencias, el vapor producido por el pulso láser actúa como una fina capa que es atravesada por el láser casi sin ser atenuada. En estos casos los principales procesos físicos que ocurren son la absorción de energía y propagación térmica, fusión y vaporización del material, haciendo que el estudio de la ablación láser para el régimen de bajas fluencias resulte mucho menos complejo que para fluencias que generen plumas de ablación mucho más densas y cuya interacción con el pulso láser sea mucho más notable[39].

Para el caso de la ablación de metales con pulsos de nanosegundos en el vacío y para fluencias mayores que el umbral (aproximadamente 2 J/cm^2) siempre se produce plasma en la superficie del material. Los modelos actuales revelan que para pulsos de entre 1 ms y 0,1 ns la

intensidad $\mathbf{I_P}$ a partir de la cual se genera plasma cumple la siguiente relación[40]:

$$I_P \tau_L^{1/2} \cong B_P \tag{2.17}$$

Donde **Bp** es un parámetro cuyo valor depende del material ablacionado. En el caso particular del aluminio, por ejemplo, su valor es de 4,5 x 10^4 $Ws^{1/2}cm^{-2}$.

Para fluencias muy por encima del umbral el proceso se complica debido a los fenómenos de absorción del plasma, actuando en cierto modo como atenuador de la energía que recibe el material[41]. Existen durante la interacción láser-plasma dos fenómenos predominantes de absorción de fotones: el Bremsstrahlung inverso[42] y la fotoionización[43] (IB y PI respectivamente, por sus siglas en inglés). El resto de los fenómenos tienen una presencia considerablemente menor para el rango de intensidades y frecuencias utilizados en la ablación láser.

El Bremsstrahlung inverso se trata de un fenómeno en el que un fotón es absorbido por un electrón libre. Para que esto sea posible la absorción debe producirse durante la colisión del electrón con partículas más pesadas como iones o núcleos atómicos, ya que una tercera partícula es necesaria para la conservación del momento y la energía. Tras múltiples colisiones la energía del láser absorbida por la red se invierte en incrementar la temperatura del plasma.

Normalmente el IB debido a la interacción de electrones con partículas neutras es dos órdenes de magnitud menor que las interacciones electrón-ión cuando la densidad de iones es lo suficientemente elevada, pero resulta de vital importancia en vapor débilmente ionizado, como es el caso de las primeras fases de la evolución del plasma. Por ello para un gas de electrones con una distribución de velocidades Maxwelliana y a una temperatura $\mathbf{T_e}$ consideraremos el coeficiente de absorción del IB únicamente debido a las interacciones electrón-ión, expresado como[44]:

$$\alpha_{IB} = \frac{4}{3}\sqrt{\frac{2\pi}{3k_B T_e m_e^3}}\frac{Z^2 e^6}{hc\upsilon^3}\left(1 - exp\left(-\frac{h\upsilon}{k_B T_e}\right)\right) N_i N_e \tag{2.18}$$

Donde $\mathbf{N_i}$ y $\mathbf{N_e}$ son las densidades de iones y electrones respectivamente, $\boldsymbol{\upsilon}$ es la frecuencia del láser, $\mathbf{m_e}$ y **e** la masa y carga del electrón, respectivamente, **Z** es la carga de los iones, **h** la constante de Planck y $\mathbf{k_B}$ la constante de Boltzmann. La ecuación (2.18) indica que el proceso de IB es menos efectivo en el ultravioleta que en el visible o infrarrojo. El coeficiente de absorción depende tanto del nivel de ionización de la pluma como de la eficiencia de proceso de ablación. De este modo el coeficiente viene determinado por las propiedades termo-ópticas del material y el potencial de ionización del material ablacionado.

Para el caso de la ablación láser con pulsos en infrarrojo, los electrones resultantes de las primeras etapas de la vaporización son capaces de absorber fotones incluso a bajas densidades de electrones. Debido a la alta absorción de la radiación infrarroja por parte del plasma incipiente resulta difícil transmitir energía al sólido de forma eficiente incluso a altas intensidades[45].

En los procesos de ablación en el rango del visible o del ultravioleta, el IB es menos eficiente. Sin embargo, la fotoionización en los átomos excitados de la pluma puede ser más significativa. La fotoionización es un proceso mediante el cual durante la interacción radiación-materia un electrón de un átomo es arrancado del mismo debido a la interacción con un fotón. El coeficiente de absorción $\boldsymbol{\alpha_{PI}}$ de este proceso viene dado (en cm^{-1}) por la siguiente ecuación[36][44]:

$$\alpha_{PI} \approx \sum_n 2{,}9 \times 10^{-17} \frac{\varepsilon_n^{5/2}}{(h\upsilon)^3} N_n \qquad (2.19)$$

Donde $\mathbf{h\upsilon}$ es la energía del fotón (en eV), $\boldsymbol{\varepsilon_n}$ (en eV) y $\mathbf{N_n}$ (en cm^{-3}) son respectivamente la energía de ionización y la densidad de población del estado excitado **n**. El sumatorio se realiza para todos los estados de energía que satisfacen la relación $\mathbf{h\upsilon > \varepsilon_n}$.

En el caso de los metales, la energía de los fotones es casi siempre comparable a la energía típica de ionización, incrementando así la absorción por PI. Más aún, las altas densidades y temperaturas del plasma producido por láseres de nanosegundos pueden producir altas cantidades de átomos excitados, los cuales podrán ser posteriormente

fotoionizados por fotones del visible o del ultravioleta. Además, los tiempos de excitación y ionización de los cuerpos del plasma son mucho menores que la duración del pulso láser[43] (típicamente sobre 10 ns), produciendo un aumento en el número y densidad de iones. Este consecuente incremento iónico incrementa también la posibilidad de absorción fotónica debido al IB.

2.4-RESUMEN DEL CAPÍTULO

La ablación láser es un proceso de eliminación de material debido a la interacción radiación-materia fuertemente dependiente de las propiedades del material y del haz incidente. Para el caso de ablación en metales el parámetro más relevante del material será su capacidad de propagar la energía absorbida, en este contexto su coeficiente de difusión térmica. Cuanto mejor se propague el calor a través del material mayor será la cantidad de material afectada por el proceso y expulsada durante las últimas etapas de la ablación.

Para el caso del pulso láser la eficiencia y la calidad del proceso de ablación depende principalmente de dos parámetros. El primero de ello es la energía por unidad de área del haz incidente. Cuanto mayor energía localizada se aplique al material existirá una mayor cantidad de materia que transite desde el estado sólido a líquido o gas. El segundo factor determinante a la hora de determinar la eficiencia del proceso es la duración del pulso.

Los modelos teóricos establecen tres regímenes diferentes en función de si se trabaja con pulsos láser de nanosegundos, picosegundos o femtosegundos. Para el caso de pulsos de nanosegundos el proceso es el menos eficiente, ya que durante la interacción láser-materia existe una pérdida considerable de energía debido a la propagación térmica en el interior del sólido. Por otra parte, el procesado láser con pulsos de femtosegundo es el más eficiente de los tres, ya que la escala temporal es tan corta que se puede despreciar el efecto de la difusión térmica en el interior del material. Además, en este régimen la transición entre fases se realiza directamente de sólido a vapor, mejorando la calidad del producto final.

REFERENCIAS

[1] M. Stafe, A. Marcu, and N. N. Puscas, *Pulsed Laser Ablation on Solids: Basics, Theory and Applications*. Springer, Berlin, 2014.

[2] B. N. Chichkov, C. Momma, S. Nolte, F. von Alvensleben, and A. Tünnermann, "Femtosecond, picosecond and nanosecond laser ablation of solids," *Appl. Phys. A*, vol. 63, no. 2, pp. 109–115, 1996.

[3] N. B. D. phil., "I. On the constitution of atoms and molecules," *London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci.*, vol. 26, no. 151, pp. 1–25, 1913.

[4] M. Garbuny, *Optical Phisics*. Academic Press, New York, 1965.

[5] A. E. Siegman, *Lasers*. University Science Books, Mill Valley, 1986.

[6] J. F. Ready, *Industrial Applications of Lasers*. Elsevier, San Diego 1978.

[7] A. Yariv, *Quantum Electronics*, 3rd ed., Wiley, New York , 1988.

[8] O. Svelto, *Principles of Lasers*, 3rd ed., Plenum Press, New York , 1989.

[9] W. Koechner, *Solid-State Laser Engineering*. Springer Series in Oprical Sciences, New York , 1976.

[10] I. E. Kolesnikov, E. V. Golyeva, A. A. Kalinichev, M. A. Kurochkin, E. Lähderanta, and M. D. Mikhailov, "Nd3+ single doped YVO4 nanoparticles for sub-tissue heating and thermal sensing in the second biological window," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 243, pp. 338–345, 2017.

[11] Z. Jankiewicz and K. Kopczyński, "Diode-pumped solid-state lasers," *Opto-electronics Rev.*, vol. 9, no. 1, pp. 19–33, 2001.

[12] V. Lupei, N. Pavel, and T. Taira, "Highly efficient laser emission in concentrated Nd:YVO4 components under direct pumping into the emitting level," *Opt. Commun.*, vol. 201, no. 4–6, pp. 431–435, 2002.

[13] Träger, Ed., *Springer Handbook of Lasers and Optics*. Springer, New York, 2007.

[14] D. C. Sinclair and W. E. Bell, *Gas Laser Technology*. Holt, New York, 1969.

[15] H. Kogelnik and T. Li, "Laser Beams and Resonators," *Proc. IEEE*, vol. 54, no. 10, pp. 1312–1329, 1966.

[16] F. J. McClung and R. W. Hellwarth, "Characteristics of Giant Optical Pulsations from Ruby," *Proc. IEEE*, vol. 51, no. 1, pp. 46–53, 1963.

[17] A. J. Demaria, W. H. Glenn, M. J. Brienza, and M. E. Mack, "Picosecond Laser Pulses," *Proc. IEEE*, vol. 57, no. 1, pp. 2–25, 1969.

[18] M. Born and E. Wolf, *Principles of Optics*, 6th ed. Pergamon, Oxford,1980.

[19] W. F. Hagen, "Diffraction-Limited High-Radiance Nd-Glass Laser System," Journal of Applied Physics, vol. 511, no. November, 2003.

[20] A. Hützen *et al.*, "Polarized proton beams from laser-induced plasmas," *High Power Laser Sci. Eng.*, vol. 7, pp. 1–6, 2019.

[21] N. V. Zamfir, "Nuclear Physics with 10 PW laser beams at Extreme Light Infrastructure - Nuclear Physics (ELI-NP)," *Eur. Phys. J. Spec. Top.*, vol. 223, no. 6, pp. 1221–1227, 2014.

[22] F. Brygo, C. Dutouquet, F. Le Guern, R. Oltra, A. Semerok, and J. M. Weulersse, "Laser fluence, repetition rate and pulse duration effects on paint ablation," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 252, no. 6, pp. 2131–2138, 2006.

[23] C. Momma *et al.*, "Short-pulse laser ablation of solid targets," *Opt. Commun.*, vol. 129, no. 1–2, pp. 134–142, 1996.

[24] C. Momma, S. Nolte, B. N. Chichkov, F. V. Alvensleben, and A. Tünnermann, "Precise laser ablation with ultrashort pulses," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 109–110, pp. 15–19, 1997.

[25] S. Nolte *et al.*, "Ablation of metals by ultrashort laser pulses," *J. Opt. Soc. Am. B*, vol. 14, no. 10, pp. 2716–2722, 1997.

[26] X. Liu, D. Du, and G. Mourou, "Laser ablation and micromachining with ultrashort laser pulses," *IEEE J. Quantum Electron.*, vol. 33, no. 10, pp. 1706–1716, 1997.

[27] J. E. B. J. K. Chen, "Numerical study of ultrashort laser pulse interacions with metal films," *Numer. Heat Transf. Part A Appl.*, vol. 40, no. 1, pp. 1–20, 2001.

[28] R. E. Russo, X. Mao, J. J. Gonzalez, and S. S. Mao, "Femtosecond laser ablation ICP-MS," *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 17, no. 9, pp. 1072–1075, 2002.

[29] D. Bäuerle, *Laser Processing and Chemistry*. Springer, New York, 1996.

[30] R. E. Russo, "Laser Ablation," *Appl. Spectrosc.*, vol. 49, no. 9, pp. 14A--28A, 1995.

[31] R. Le Harzic *et al.*, "Pulse width and energy influence on laser micromachining of metals in a range of 100 fs to 5 ps," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 249, no. 1–4, pp. 322–331, 2005.

[32] P. B. Allen, "Theory of thermal relaxation of electrons in metals," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 59, no. 13, pp. 1460–1463, 1987.

[33] L. A. Falkovsky and E. G. Mishchenko, "Electron-lattice kinetics of metals heated by ultrashort laser pulses," *J. Exp. Theor. Phys.*, vol. 88, no. 1, pp. 84–88, 1999.

[34] M. Stafe, "Theoretical photo-thermo-hydrodynamic approach to the laser ablation of metals," *J. Appl. Phys.*, vol. 112, no. 12, 2012.

[35] N. M. Bulgakova, A. V Bulgakov, and L. P. Babich, "Energy balance of pulsed laser ablation: thermal model revised," *Appl. Phys. A*, vol. 79, no. 4, pp. 1323–1326, 2004.

[36] S. Amoruso, R. Bruzzese, N. Spinelli, and R. Velotta, "Characterization of laser-ablation plasmas," *J. Phys. B At. Mol. Opt. Phys.*, vol. 32, no. 14, pp. R131--R172, 1999.

[37] J. Braenzel *et al.*, "Coulomb-Driven Energy Boost of Heavy Ions for Laser-Plasma Acceleration," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 114, no. 12, p. 124801, 2015.

[38] A. Aragón *et al.*, "Fabrication of a Cell Electrostimulator Using Pulse Laser Deposition and Laser Selective Thin Film Removal," in *Laser Ablation - From Fundamentals to Applications*, T. E. Itina, Ed.: IntechOpen, Rijeka, 2017.

[39] K. H. Leitz, B. Redlingshöer, Y. Reg, A. Otto, and M. Schmidt, "Metal ablation with short and ultrashort laser pulses," *Phys. Procedia*, vol. 12, no. PART 2, pp. 230–238, 2011.

[40] J. Psikal, V. T. Tikhonchuk, J. Limpouch, A. A. Andreev, and A. V Brantov, "Ion acceleration by femtosecond laser pulses in small multispecies targets," *Phys. Plasmas*, vol. 15, no. 5, p. 53102, 2008.

[41] B. Wu, Y. C. Shin, H. Pakhal, N. M. Laurendeau, and R. P. Lucht, "Modeling and experimental verification of plasmas induced by high-power nanosecond laser-aluminum interactions in air," *Phys. Rev. E*, vol. 76, no. 2, p. 26405, 2007.

[42] C. R. Phipps *et al.*, "Impulse coupling to targets in vacuum by KrF, HF, and CO2 single-pulse lasers," *J. Appl. Phys.*, vol. 64, no. 3, pp. 1083–1096, 1988.

[43] S. Amoruso, M. Armenante, V. Berardi, R. Bruzzese, and N. Spinelli, "Absorption and saturation mechanisms in aluminium laser ablated plasmas," *Appl. Phys. A*, vol. 65, no. 3, pp. 265–271, Sep. 1997.

[44] Y. B. Zel'dovich, Y. P. Raizer, W. D. Hayes, R. F. Probstein, and S. P. Gill, "Physics of Shock Waves and High-Temperature Hydrodynamic Phenomena, Vol.

1," *J. Appl. Mech.*, vol. 34, no. 4, pp. 1055–1055, 1967.

[45] J. Hermann, C. Boulmer-Leborgne, I. N. Mihailescu, and B. Dubreuil, "Multistage plasma initiation process by pulsed CO2 laser irradiation of a Ti sample in an ambient gas (He, Ar, or N2)," *J. Appl. Phys.*, vol. 73, no. 3, pp. 1091–1099, 1993.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3 FABRICACIÓN DEL CIRCUITO ELECTROESTIMULADOR

En este capítulo nos centraremos en el proceso de fabricación del microcircuito electroestimulador. Para ello detallaremos por una parte todos los pasos que nos han llevado a obtener un electroestimulador completamente funcional partiendo de cero, y en un apartado paralelo mostraremos el conjunto de simulaciones realizadas para encontrar los parámetros ideales del circuito relativos a su diseño. Es necesario incidir en que resulta en cierto modo inapropiado separar por completo los subapartados de simulación, cuyo objetivo es analizar el campo eléctrico generado por el propio circuito en función de su geometría y material, y el propio apartado de fabricación. El motivo se debe a que en realidad ambas partes se retroalimentan mutuamente, por lo que se deberá considerar en todo momento que esta separación tiene como fin facilitar la estructura del texto y la comprensión del escrito, recalcando que no ha existido tal distinción durante la realización del trabajo.

En lo que respecta a la fabricación del circuito, todo el proceso se puede dividir en tres partes bien diferenciadas: en primer lugar, se realiza una deposición de una capa metálica delgada sobre un sustrato de vidrio, posteriormente se procesa dicha capa mediante ablación láser y finalmente se le aplica un tratamiento térmico a la muestra. Cuando la muestra está lista se incluye el cableado que conectará el circuito con el generador de señales eléctricas, y el chip estará listo para ensamblarse y estimular cultivos celulares.

La primera parte, relativa a la deposición de la capa delgada, se ha llevado a cabo utilizando dos técnicas distintas: la técnica del PVD y la

del PLD (del inglés, "**P**hysical **V**apor **D**eposition" y "**P**ulsed **L**aser **D**eposition", respectivamente). Se explicarán ambas en detalle, llegando a la conclusión de que la técnica del PVD es mucho más adecuada para este trabajo por todas las ventajas que presenta. En la segunda parte, relativa al proceso de ablación, se detallará el proceso de parametrización de las diferentes variables del láser, presentando las conclusiones que nos han llevado a elegir un conjunto de parámetros concretos. La tercera parte, finalmente, se trata de un tratamiento térmico de sencilla aplicación con resultados inmediatos y beneficios imprescindibles. Junto con este apartado se presentará la caracterización de las capas metálicas obtenidas, mostrando los beneficios que ofrece este tratamiento comparando un conjunto de capas tratadas térmicamente con otro que no han sido tratadas. Finalmente se mostrarán imágenes de un circuito electroestimulador fabricado de acuerdo a los métodos detallados en este capítulo.

Paralelamente al proceso de fabricación se detallará el estudio realizado para encontrar el diseño óptimo del electroestimulador mediante simulaciones realizadas en COMSOL del campo eléctrico generado en función de la geometría del circuito. En este estudio se buscará la geometría óptima del circuito estudiando los resultados que ofrecen al variar el espesor de las pistas, su anchura, la separación entre ellas y el material utilizado. Dichos resultados se refieren al campo electrostático producido en la superficie del vidrio delgado sobre el que se situarán las células. En las simulaciones se atenderá tanto a la intensidad del campo eléctrico como a su forma. Se mostrarán los resultados atendiendo al valor absoluto del campo eléctrico y de su gradiente. Finalmente se discutirán los resultados para justificar la elección de las geometrías utilizadas en los experimentos.

3.1-MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1-Sistema láser de nanosegundos

El láser utilizado para la ablación de las capas metálicas es un Rofin Power Line 20E. Se trata de un láser de Nd:YVO_4 que emite pulsos de 20 ns a una longitud de onda de 1064 nm. El set-up experimental

consiste en un sistema de espejos galvanométricos acoplado a la salida del haz con una lente plana a la salida de 100 mm de distancia focal que proporciona una distribución uniforme de irradiancia en una superficie de 80 x 80 mm^2 con un tamaño de spot en el foco de 15 µm. El sistema está representado en la figura 3.1:

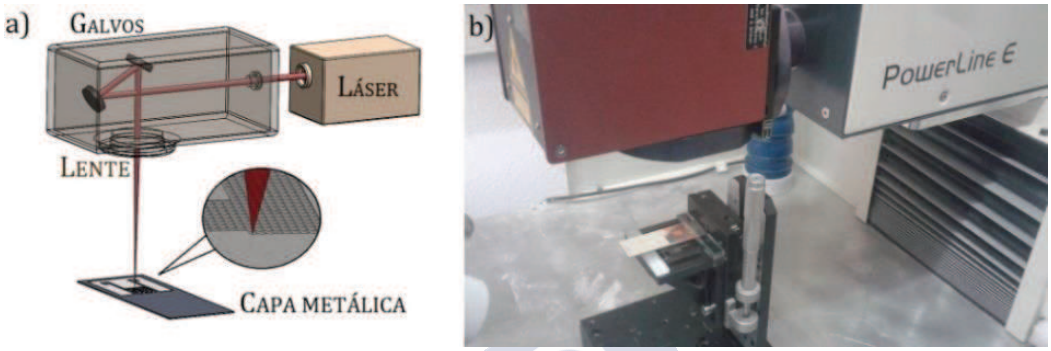


Fig 3.1: a) Esquema del sistema láser y b) fotografía del sistema

En la figura 3.1a se muestra un esquema del sistema utilizado para la ablación láser, mientras que en la figura 3.b se muestra una fotografía del mismo, incluyendo una muestra recién procesada. En este sistema la capa metálica que se desea procesar se coloca en el plano focal de la lente plana, y mediante el cabezal galvanométrico se mueve la posición del spot láser, que retira selectivamente parte del aluminio. El sistema de espejos se controla automáticamente mediante un software integrado en el propio láser, mostrado en la figura 3.2:

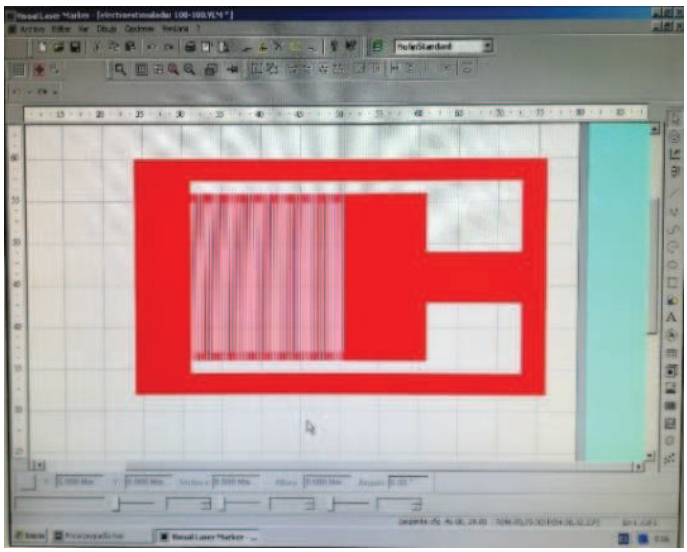


Fig 3.2: Fotografía del software integrado en el sistema de ablación láser

En la imagen 3.2 se observa un ejemplo de uno de los modelos de electroestimulador diseñados en el software del sistema. La parte de la figura que aparece en rojo indica las zonas que recorrerá el haz. El software también nos permite elegir otros parámetros del láser como su potencia, su frecuencia de repetición de pulsos o la velocidad de barrido del haz. La parametrización de estas magnitudes se llevará a cabo en apartados posteriores.

3.1.2-Sistema láser de femtosegundos

Para el procesamiento láser de femtosegundos se utilizó la salida de baja potencia del láser STELA (Santiago TErawatt LAser) de la instalación L2A2 de la Universidad de Santiago de Compostela. STELA es un láser Ti:Za con una longitud de onda central de 800 nm. La duración de pulso para la salida de baja potencia es de 35 fs y la tasa de repetición de 1 kHz. Dicha salida se acopla a una estación de micromecanizado que cuenta con un objetivo de microscopio 20X de Mitutoyo con apertura numérica de 0.40 y distancia focal de 10 mm. En la figura 3.3 se representa este sistema:

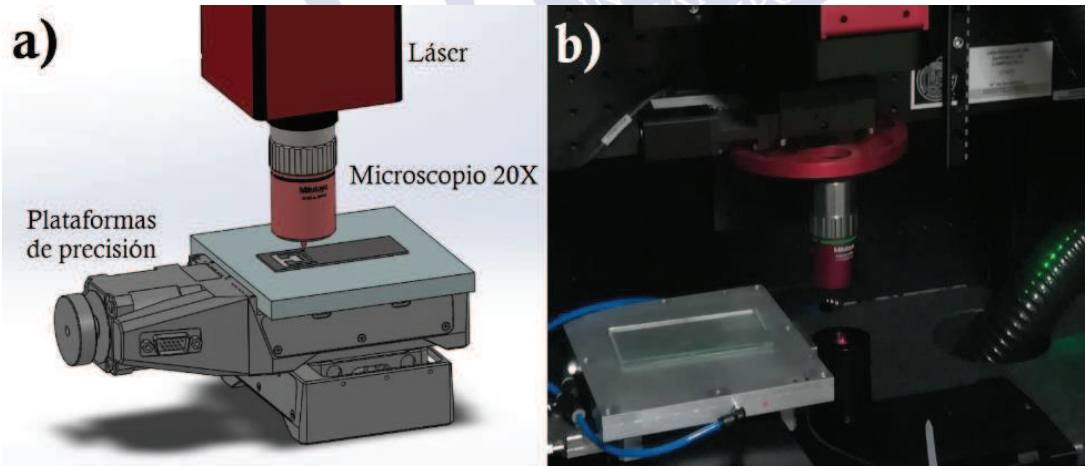


Fig 3.3: a) Esquema del sistema láser de STELLA y b) fotografía del sistema

La estación del láser STELA mostrada en la figura 3.3 cuenta además con dos plataformas de precisión micrométrica que se desplazan en direcciones perpendiculares y controladas por ordenador

3.1.3-Deposición de capas delgadas

Existen varias técnicas para obtener una capa delgada de un material sobre un sustrato, o incluso para obtener directamente una capa con un dibujo o patrón determinado. La técnica más común para estas aplicaciones es la litografía[1], [2]. Si bien su aplicación es relativamente sencilla, presenta importantes inconvenientes como el tiempo de fabricación o el uso de varios componentes químicos. Además, la necesidad de un molde de dimensiones concretas en la última etapa del proceso resta flexibilidad a la hora de fabricar diferentes circuitos con diversos diseños. Con el objetivo de solventar estos inconvenientes se ha optado por dos técnicas que nos permiten obtener capas delgadas de material de forma más rápida y limpia y que además nos ofrezcan la posibilidad de un procesado láser posterior para obtener rápidamente cualquier circuito.

En resumen, las técnicas de "physical vapor deposition" (PVD) y "pulsed laser deposition" (PLD) que explicaremos a continuación nos permiten obtener capas homogéneas de cualquier metal sobre sustratos de vidrio, dejando el diseño del circuito a cargo de la segunda etapa de nuestro proceso de fabricación, la de procesado láser.

3.1.3.1-Técnica del PVD

La técnica del PVD consiste en vaporizar un material en concreto de forma que el vapor generado se adhiera a la superficie de un sustrato colocado a cierta altura sobre ese mismo material, controlando de forma continua la velocidad de deposición del proceso. Para mejorar la eficacia del proceso es necesario que el sustrato de vidrio esté limpio para evitar impurezas que puedan dificultar la adherencia y disminuir en consecuencia la calidad de la capa.

El proceso de lavado del sustrato de vidrio consiste en un conjunto de baños de ultrasonidos consecutivos a 35ºC durante 30 minutos cada uno. Los baños se realizan en la limpiadora de ultrasonidos Branson 5200. El primero de los baños de ultrasonidos se realiza en agua jabonosa tras lavar el vidrio con una esponja suave en agua caliente y

jabón. Tras el primer baño, se enjuaga en agua desionizada eliminando todo resto de jabón y se aplica un segundo baño en agua desionizada. El tercer y último baño se realiza en alcohol isopropílico, también tras enjuagar el sustrato en este líquido. Finalmente se seca con ayuda de una pistola de aire comprimido, tras lo cual se introducen en la cámara de vacío en la cual se lleva a cabo el proceso de deposición. El esquema de la cámara se muestra en la figura 3.4:

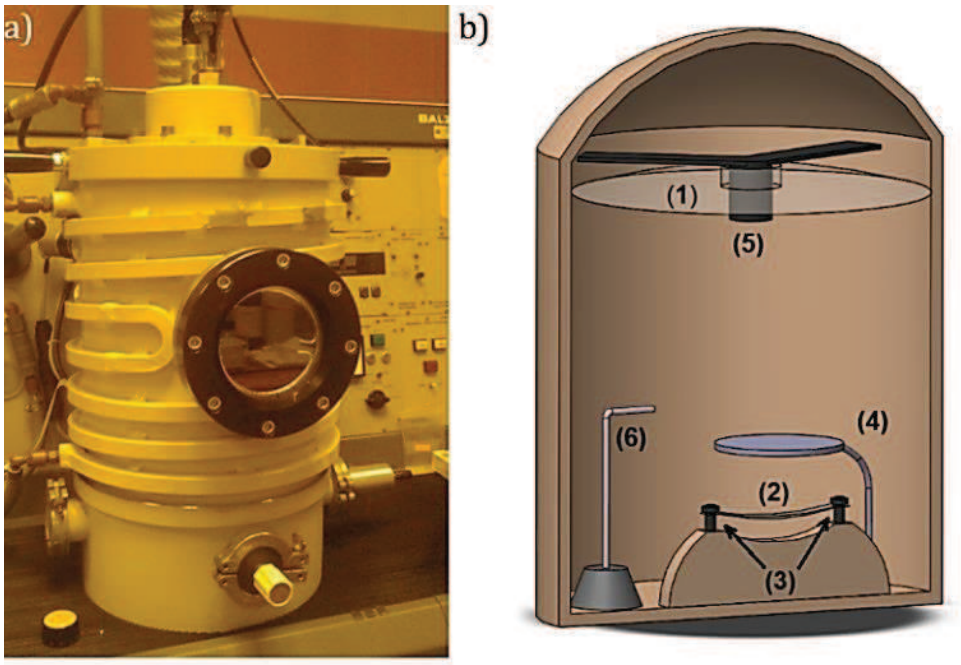


Fig 3.4: a) Fotografía de la cámara Balzers BAE 250 y b) esquema de su interior.

En la imagen 3.4a se muestra una fotografía de la cámara Balzers BAE 2500 diseñada para el crecimiento de capas delgadas mediante PVD. La figura 3.4b muestra el esquema del interior de la cámara, en cuyo interior el proceso de deposición se realiza siguiendo los siguientes pasos:

- En el interior de la cámara se introducen los sustratos de vidrio colocados en un platillo situado en la parte superior de la cámara (1), de forma que la cara inferior de los vidrios queda al descubierto.
- En la parte inferior de la cámara se colocan virutas del material a depositar sobre un cable de tungsteno (2).

- Se hace el vacío en el interior de la cámara hasta alcanzar los 6,5 x 10^{-2} mbar, momento en el que se aplica una corriente eléctrica a la vara de aluminio (6) del interior de la cámara. Esto provoca la que el aire del interior de la cámara a baja presión se transforme en plasma, lo cual ioniza la superficie de los vidrios, mejorando su adherencia. Este estado de ionización del aire se mantiene durante unos cinco minutos.
- Al acabar el paso anterior se hace el vacío hasta 10^{-5} mbar. Se aplica una corriente que circula entre los extremos del cable de tungsteno (3), provocando un aumento en la temperatura que, unido a la baja presión, vaporiza el metal.
- Con un platillo móvil ubicado sobre el cable de tungsteno (4) se controla la velocidad de deposición del material mientras un sensor ubicado en la parte superior de la cámara (5) indica en todo momento el espesor de la capa depositada.

El proceso dura en total unas 5 horas, donde la mayor parte del tiempo consiste en esperar a alcanzar el nivel de vacío necesario. En este proceso se pueden obtener hasta 12 muestras de forma simultánea.

3.1.3.2-Técnica del PLD

El PLD es una técnica para la obtención de capas delgadas mediante el uso de ablación láser. En esta técnica se focaliza un haz láser sobre la superficie del material a depositar, arrancando partículas en forma de pluma de ablación, las cuales son expulsadas a gran velocidad y depositadas sobre un sustrato colocado a poca distancia[3].

Para realizar esta técnica se coloca en el interior de una cámara de vacío un sustrato de vidrio paralelo con un disco de aluminio de pureza 99%. El disco de aluminio está acoplado a una plataforma rotatoria para evitar que la ablación arranque únicamente material de una región determinada. Un láser focaliza sobre el disco con una incidencia de 45º. Este montaje se muestra en la figura 3.5.

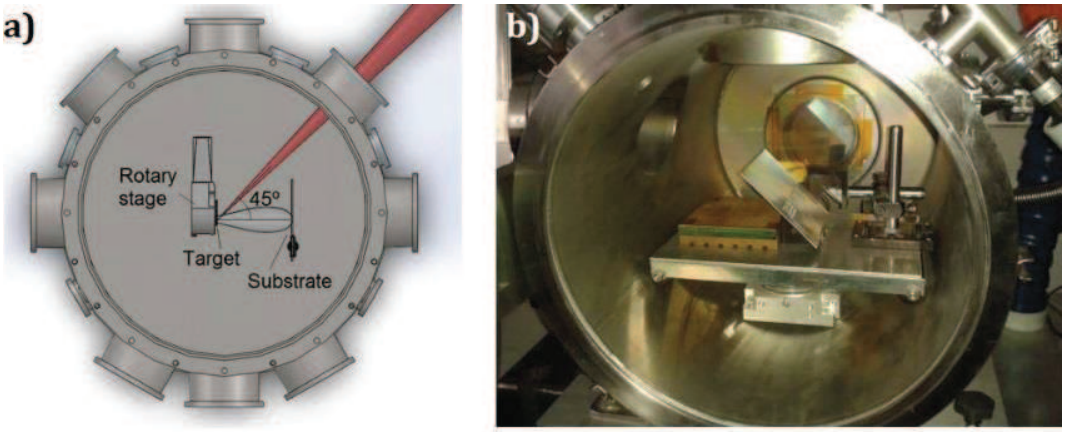


Fig 3.5: a) Esquema del montaje experimental para el PLD y b) fotografía de la cámara de vacío con todos los elementos del sistema.

3.1.3.3-Comparación entre ambas técnicas

Los resultados obtenidos usando ambas se diferencian principalmente por su homogeneidad. Mientras que en el PVD las capas se forman mediante la deposición relativamente suave de partículas en estado de vapor, con el PLD la capa crece a través de la colisión de partículas de diferentes tamaños a diferentes velocidades. Esta diferencia se aprecia en la figura 3.6:

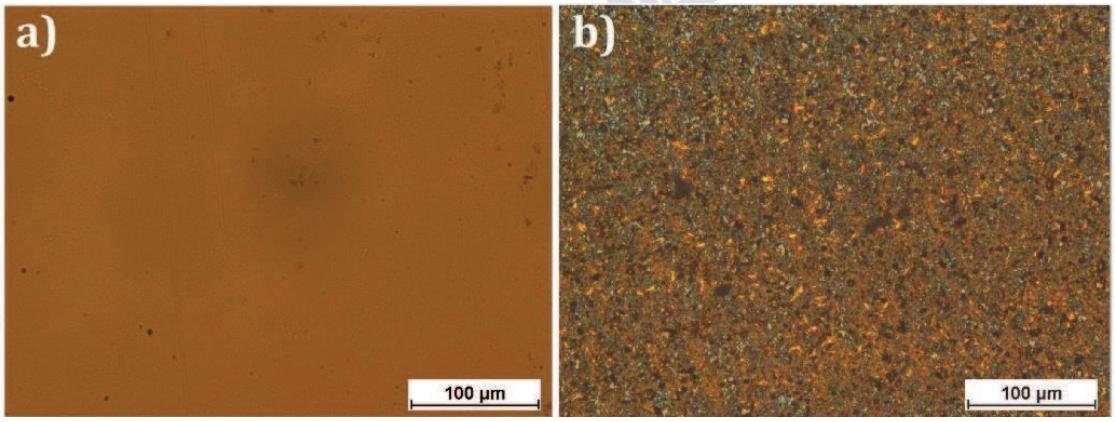


Fig 3.6: Imagen de una capa de aluminio obtenida a) mediante la técnica del PVD y b) mediante la técnica del PLD

En la figura 3.6 se muestran imágenes obtenidas mediante microscopía óptica (Nikon MM-400) de dos capas de aluminio fabricadas mediante PVD (3.6a) y PLD (3.6b). La capa de PVD se presenta como la más

homogénea mientras que la alternativa de PLD ofrece resultados mucho más irregulares. De los resultados obtenidos y de las experiencias de ambos procesos de fabricación, concluimos que la técnica del PVD se adecúa mejor a nuestra situación debido a los siguientes motivos:

- **Tiempo de fabricación:** el PVD necesita unas 5 horas, las cuales en su mayoría son tiempo de espera para que las bombas de vacío actúen. Una vez está listo pueden fabricarse hasta 10 capas de forma simultáneas, por lo que la relación de muestras fabricadas por hora es similar a la del PLD. Sin embargo, el PLD exige fabricarlas de una en una, invirtiendo la totalidad del tiempo en ellas y siendo necesario esperar a que se alcance el vacío necesario en el interior de la cámara con cada nuevo sustrato que se coloque.
- **Homogeneidad:** las capas de PVD presentan una mayor homogeneidad, con capas de espesor constante a lo largo de toda la superficie del sustrato. Con el PLD, sin embargo, la capa resultante es mucho más irregular, debido en parte a la diversidad del tamaño de las partículas eyectadas durante la fabricación. Además, a causa de que el grosor de la capa depende de la distancia entre el sustrato y la pluma no se dispone de una capa de espesor constante en toda la superficie del vidrio.
- **Control:** el espesor y la velocidad de crecimiento de la capa son mucho más manejables con el PVD al ser dos parámetros que se pueden variar y medir en tiempo real mientras se lleva a cabo la deposición. En el PLD estos parámetros deben calcularse previamente para obtener un espesor concreto, y mientras se realice el proceso no se tendrá ninguna información al respecto.
- **Facilidad:** el PVD es una técnica relativamente fácil de usar que no presenta complicaciones en su ejecución. El PLD tiene como principal problema que existen demasiados factores a considerar (distancia del sustrato al material, ángulo relativo entre ambos, focalización del láser sobre la muestra) de los cuales una mínima variación puede afectar de forma notable a la calidad de la capa.

En conclusión, tras obtener resultados usando ambas técnicas nos decantamos por la técnica del PVD ya que requiere una menor inversión de tiempo y presenta resultados mucho más homogéneos y fácilmente replicables.

Como sustrato para las deposiciones se ha usado un vidrio portaobjetos de 26 x 76 mm de superficie proporcionado por la casa Labbox. Como material para depositar se usará aluminio de 99,98% de pureza, plata de 99,99% de pureza o cobre de 99,9% de pureza.

3.1.4-Caracterización de capas delgadas

Las capas metálicas generadas mediante PVD fueron examinadas ópticamente mediante un microscopio óptico Nikon MM-400, con el cual se previsualizaron las muestras comprobando que no haya daños superficiales. Con este microscopio también se previsualizaron las capas procesadas por el sistema láser para comprobar la calidad de las pistas del circuito.

Las observaciones morfológicas de las capas se tomaron usando un microscopio de electrones Carl Zeiss Ultra Plus, evaluando tanto la superficie de las muestras como la sección transversal de las capas.

También se midió la conductividad de las capas metálicas mediante la aplicación de una corriente eléctrica de 5 a 30 mA aplicada por dos electrodos mediante la fuente Keithley 2400 y cuya caída de potencial se midió usando el multímetro Hewlett Packard 34401 A.

3.2-SIMULACIONES DEL CAMPO ELÉCTRICO

El campo electrostático generado por el circuito electroestimulador se optimizó mediante simulaciones numéricas. Usando el módulo electrostático del software COMSOL Multiphysics 5.2a se construyó un modelo tridimensional del circuito electroestimulador depositado sobre un sustrato de vidrio y con el medio celular sobre el mismo separado por un vidrio delgado (Figura 3.6). Mediante una serie de

simulaciones se midió la intensidad y la forma del campo eléctrico recibido por el medio celular variando las dimensiones del circuito y el material base.

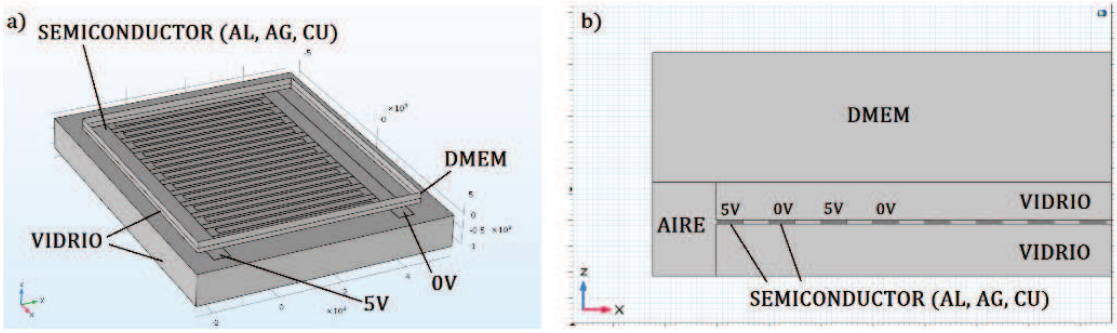


Fig 3.6: a) Modelo tridimensional del circuito electroestimulador y b) modelo bidimensional obtenido de la sección trasversal del modelo tridimensional

En la figura 3.6 se muestra el modelo tridimensional fabricado con la siguiente estructura: una base de vidrio y sobre la misma el circuito electroestimulador, cuyas pistas abarcan una superficie de 2 x 3 cm. Sobre el circuito se coloca una capa de vidrio de 145 µm de espesor y finalmente sobre la misma el medio de cultivo celular DMEM[4]. En los terminales del circuito se aplica una diferencia de potencial de 5 V.

Este modelo presentaba un gran problema a la hora de realizar las simulaciones debido a las diferencias de escala entre el espesor del circuito, las dimensiones y separación entre las pistas y las dimensiones del modelo (nanómetros, micras y milímetros respectivamente) el mallado de los cuerpos, que es necesario realizar en COMSOL, creaba regiones con una gran densidad de puntos enorme que, en el mejor de los casos, aumentaban considerablemente el tiempo necesario para completar la simulación y en el peor directamente la imposibilitaban. Este problema podía solventarse creando una malla específica para una simulación en concreto, pero impedía la automatización de simulaciones en serie en base al cambio de dimensiones de un parámetro.

Para resolver este problema se pasó al modelo bidimensional mostrado en la figura 3.6b. En la figura 3.7 se observa un ejemplo de simulación para la misma geometría escogida comparando los resultados del modelo tridimensional y el modelo bidimensional:

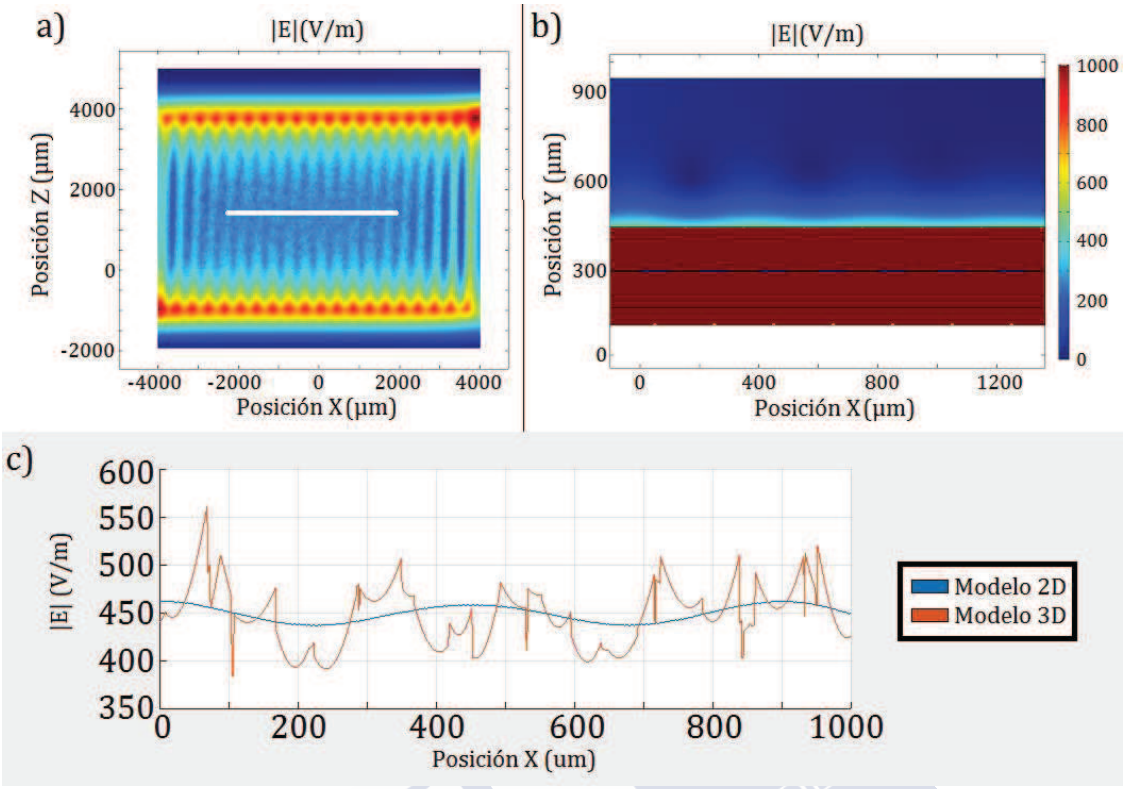


Figura 3.7: Ejemplos de una simulación para el modelo a)tridimensional y b) bidimensional. c) Comparación numérica de los resultados.

En las figuras 3.7a y 3.7b se muestran dos ejemplos de simulaciones en tres y dos dimensiones respectivamente para un tamaño de pistas de 100 µm de ancho y otras 100 µm de gap con un espesor de pista de 500 nm. Puesto que el campo eléctrico es constante a lo largo de la dirección de las pistas, recreando la sección perpendicular a las mismas se puede obtener el mismo campo eléctrico mediante un modelo mucho más simplificado. El modelo bidimensional mostrado en la figura 3.7b presenta, al igual que el anterior, una base de vidrio sobre la que se ubican las pistas, representadas en su sección transversal en forma de rectángulos, alternando potenciales de 5 y 0 V respectivamente. Sobre ellas se colocan, en este orden, un vidrio delgado y el medio de cultivo celular.

En todas las simulaciones se medirá el campo eléctrico a lo largo de un plano (en el caso del modelo tridimensional) o una recta (modelo bidimensional) paralelos a la superficie del vidrio delgado y situados a 1 µm de altura sobre el mismo. La figura 3.7c muestra el valor absoluto

del campo eléctrico para ambas configuraciones a lo largo de una recta ubicada 1 μm por encima del vidrio delgado (representada por una línea blanca en la figura 3.7a).

Los campos eléctricos obtenidos por ambos modelos presentan dos perfiles diferentes. En el caso del modelo tridimensional la distribución del campo es mucho más irregular y no existe ningún patrón apreciable, mientras que en modelo bidimensional la forma del campo presenta una oscilación muy bien definida. El motivo de esta diferencia es la cantidad de puntos que presentan las mallas de ambos modelos. El modelo bidimensional puede permitirse una malla mucho más fina que permita un estudio con mayor precisión, mientras que el modelo tridimensional no permite procesar una densidad de puntos tal alta en detrimento de la calidad de los resultados. Finalmente se ha calculado el valor medio del campo para ambos modelos, con un valor de 448,2 V/m para el modelo en 3D y 449,6 V/m para el modelo en 2D.

En conclusión, la comparación entre ambos modelos ofrece unos resultados muy similares numéricamente, pero con un perfil mucho mejor definido para el modelo bidimensional. Este factor, unido al hecho de que las simulaciones se realizan mucho más rápido con este último, nos confirma que la mejor opción es realizar las simulaciones con el modelo de dos dimensiones a partir de ahora.

Los materiales utilizados y los valores de sus magnitudes más relevantes para el modelo de campos electrostáticos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 3.1: Valores de conductividad y permitividad eléctrica de los materiales utilizados en las simulaciones realizadas con COMSOL Multiphysics 5.2a[5]-[7]

Material	Conductividad (S/m)	Permitividad eléctrica relativa
Aire	0	1
DMEM	1,4	78
Vidrio	10^{-14}	4,7
Aluminio	$2{,}50\times10^{7}$	1
Plata	$4{,}98\times10^{7}$	1
Cobre	$4{,}5\times10^{7}$	1

En la tabla 4.1 se muestran los valores de conductividad eléctrica y permitividad relativa usados en las simulaciones. La conductividad del aluminio se obtuvo en base a las medidas experimentales de las capas generadas con PVD mencionadas en el apartado **3.1.3** y cuyos resultados se presentan en el apartado **3.3.1**.

El procedimiento para encontrar los parámetros el diseño o los diseños que ofrezcan un mejor campo eléctrico será realizar simulaciones variando diferentes parámetros clave y estudiar su influencia en los resultados. Estos parámetros serán los siguientes:

- **Material del circuito:** las simulaciones se realizarán para circuitos de aluminio, plata y cobre.
- **Anchura de la pista:** la anchura de la pista variará entre 20 μm y 5 mm.
- **Separación entre pistas (Gap):** la separación variará en el rango de 20 μm a 1 mm.
- **Espesor del circuito:** este parámetro variará en el rango de 100 nm a 10 μm.

Inicialmente escogeremos tres modelos de geometría aleatorios para estudiar la influencia del material utilizado en la intensidad o la forma del campo eléctrico y en función de los resultados escogeremos el material que mejor se adapte a nuestros objetivos. Posteriormente realizaremos un segundo estudio para analizar la influencia del espesor en diferentes modelos en un rango de 100 a 10.000 nm y finalmente realizaremos un tercer estudio, más complejo, analizando conjuntamente la influencia de la anchura de las pistas y de su separación.

3.2.1-Influencia del material del circuito en el campo eléctrico

El primer parámetro que consideraremos para las simulaciones será el material del circuito Se realizaron simulaciones con aluminio, plata y cobre para estudiar cuál de los tres materiales resultaba el más

adecuado para nuestro dispositivo. Se escogieron tres geometrías diferentes para el modelo bidimensional cuyas medidas se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 3.2: Medidas de las geometrías escogidas para las simulaciones con circuitos de diferentes materiales.

Geometría	Anchura (µm)	Gap (µm)	Espesor (nm)
Modelo A	100	100	500
Modelo B	50	200	1000
Modelo C	300	50	100

Se usaron las tres geometrías escogidas y se realizaron para cada una de ellas simulaciones con circuitos de cada material. Se midió el valor del campo eléctrico a lo largo del eje X sobre la superficie del vidrio delgado, obteniendo los siguientes resultados:

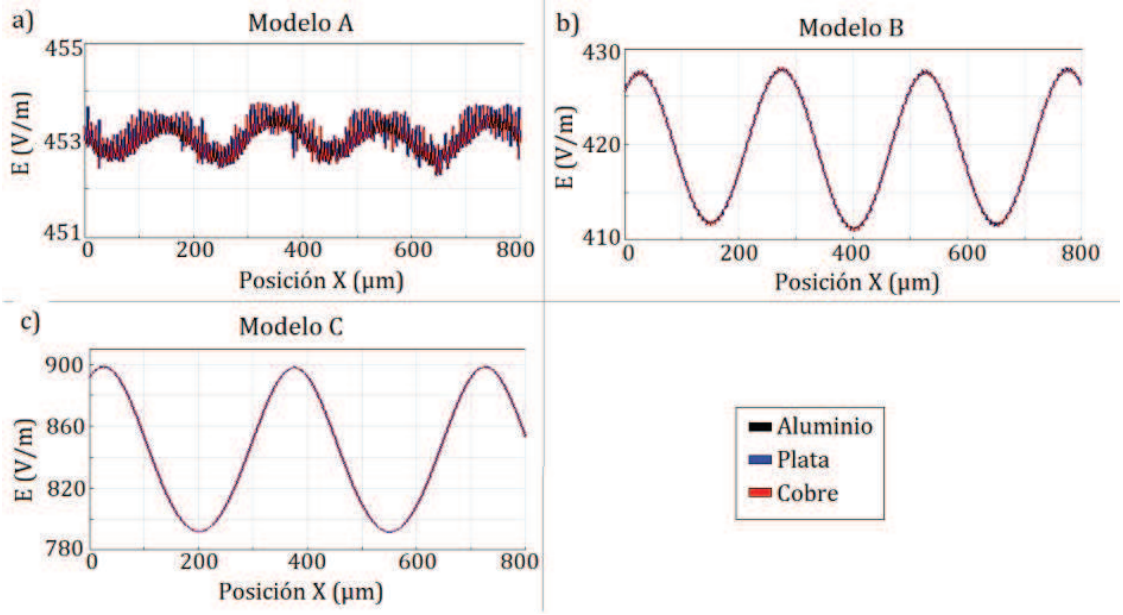


Figura 3.8: Simulaciones del campo eléctrico para circuitos de aluminio, cobre y plata para a) modelo de geometría A, b) modelo de geometría B y c) modelo de geometría C.

La figura 3.8 muestra los resultados del campo eléctrico simulado para los tres materiales utilizados en las tres geometrías definidas en la tabla 3.2. La primera conclusión es que el material utilizado no influye ni en la forma ni en la intensidad del campo eléctrico, puesto que en cada caso las tres gráficas están superpuestas. De hecho para cada modelo se

restaron las gráficas de los tres materiales dos a dos y el valor máximo de esa diferencia fue del orden de 10^{-9} V. Esto puede explicarse al considerar al sustrato de vidrio como un aislante perfecto, por lo que al no existir una corriente eléctrica a través del sustrato las pistas semiconductoras conservan prácticamente la misma diferencia de potencial, generando la misma distribución de carga eléctrica superficial y, por tanto, el mismo campo eléctrico.

Otro factor importante para considerar a la hora de la elección del material es que nuestro modelo se trata de un circuito abierto en el que no existe flujo de corriente eléctrica. En consecuencia, no hay necesidad de preocuparse por fenómenos derivados de la corriente como por ejemplo un posible calentamiento del circuito por efecto Joule que podría ser perjudicial para el cultivo celular. Finalmente se ha decidido que a partir de este punto escogeremos realizar el resto de las simulaciones para circuitos de aluminio por una cuestión de ahorro: puesto que los tres materiales ofrecen los mismos resultados nos decantamos por el más económico.

3.2.2-Influencia del espesor del circuito en el campo eléctrico

Para estudiar la influencia del espesor del circuito en el campo eléctrico repetiremos el procedimiento del apartado anterior, variando este parámetro para los tres modelos de la tabla 3.2 (exceptuando el espesor, que será la variable en este caso). Se ha variado el espesor en un rango de 100 nm a 10 μm y se ha obtenido el valor medio del campo eléctrico sobre la superficie del vidrio delgado. Los resultados se muestran en la siguiente figura.

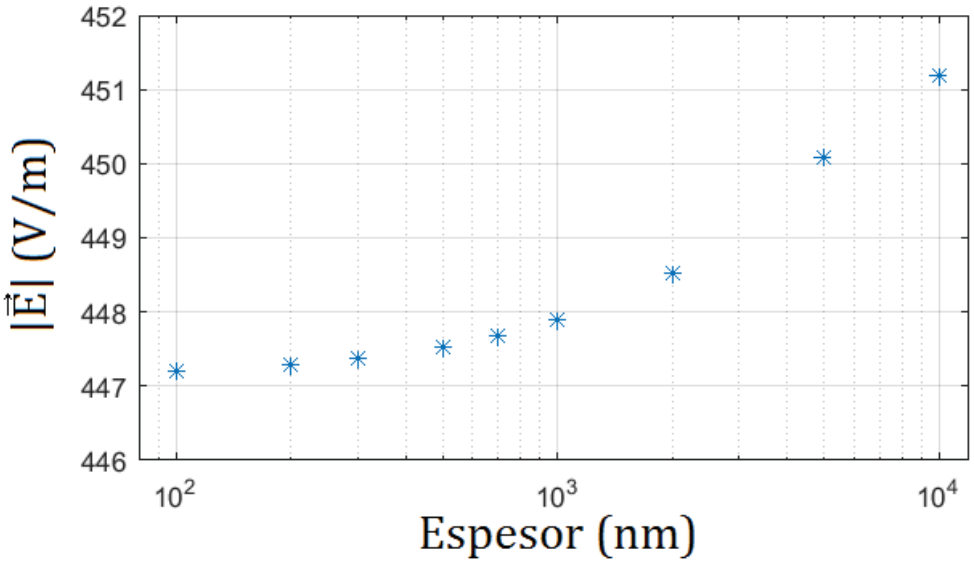


Figura 3.9: Simulaciones del campo eléctrico de una capa de aluminio para diferentes espesores para el modelo de geometría A.

La figura 3.9 muestra el valor medio del campo eléctrico medido en la misma región para diferentes espesores usando el modelo de geometría A realizado en aluminio, al cual le corresponden pistas de 100 µm de anchura separadas entre ellas por otras 100 µm. Se observa que el campo aumenta muy lentamente con el espesor. Para este modelo un aumento del espesor de 100 nm a 10 µm apenas ofrece un incremento relativo del 0,9% aproximadamente (de 447 a 451 V/m). Y entre 100 y 1000 nm el incremento es de sólo 1 V/m, sobre un 0,22% mayor.

El comportamiento que presenta el modelo A es muy similar al presentado por los modelos B y C cuando variamos el espesor en el mismo rango. Es necesario aclarar que a pesar de que las capas fabricadas en PVD no llegarán a tener espesor tan alto como 10 µm de cara a las simulaciones hemos aumentado el rango de forma deliberada para conocer de igual modo el comportamiento que presenta el campo al aumentar exageradamente este valor. En la figura 3.10 se muestra el valor medio del campo eléctrico para circuitos cuya geometría es la del modelo B, con pistas de 50 µm de ancho con un gap de 200 µm:

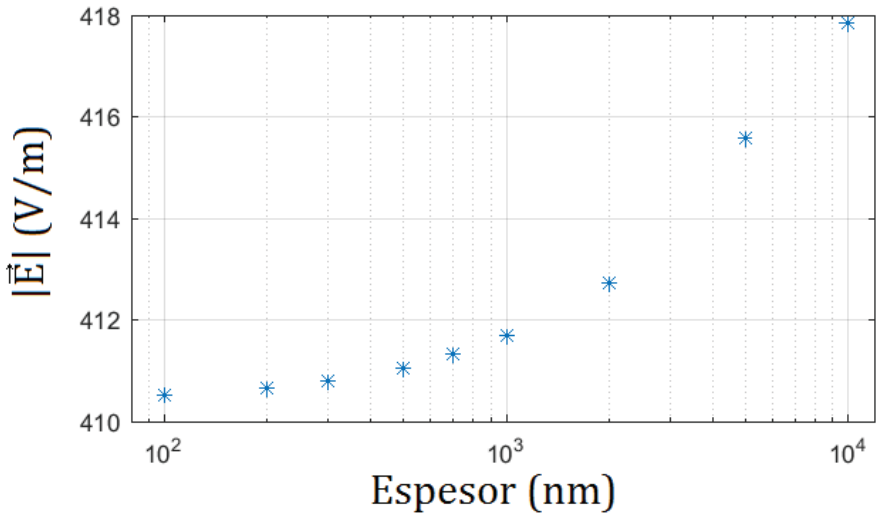


Figura 3.10: Simulaciones del campo eléctrico de una capa de aluminio para diferentes espesores para el modelo de geometría B.

En la figura 3.10 el crecimiento del campo presenta el mismo patrón que en la figura 3.9. La diferencia en el valor medio para un espesor de 10 µm con respecto a uno de 100 nm es de un incremento relativo del 1,78%, y entre los 100 y los 1000 nm el aumento es del 0,28%. Un comportamiento similar se puede observar en la figura 3.11 en donde se ha usado el modelo de geometría C:

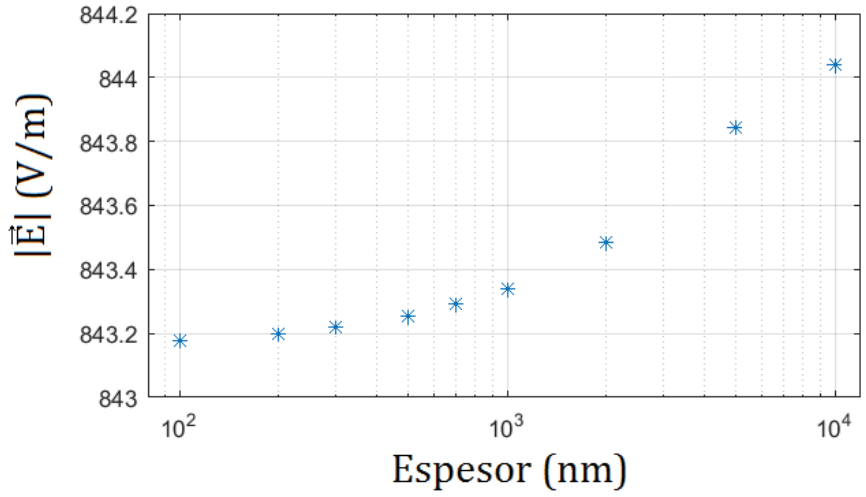


Figura 3.11: Simulaciones del campo eléctrico de una capa de aluminio para diferentes espesores para el modelo de geometría C.

En la figura 3.11 se muestra el crecimiento del valor medio del campo eléctrico para el modelo de geometría con pistas de 300 µm de ancho

con una separación entre ellas de 50 µm. El crecimiento del campo sigue la misma forma que con los dos modelos anteriores pero esta vez el incremento relativo del campo es menor. Un incremento del espesor de 100 a 1000 nm ofrece un incremento relativo en el campo de sólo un 0,02%, y con un aumento de 100 nm a 10 µm el campo se incrementa un 0,1%.

En resumen, del comportamiento observado en los tres modelos podemos concluir que en el rango de espesores simulados a medida que aumenta el espesor del circuito aumenta muy ligeramente la intensidad del campo eléctrico, aportando al final un aumento despreciable, especialmente en los rangos de espesores más bajos. En cuanto a la influencia de las dimensiones de las pistas, el incremento relativo en la intensidad del campo eléctrico muestra una relación inversa con la anchura de la pista, siendo más notable cuanto más estrecha es la pista. La conclusión obvia es que cuanto mayor es la anchura de la pista en relación con el espesor, menor es la influencia de este. Debido a la naturaleza de nuestro diseño y a la diferencia de órdenes de magnitud entre estas dos magnitudes en la práctica podremos despreciar el espesor como un factor decisivo a la hora de influir en el campo eléctrico y atender únicamente a los dos parámetros restantes de nuestra geometría: la anchura de las pistas y su separación.

3.2.3-Influencia de las dimensiones de las pistas sobre el campo.

En base a los resultados obtenidos en los dos apartados anteriores se ha escogido un circuito de aluminio con un espesor de 200 nm para realizar las simulaciones posteriores. En este apartado de estudiará la influencia en el campo eléctrico de las dimensiones de las pistas con una variación en su anchura en un rango de 20 µm a 5 mm, y en su separación (gap) en un rango de 20 a 500 µm.

Dentro del rango estudiado se observa un comportamiento común relacionado con la forma del campo. La mayor parte de los resultados muestran un patrón oscilante entre dos valores máximo y mínimo con un período espacial que coincide con el período de distribución de las pistas. En algunas geometrías la diferencia entre el valor máximo y

mínimo es muy pequeña, mostrando en ocasiones campos muy planos. Para expresar estas diferencias hemos definido un factor llamado homogeneidad (**H**) y que se calcula a partir de los valores máximos y mínimos del campo eléctrico mediante la siguiente ecuación.

$$H = 1 - \frac{|\vec{E}|_{máx} - |\vec{E}|_{mín}}{|\vec{E}|_{máx}} \tag{3.1}$$

El parámetro definido como homogeneidad se trata de una magnitud adimensional cuyo valor oscila entre 0 y 1. Si el valor máximo y mínimo del campo eléctrico son iguales la ecuación 3.1 dará como resultado que H = 1, por lo que consideraremos que un campo será más homogéneo cuanto más próximo a 1 sea este factor. En la figura 3.12 se muestran a modo de ejemplo los perfiles de campo eléctrico a lo largo de la dirección perpendicular a las pistas (eje X) para dos geometrías diferentes con el valor de homogeneidad calculado.

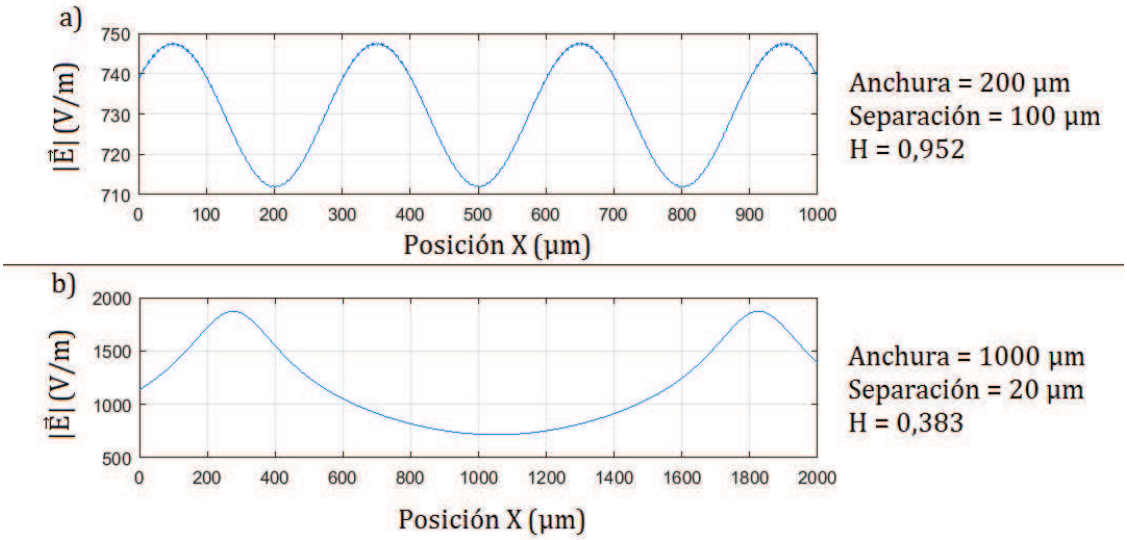


Figura 3.12: Perfil de campo eléctrico para geometrías de a) 200 µm de anchura y separación de 100 µm y b) 1000 µm de anchura y separación de 20 µm.

La figura 3.12 muestra dos perfiles diferentes con el campo eléctrico generado sobre la superficie del vidrio delgado a lo largo del eje X. En ambos se puede observar el carácter periódico del campo y su oscilación entre dos valores máximo y mínimo. En el primero de ellos, en la figura 3.12a el parámetro de homogeneidad calculado es de 0,952, muy próximo a uno, ya que el campo oscila entre dos valores muy próximos

entre si (711,8 y 747,5 V/m). En el caso de la figura 3.12b se presenta un campo con un valor máximo mucho mayor, de 1872,1 V/m, y cuyo valor mínimo es de 716,2 V/m. Este segundo ejemplo presenta un parámetro de homogeneidad menor, de 0,383, proporcionando un campo con regiones de intensidades muy diferentes.

Debido al carácter oscilatorio de la intensidad del campo eléctrico, se resumirán en dos gráficas los resultados de todas las simulaciones realizadas con las diferentes dimensiones del circuito. En la primera de ella, la figura 3.13, se representa el valor máximo que alcanzan las oscilaciones del campo eléctrico:

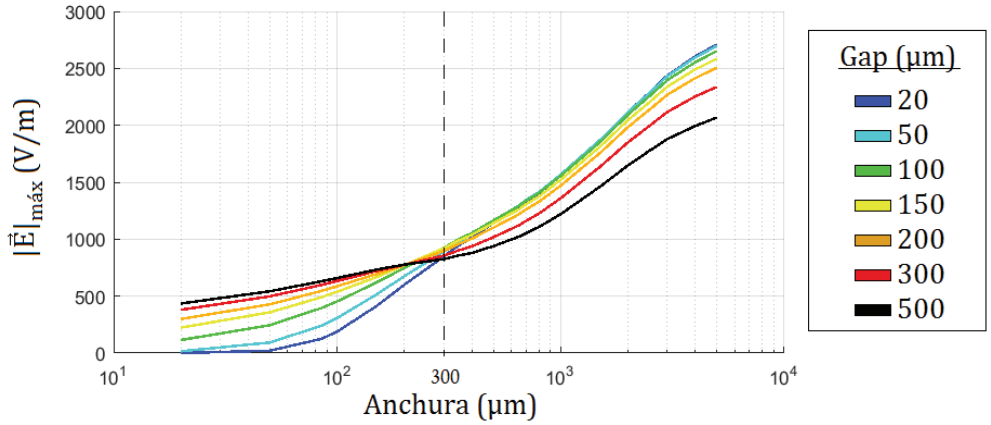


Figura 3.13: Valor máximo del campo eléctrico en función de la anchura de la pista y de la separación entre ellas (gap)

La figura 3.13 nos muestra el valor máximo que alcanza el campo eléctrico para diferentes combinaciones de anchura y separación de las pistas del circuito electroestimulador. La conclusión más inmediata es que este valor máximo aumenta en todas las situaciones al aumentar la anchura de la pista. La segunda conclusión es que existen dos regiones diferenciadas según nos situemos por debajo o por encima de las 300 µm de anchura. Por debajo de este valor, las pistas más separadas serán las que proporcionen un campo de mayor intensidad, mientras que por encima de este valor ocurre lo contrario, y las pistas con menor separación son las que consiguen alcanzar mayores valores.

La segunda gráfica interesante es la que muestra la homogeneidad del campo eléctrico, representada en la figura 3.14.

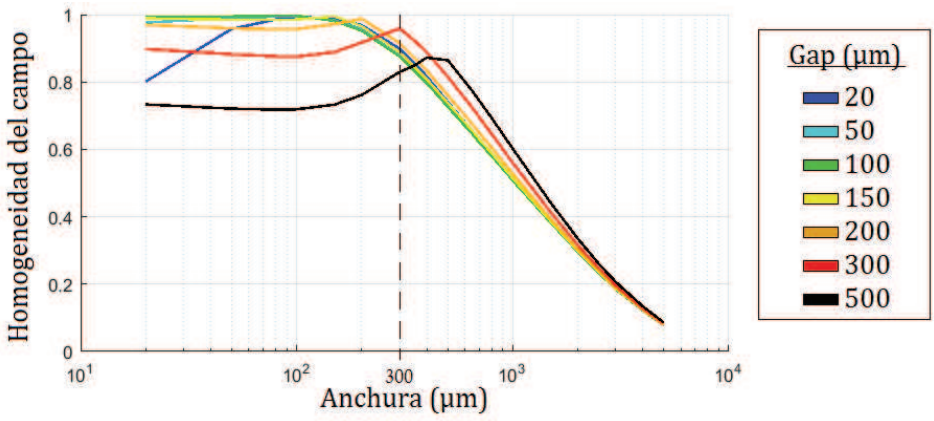


Figura 3.14: Homogeneidad del campo eléctrico en función de la anchura de la pista y de la separación entre ellas (gap)

La figura 3.14 muestra la influencia de las dimensiones del circuito en la homogeneidad del campo eléctrico. La conclusión más inmediata es que los campos más homogéneos se obtienen para geometrías de pistas con poca separación entre ellas. Para valores de anchura por debajo de 200 µm la forma del campo eléctrico es bastante plana, casi sin presentar oscilaciones, para pistas separadas menos de 200 µm. Es también notable que a partir de cierta anchura, entre 200 o 500 µm dependiendo de la separación, la homogeneidad del campo decrece abruptamente al aumentar la anchura.

De la lectura conjunta de las gráficas 3.13 y 3.14 podemos obtener las siguientes conclusiones:

- Aumentando la anchura de las pistas se consigue incrementar el valor máximo de intensidad del campo eléctrico, pero siempre a costa de aumentar la amplitud de las oscilaciones entre valores máximo y mínimo.
- Las regiones que presentan mayor homogeneidad pueden proporcionar un campo plano, sin oscilaciones. La configuración con mayor homogeneidad es la de 100 µm de ancho y 100 µm de separación, con un valor de H = 0,9968 y un valor medio de campo eléctrico de 452,9 V/m.
- Dentro de nuestro rango de posibilidades no es posible encontrar una configuración que proporcione simultáneamente

un campo homogéneo y con una intensidad relativamente alta, por encima de los 1000 V/m.

En ausencia de una geometría que destaque especialmente sobre las demás, el criterio ha sido elegir entre aquellas que presenten un mayor valor máximo de campo eléctrico sin presentar un valor mínimo demasiado poco intenso. De entre las configuraciones que cumplen estas condiciones se ha elegido la correspondiente a una anchura de pista de 3000 µm con una separación de 20 µm. Esta geometría ofrece un campo eléctrico con valores que oscilan entre 455 y 2437 V/m y un grado de homogeneidad de 0,1868.

3.3-FABRICACIÓN DEL CIRCUITO

El proceso de fabricación del circuito electroestimulador se divide en cuatro etapas. Excluyendo las etapas de diseño y simulación descritas en el apartado anterior, los pasos para la fabricación de un circuito electroestimulador completamente operativo son, en este estricto orden, las siguientes:

- **Deposición de capas delgadas**: en un primer paso se obtienen capas nanométricas de metal por el método del PVD descrito en el apartado 3.1.3.1.
- **Procesado láser de las capas:** en esta fase las muestras obtenidas mediante PVD sufren en su superficie un proceso de ablación láser que elimina selectivamente parte del metal con un patrón predefinido, dejando únicamente el circuito electroestimulador sobre el sustrato.
- **Tratamiento térmico del circuito:** el tercer paso consiste en un sencillo tratamiento térmico en el cual los circuitos se introducen en un horno a 200ºC durante dos horas. Este proceso ayuda a mejorar algunas de las propiedades de la capa, como la conductividad o su resistencia mecánica.

- **Cableado del circuito:** en una última etapa se adhieren al circuito los cables necesarios para conectarse al generador de señales eléctricas mediante una resina conductora.

El proceso total para obtener un microcircuito listo para ser utilizado es de al menos unas tres jornadas de trabajo: una primera jornada para realizar por completo el proceso de limpieza de los sustratos de vidrio, que dura aproximadamente dos horas, y luego introducirlos en la cámara de vacío para realizar el PVD, donde se necesitan unas 5 horas hasta que se alcance el nivel de vacío necesario. En la segunda jornada se realiza el procesado láser, el cual lleva aproximadamente una hora incluyendo preparación del set-up experimental, enfoque correcto del haz sobre la superficie de la muestra y procesado láser. Posteriormente los circuitos se introducen en el horno durante dos horas para el tratamiento térmico y se espera después a que la muestra enfríe, consumiendo en el total entre tres y cuatro horas, momento en el que se procede a conectar el cableado. Una vez colocada la resina debe permanecer en curación 24 horas, consumiendo otra jornada.

En la práctica, obtener un circuito desde cero suele llevar cuatro o cinco jornadas de trabajo debido a la dificultad de coordinar de forma óptima todas las etapas del proceso. Por suerte, debido a que el PVD nos permite obtener hasta 10 muestras de forma simultánea y que el procesado láser de una única muestra dura aproximadamente 30 minutos, cuando se desean fabricar varios circuitos de forma consecutiva el tiempo total no aumenta de forma notable, por lo que la completa fabricación de un único circuito consume prácticamente las mismas jornadas de trabajo que fabricar cuatro o cinco.

3.3.1 – Obtención de capas delgadas

En este apartado describiremos las etapas del proceso de fabricación correspondientes a la deposición de capas delgadas mediante la técnica del PVD y el tratamiento térmico. A pesar de que la etapa de tratamiento térmico se produce después del procesado láser se ha optado por explicar el proceso de caracterización de las capas

desde el punto de vista de las diferencias de calidad en los resultados según se realice o no este tratamiento para destacar su importancia.

Para la primera etapa de fabricación del circuito se introdujeron grupos de diez sustratos de vidrio en el interior de la cámara Balzers BAE 250. Los vidrios fueron cuidadosamente lavados según el protocolo explicado en el apartado 3.1.2.1 para minimizar la presencia de impurezas y aumentar su capacidad de adherencia.

En el interior de la cámara y con un vacío de 2 x 10^{-5} mbar inició el proceso de PVD a una ratio de deposición de 50 Å/s, hasta llegar a un espesor de 2019 Å, de acuerdo con el sensor situado en la parte superior de la cámara. Las muestras resultantes se guardaron en una caja especialmente diseñada para su almacenamiento (Figura 3.15) a la espera de ser procesadas mediante ablación láser en la segunda etapa de la fabricación:



Figura 3.15: Fotografía de las muestras de vidrio fabricadas mediante PVD.

La figura 3.15 muestra una de las muestras fabricadas mediante PVD junto con la caja de almacenamiento del resto de muestras. Las muestras permanecen protegidas y numeradas según su fecha de fabricación y su material a la espera de ser tratadas.

El tratamiento térmico de las muestras se produce inmediatamente después de la etapa de procesado láser, la cual detallaremos en el

siguiente apartado. Para este tratamiento las muestras se introducen en un horno precalentado a 200ºC durante dos horas. Este proceso de cocción ayuda a eliminar mediante evaporación las impurezas más superficiales de la capa, además de mejorar su resistencia mecánica[8]. Tras la cocción se espera a que las muestras enfríen para proceder con el cableado.

Para la caracterización de las capas se han obtenido imágenes de la sección transversal mediante un microscopio de electrones. Se han tomado imágenes de dos grupos de muestras, uno de los grupos sometido al tratamiento térmico y el otro grupo sin tratar. Todas las muestras de ambos grupos se fabricaron simultáneamente mediante PVD, para asegurar que cualquier diferencia que puedan presentar no se deba a los cambios en las condiciones de fabricación. La figura 3.16 muestra imágenes SEM de una muestra de aluminio sin tratar con diferentes aumentos

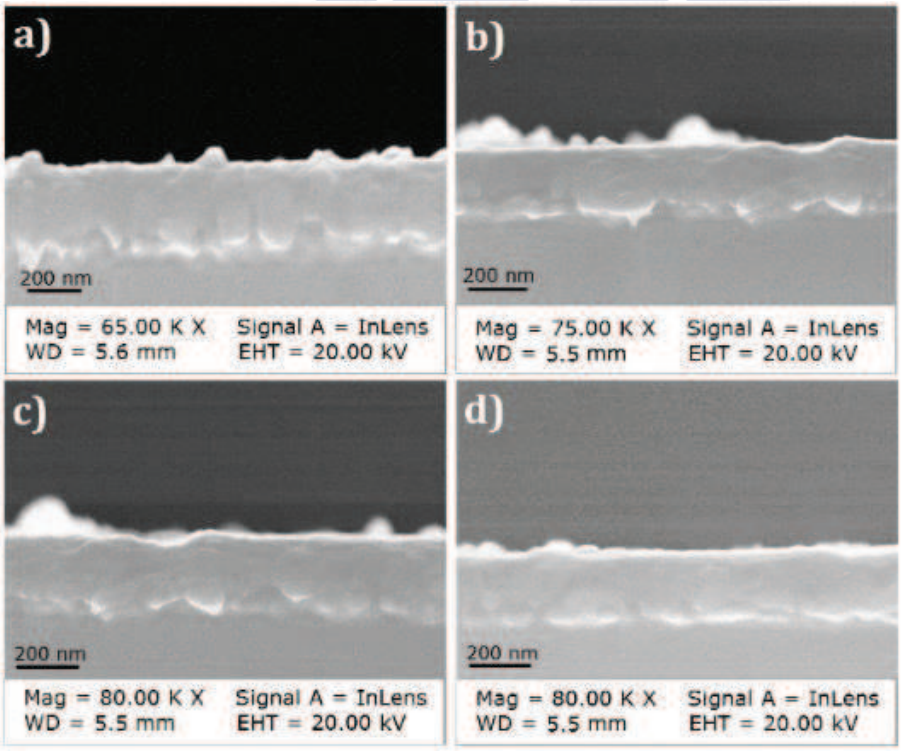


Figura 3.16: Imágenes tomadas con un microscopio SEM para una muestra de aluminio sin tratar térmicamente

La figura 3.16 muestra cuatro imágenes obtenidas mediante un microscopio de electrones para un rango de aumentos (Mag) de 65 K a 80 K, una distancia de trabajo (WD) de 5,6 y 5,5 mm y una tensión (EHT) de 20.00 KV. En las imágenes se observa que la superficie de la capa de aluminio presenta impurezas que aumentan la rugosidad de la capa. Para realizar la comparación se han obtenido las mismas imágenes para una muestra de aluminio fabricada con los mismos parámetros que la de la figura 3.16 pero sometida a tratamiento térmico (figura 3.17).

La figura 3.17 muestra los resultados medidos con microscopio de electrones de cuatro muestras tratadas térmicamente para un rango de aumentos (Mag) de 40 K a 80 K, una distancia de trabajo (WD) de 5,2 y una tensión (EHT) de 15.00 KV. Una rápida comparación entre ambos grupos de imágenes muestra que las capas tratadas térmicamente presentan muchas menos impurezas y su perfil es notablemente más liso y homogéneo.

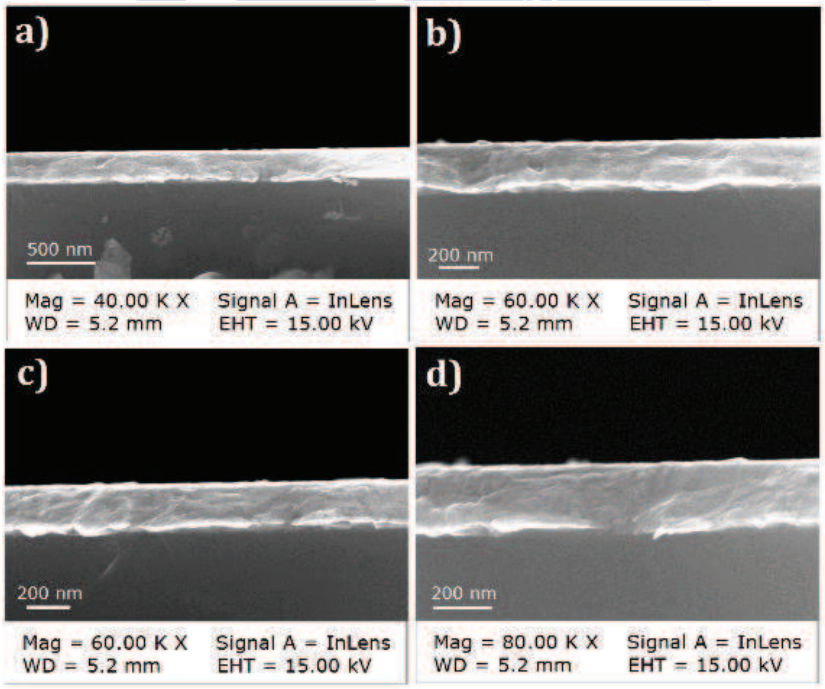


Figura 3.17: Imágenes tomadas con un microscopio SEM para una muestra de aluminio tratada térmicamente

Paralelamente a estas imágenes también se ha medido la conductividad de las capas para diferentes muestras de aluminio de diferentes espesores (50, 100 y 200 nm). Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 3.3: Medida de la conductividad para diferentes muestras de aluminio no tratadas térmicamente.

	Conductividad sin tratamiento térmico (S/cm)		
	200 nm	**100 nm**	**50 nm**
Medida nº1	$2,13x10^5$	$2,23x10^5$	$2,06x10^5$
Medida nº2	$2,27x10^5$	$2,19x10^5$	$1,92x10^5$
Medida nº3	$2,27x10^5$	$1,96x10^5$	$2,14x10^5$
Medida nº4	$2,36x10^5$	-	-
Medida nº5	$2,17x10^5$	-	-
Medida nº6	$2,30x10^5$	-	-
Media	**$2,27x10^5$**	**$2,13x10^5$**	**$2,04x10^5$**

En la tabla 3.3 se muestran los resultados de la conductividad, medida según el método descrito en el apartado 3.1.4, de un conjunto de muestras de aluminio que no habían sido tratadas térmicamente. En la tabla siguiente se muestran los resultados de la conductividad de un conjunto de muestras tratadas térmicamente:

Tabla 3.4: Medida de la conductividad para diferentes muestras de aluminio tratadas térmicamente.

	Conductividad tras el tratamiento térmico (S/cm)		
	200 nm	**100 nm**	**50 nm**
Medida nº1	$2,51x10^5$	$2,15x10^5$	$1,92x10^5$
Medida nº2	$2,62x10^5$	$2,10x10^5$	$2,28x10^5$
Medida nº3	$2,49x10^5$	$2,16x10^5$	$2,13x10^5$
Medida nº4	$2,53x10^5$	$2,32x10^5$	$1,98x10^5$
Medida nº5	$2,37x10^5$	$2,39x10^5$	$2,09x10^5$
Medida nº6	$2,43x10^5$	-	$2,29x10^5$

Media	**$2,50x10^5$**	**$2,22x10^5$**	**$2,11x10^5$**

Del estudio y la comparación de las tablas 3.3 y 3.4 se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- La conductividad del aluminio en estado natural es de $3,77x10^5$ S/cm, por lo que el proceso de PVD reduce la conductividad en todos los casos para el rango de espesores estudiado.
- La conductividad de la muestra se reduce con el espesor. En ambos casos, con o sin tratamiento térmico, las capas de 50 nm son las que presentan una menor conductividad, seguidas por las de 100 nm y finalmente las de 200 nm, que son las que mayor conductividad presentan.
- El tratamiento térmico ayuda a aumentar la conductividad de las capas. Para los tres espesores las capas tratadas muestran una conductividad de aproximadamente un 10% más que las que no han sido tratadas.

En definitiva, hemos comparado un grupo de capas de aluminio de diferentes espesores y la conclusión que ofrecen los resultados de la caracterización es que las capas tratadas térmicamente presentan una mayor calidad en el perfil, con muchas menos impurezas y una mayor homogeneidad, y presentan una mejora notable en la conductividad eléctrica.

3.3.2 – Parametrización láser

La etapa de parametrización láser consiste en encontrar los parámetros óptimos de nuestra herramienta láser para producir una ablación de las capas delgadas lo más eficiente posible. Para este proceso contamos con un láser Rofin Power Line 20E pulsado con una longitud de onda de 1064 nm y una duración de pulso de 20 ns. El láser dispone además de un sistema de espejos galvanométricos acoplado a la salida del haz controlados por ordenador, de forma que el recorrido

del haz a lo largo de una superficie pueda determinarse mediante un programa tipo CAD integrado en el propio láser.

A la hora de usar el láser para arrancar material de una superficie hay tres parámetros que merecen especial atención para optimizar el proceso de ablación: el amperaje aplicado al láser (el cual está relacionado directamente con la potencia del haz), la frecuencia de pulsos por segundo y la velocidad de barrido. Es necesario encontrar el conjunto o rango de valores que ofrezca mejores resultados tanto a la hora de eliminar el material como para dejar sobre el sustrato pistas con los bordes muy bien definidos.

La combinación entre amperaje y frecuencia está relacionada con la energía de cada pulso. Cuando esta energía es demasiado alta puede dañar el sustrato además de arrancar el material, mientras que si es demasiado baja la ablación no se llevará a cabo. Además, cuanto menor sea la energía (siempre que se elimine correctamente el material) más fino será el contorno dibujado, ofreciendo mayor nitidez en el circuito final. Finalmente, la relación entre la frecuencia y la velocidad de barrido marcará la densidad de pulsos por unidad de longitud. Una densidad demasiado baja tendrá como consecuencias cráteres demasiado separados, mientras que a mayor densidad aumentará la homogeneidad del surco de material eliminado. Una densidad de pulsos mayor no perjudicará el resultado final, pero aumentará de forma innecesaria el tiempo de fabricación del circuito.

El primer paso para la parametrización será determinar la energía umbral de ablación para una capa de aluminio de 200 nm de espesor. Posteriormente, y manteniendo fija la energía por pulso, probaremos diferentes combinaciones de frecuencia y velocidad de barrido para encontrar la relación óptima entre estos dos valores atendiendo al solapamiento espacial entre pulsos consecutivos. Posteriormente estudiaremos la relación entre la energía por pulso y el ancho de la línea generada para escoger un conjunto final de parámetros.

Tras determinar el conjunto de parámetros óptimo se fabricará el circuito mediante ablación láser, marcando el negativo del mismo sobre una de las capas de aluminio. Los resultados se comprobaron mediante

un microscopio Nikon MM-400 para confirmar que el aluminio se eliminó correctamente, que no existen impurezas ni cortocircuitos de por medio y que las pistas del circuito quedan bien definidas.

Previamente a la búsqueda del mejor conjunto de parámetros para nuestra aplicación será necesario conocer la potencia del láser para cada dupla de valores de amperaje y frecuencia para obtener la energía por pulso de cada configuración. En apartados posteriores se utilizará esta información para medir la relación existente entre la anchura de línea y la energía por pulso.

Para caracterizar la potencia del haz láser se coloca a su salida un potenciómetro modelo FieldMax II, de Coherent, se midió la potencia para un rango de frecuencias de 8 a 16 KHz y para un rango de amperaje de 15,5 a 24 A (Figura 3.18):

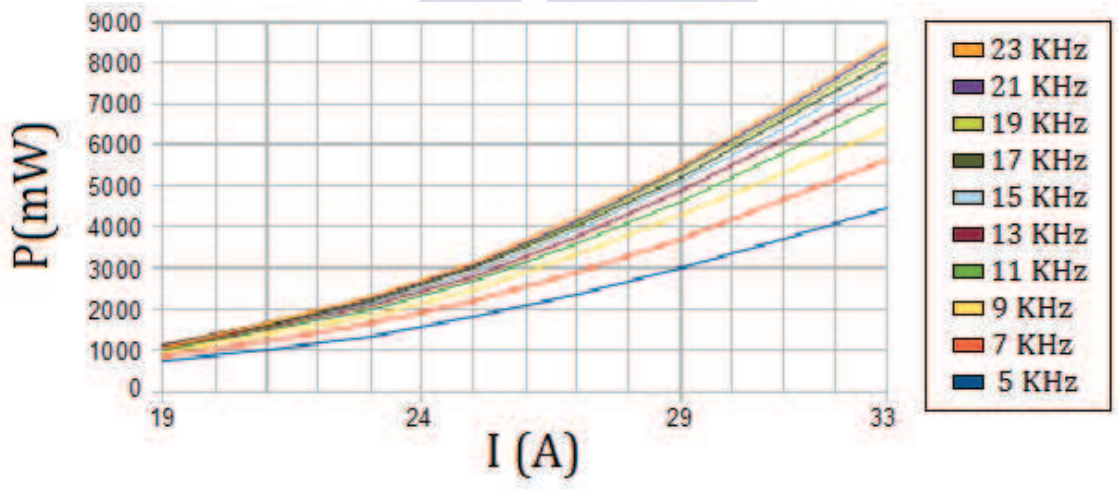


Figura 3.18: Relación entre la potencia del láser y el amperaje aplicado para diferentes frecuencias.

En la figura 3.18 se muestra la gráfica obtenida en base a los resultados de potencia del haz en función del amperaje y de la frecuencia de pulsos aplicada. De esta gráfica sacaremos las tablas que nos permitan conocer en todo momento la potencia y la energía por pulso a la salida del haz a partir de los parámetros láser que escojamos.

Durante los procesos de interacción láser – materia cada sólido tiene una energía umbral propia a partir de la cual el láser incidente es capaz de generar ablación. Esta energía umbral, que depende de las

propiedades del material, se puede calcular a relacionando los datos obtenidos de la fluencia del láser frente al diámetro del cráter generado. Paralelamente a la energía umbral tiene sentido hablar también de la fluencia umbral ($\mathbf{F_{th}}$), definida como la mínima cantidad de energía por unidad de área necesaria para inducir un cambio detectable (en términos de ablación) en la superficie del material.

Siendo **D** el diámetro del cráter generado, lo relacionamos con la fluencia (**F**) de la siguiente manera:

$$D^2 = 2\omega_0^2 ln\left({F}/{F_{th}}\right) = 2\omega_0^2\left(ln(F) - ln(F_{th})\right) \qquad (3.2)$$

Puesto que la relación entre la fluencia y la energía depende del tamaño del spot, una constante en este caso, la ecuación 3.1 se transforma en:

$$D^2 = 2\omega_0^2\left(ln(E) - ln(E_{th})\right) \qquad (3.3)$$

Haciendo una representación gráfica de $\mathbf{D^2}$ frente a la energía por pulso se puede obtener la fluencia umbral a partir de la energía umbral al obtener un ajuste lineal y despejar para el caso de $\mathbf{D = 0}$. Del mismo modo se puede obtener el valor de $\boldsymbol{\omega_0}$ gracias a la pendiente de la recta de ajuste, mostrada en la figura 3.19.

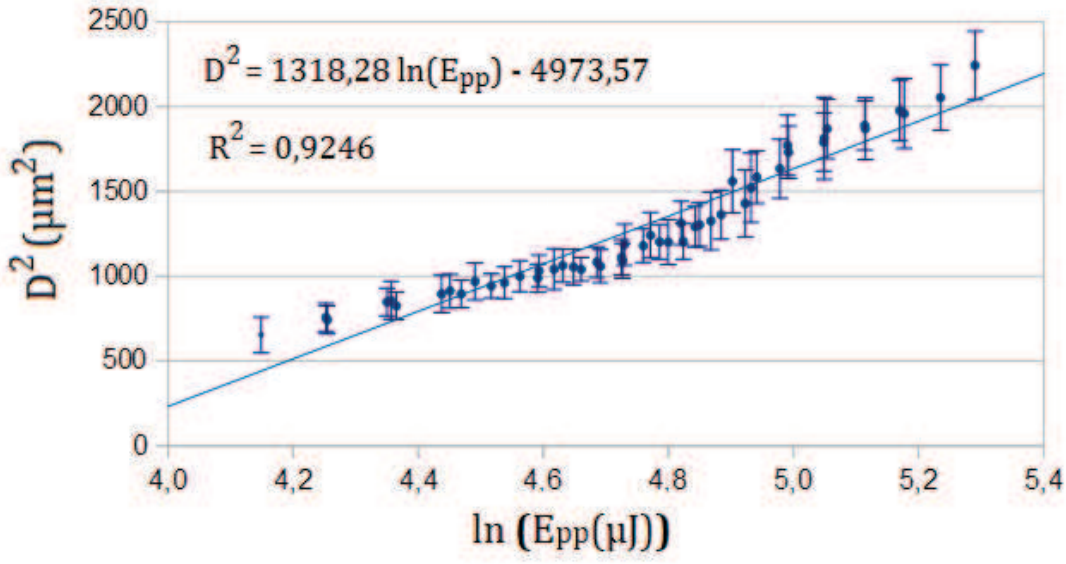


Figura 3.19: Relación entre la energía de los pulsos de ablación y el diámetro de los cráteres resultantes.

La figura 3.19 muestra la relación de los diámetros de los cráteres ablacionados (**D**) sobre una muestra de aluminio de 200 nm de espesor sobre un sustrato de vidrio aplicando pulsos de diferentes energías, representando la energía en escala logarítmica frente a $\mathbf{D^2}$. De los valores de la recta de ajuste obtenemos que la anchura del haz Gaussiano es de $\boldsymbol{\omega_0}$**=25,67 µm**, mientras que la fluencia umbral tiene un valor de $\mathbf{F_{th}}$**=4,20 J/cm^2**. Si comparamos estos resultados con el modelo teórico descrito en el capítulo anterior, de acuerdo con la ecuación 2.16b tenemos que para el caso del aluminio, usando pulsos de 20 ns y una longitud de onda de 1064 nm (asumiendo una reflectancia de 0,9 para esa longitud de onda) el cálculo ofrece una fluencia umbral de 4,28 J/cm^2, muy cercano a los resultados experimentales.

3.3.2.1 – Cálculo de la relación entre frecuencia de pulsos y velocidad de barrido del láser

La relación entre la frecuencia de pulsos del láser y la velocidad de barrido se puede simplificar definiendo el parámetro de superposición de pulsos consecutivos,

$$\Theta = 1 - \frac{v}{df} \tag{3.4}$$

Siendo **d** la anchura del cráter, este parámetro indica el grado de superposición entre pulsos, siendo mayor la superposición cuanto más próximo a 1 sea su valor. El primer objetivo será encontrar el valor mínimo de este parámetro que ofrezca resultados de calidad, es decir, que ofrezca un borde de línea lo suficientemente recto y bien definido. Por encima de ese valor de superposición se considerará que el resultado ofrecerá la misma calidad, pero aumentará innecesariamente el tiempo de fabricación del circuito. La figura 3.20 muestra los resultados para diferentes combinaciones de frecuencia y velocidad.

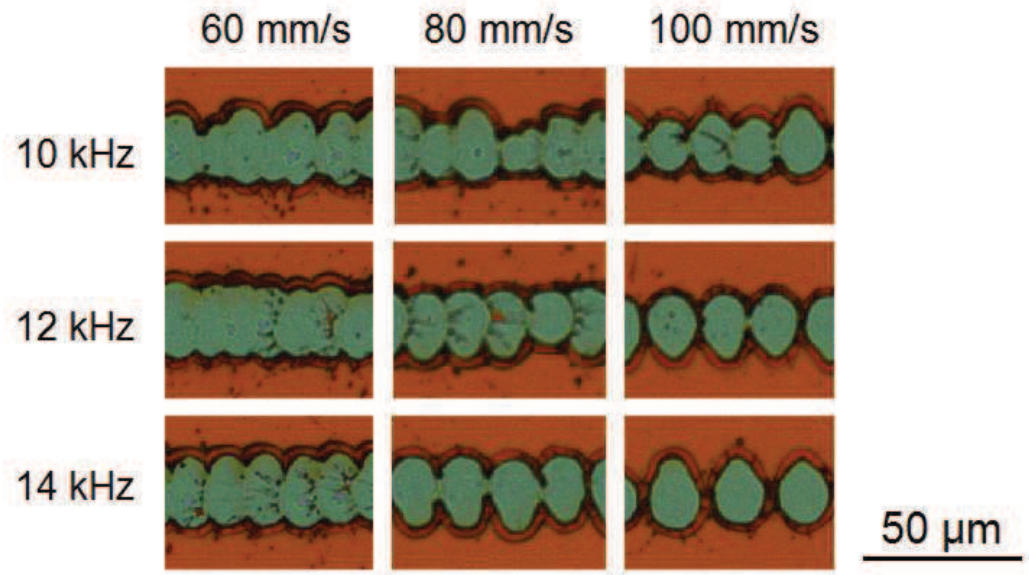


Figura 3.20: Fotografías de una línea realizada sobre una lámina de aluminio de 200 nm para diferentes frecuencias y velocidades.

La figura 3.20 muestra los resultados de diferentes surcos de ablación realizados con diferentes frecuencias de 10, 12 y 14 kHz para velocidades de 60, 80 y 100 mm/s. En todos los casos el amperaje se ajustó para obtener una energía por pulso de 40 µJ.

En base a los resultados concluimos que la muestra correspondiente a una velocidad de barrido de 60 mm/s y una frecuencia de 12 kHz es la que mejores resultados ofrece, a la cual le corresponde un valor de superposición de $\Theta = 0{,}66$. Este valor podría incrementarse reduciendo la velocidad de barrido, pero esto serviría únicamente para aumentar innecesariamente la duración del proceso sin resultados notablemente mejores. De aquí en adelante, una vez determinada la frecuencia de pulsos calcularemos la velocidad de barrido de acuerdo con este valor ($\Theta = 0{,}66$) y atendiendo a la anchura del cráter.

3.3.2.2 – Cálculo de la relación entre frecuencia de pulsos y amperaje aplicado al láser

La última etapa del proceso de parametrización consiste en obtener la relación óptima entre el amperaje aplicado y la frecuencia.

Debido a que el amperaje está directamente relacionado con la potencia del haz, para un mismo amperaje una mayor frecuencia implicará una menor energía por pulso y viceversa. El procedimiento consistió en utilizar capas de material fabricadas mediante PVD y realizar una serie de canales con diferentes valores de potencia y frecuencia, manteniendo siempre constante el grado de superposición calculado en el apartado anterior. Finalmente se mide la anchura del canal resultante en función de la fluencia aplicada.

Para obtener los valores de anchura de línea se obtienen fotografías a través del microscopio óptico y se procesan las imágenes mediante un código específico programado en Matlab (Figura 3.21). El código mide la anchura del canal en cada una de las secciones basándose en el cambio de intensidad de los píxeles de la imagen, tal y como se muestra en la figura 3.21 para uno de los canales realizados. En la figura 3.21a se muestra una fotografía obtenida a microscopio de uno de los canales realizados. La imagen se procesa a través de Matlab, el cual la almacena en formato RNG y de los tres colores coge únicamente el canal azul, mostrado en la figura 3.21b. La figura 3.21c muestra el perfil de la muestra para una recta transversal al canal, que se destaca en color rojo en la figura 3.21a.

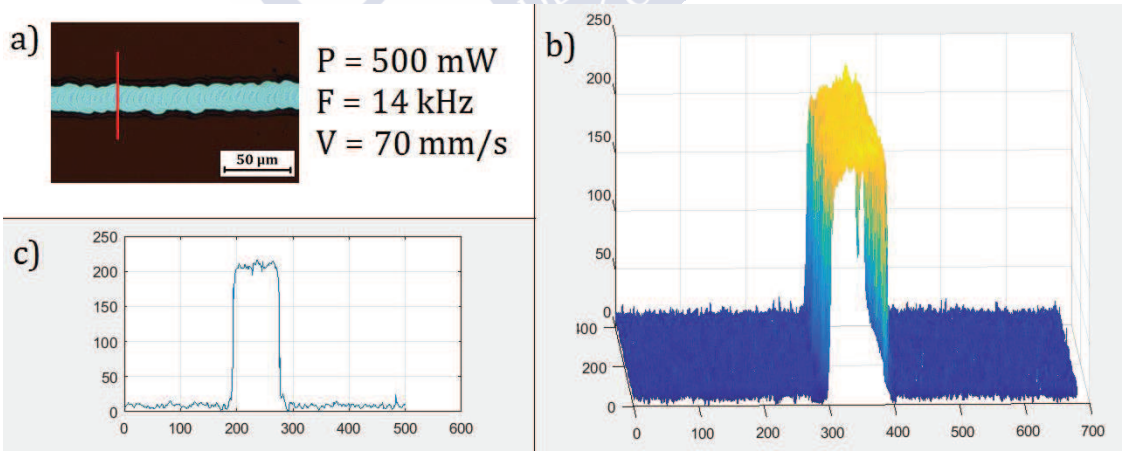


Figura 3.21: a) Fotografía de una muestra de un canal ablacionado, b) modelo en 3D de la muestra en función de la intensidad del canal azul de la imagen y c) perfil de una de las secciones del canal.

El programa obtiene este perfil para todos los puntos a lo largo de la longitud del canal y luego realiza una media para obtener con precisión

el valor medio de la anchura del surco. Mediante este método además del valor medio también es posible estudiar la rugosidad de los bordes del canal, observando la diferencia entre los valores máximos y mínimos de grosor y su distribución, de este modo podremos descartar aquellos conjuntos de parámetros que den como resultados canales con bordes demasiado irregulares.

Sobre una capa de aluminio de 200 nm de espesor ablacionamos diferentes canales en un rango de frecuencias de 8 a 14 kHz y en un rango de amperaje de 18 a 24 A, los cuales se corresponden con una potencia de entre aproximadamente 600 mW y 2,5 W. A continuación, se toman imágenes de todos los canales y se procesan en Matlab para obtener su anchura media y se obtienen representaciones gráficas de la anchura en función de la fluencia aplicada. Finalmente se realizan diferentes gráficas en función de la frecuencia de pulsos utilizada en cada caso. Este proceso se repite para capas de aluminio, plata y cobre. Los resultados se muestran en la figura 3.22.

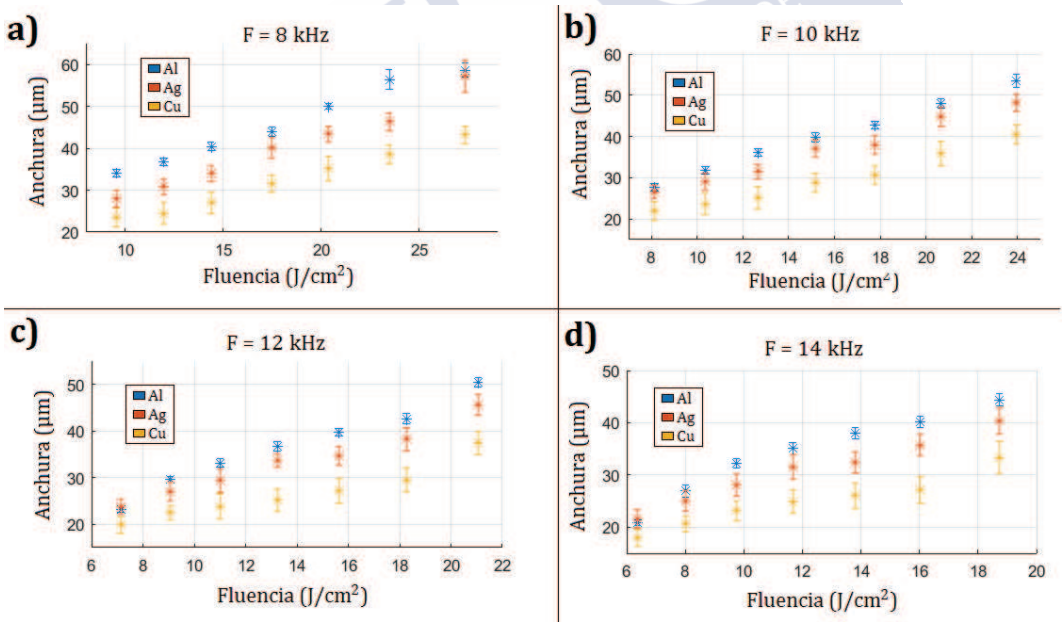


Figura 3.22: Representación de la anchura de los canales de ablación para capas de 200 nm de aluminio, plata y cobre en función de la fluencia del láser para frecuencias de repetición de a) 8 KHz, b) 10 KHz, c) 12 KHz, y d) 14 KHz.

La figura 3.22 representa gráficamente la relación entre la anchura de pulso del canal ablacionado y la fluencia láser aplicada sobre una capa

de 200 nm de aluminio, plata y cobre. Como resulta evidente el canal ablacionado es más ancho cuanto mayor es la fluencia aplicada. Destaca también el hecho de que de los tres materiales el aluminio parece ser el que presenta una mayor relación entre la energía aplicada y el material arrancado, siendo el cobre el que presenta la menor relación en este aspecto.

Otro factor en el que parece destacar especialmente el aluminio es en la regularidad del surco ablacionado. Si comparamos imágenes de surcos de los tres materiales se observa que con el cobre y la plata no se obtiene un perfil tan regular como en el caso del aluminio. A continuación, mostramos una comparación entre los canales fabricados con los tres materiales realizados con una fluencia de 17,7 J/cm^2 y una frecuencia de 10 kHz.

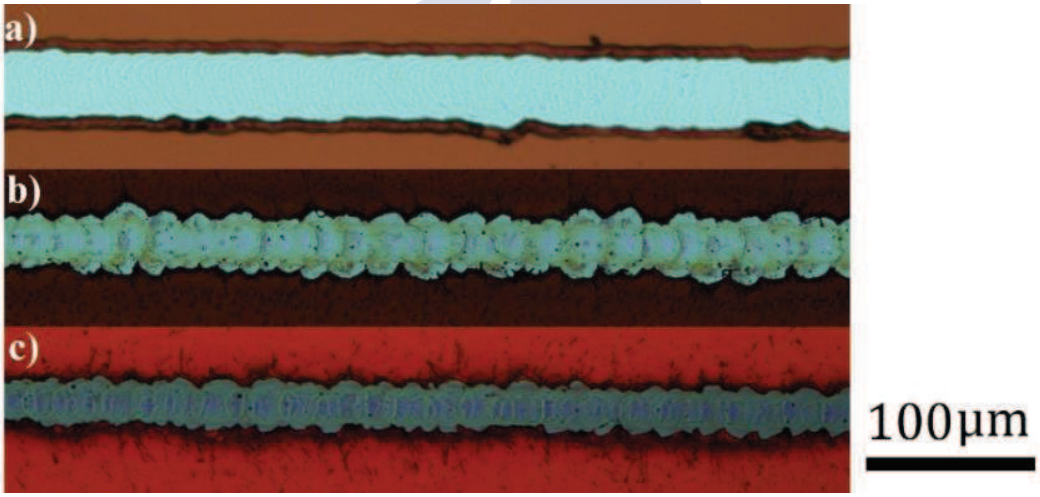


Figura 3.23: Canales de ablación en a) aluminio, b) plata y c) cobre.

En la figura 3.23 se observan tres surcos realizados en aluminio, plata y cobre con los mismos parámetros láser. Se observa como el canal de aluminio es el mejor definido, mientras que el cobre y la plata presentan perfiles más irregulares con incluso algunos daños sobre la capa. De hecho, si procesamos las imágenes en Matlab obteniendo la desviación estándar de la anchura se observa esta misma tendencia (figura 3.24):

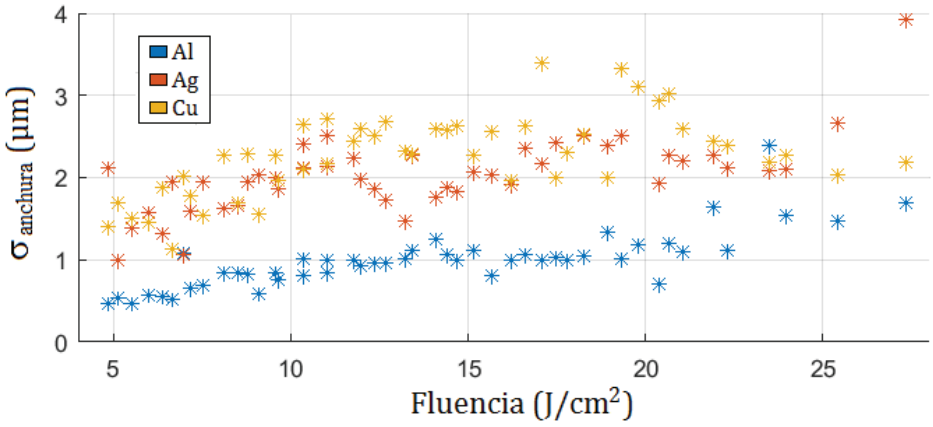


Figura 3.24: Desviación estándar de la anchura de los canales ablacionados

El gráfico de la figura 3.24 indica que el aluminio es el que presenta una menor desviación estándar al medir la anchura mediante Matlab. Para fluencias menores a 20 J/cm^2 este parámetro se mantiene en un valor cercano o menores a 1 µm, mientras en el caso de la plata y el cobre oscila con valores alrededor de 2 µm. En conclusión, el aluminio se presenta como la mejor de las tres opciones para la fabricación del circuito electroestimulador, no sólo por la ventaja de su menor coste sino por ofrecer resultados finales con un mejor acabado.

Para tener una mejor lectura de la influencia de todos los parámetros en la anchura de los canales de ablación realizados en aluminio juntamos las gráficas de la figura 3.22 relativas a este material en una sola imagen mostrada en la figura 3.25:

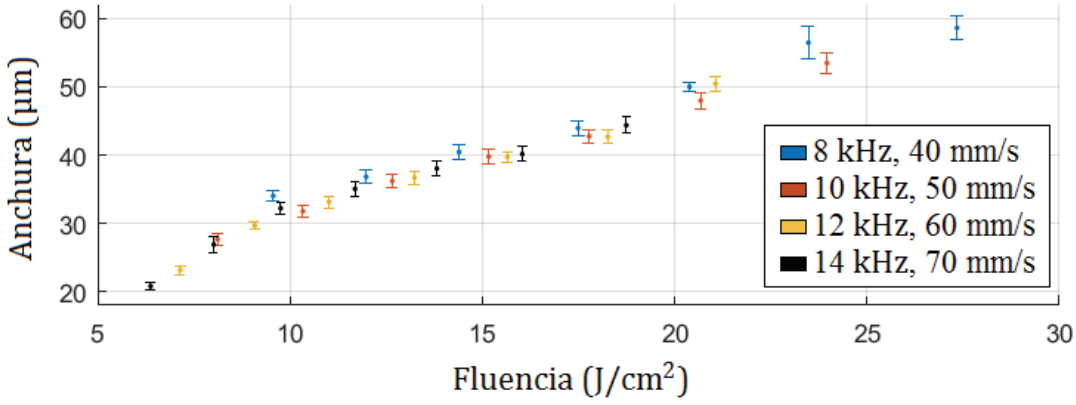


Figura 3.25: Relación entre la fluencia del láser a diferentes frecuencias y anchura del canal ablacionado en capas de aluminio de 200 nm de espesor

En los resultados mostrados en la figura 3.25 se observa una relación creciente entre fluencia y anchura de canal en donde no parece haber ninguna influencia por parte de la frecuencia de pulsos en el resultado final dentro del rango estudiado. De la lectura combinada de las gráficas mostradas en las figuras 3.24 y 3.25 los resultados nos muestran que hay más de una configuración que podemos escoger, sin existir un conjunto de parámetros que predomine claramente sobre el resto como mejor opción. La gráfica de la figura 3.24 nos indica que los perfiles más regulares se encuentran para fluencias menores a 20 J/cm^2, y la figura 3.25 nos da la relación entre la fluencia aplicada y el ancho del canal ablacionado, presentando un crecimiento casi lineal en el rango estudiado. El objetivo aquí es escoger una energía por pulso lo suficientemente alta como para asegurarnos una ablación que elimine por completo todo el aluminio, pero lo suficientemente baja como para ofrecer una anchura de línea relativamente pequeña, aumentando además la nitidez y la precisión del dibujo del circuito y buscando que el perfil marcado sea lo más regular y homogéneo posible.

Atendiendo a todos estos criterios se ha escogido fabricar el circuito con un amperaje de 19 A y una frecuencia de repetición de 12 kHz, a la cual le corresponde una velocidad de barrido de 60 mm/s de acuerdo con el grado de superposición que queremos alcanzar. A esta configuración le corresponde una potencia láser de 1125 mW, una energía por pulso de 94 μJ y una fluencia de 9,08 J/cm^2, cuyos resultados son canales de ablación de 29,66 ± 0,59 μm de anchura. De ahora en adelante este será el conjunto de parámetros que se usarán en la fabricación de cada circuito electroestimulador.

3.3.3 – Procesado láser

La última etapa de la fabricación del circuito electroestimulador consiste en eliminar parte de la capa de aluminio mediante ablación láser usando el conjunto de parámetros calculado en el apartado anterior. Para ello se dibuja previamente en el software del láser el negativo del circuito. Este dibujo marcará la región que recorrerá el foco del láser sobre la superficie de la muestra, arrancando material a

su paso. Al diseñarlo es necesario que las pistas dibujadas en el programa sean 30 µm más anchas de lo deseado para compensar la pérdida de material durante el proceso.

Durante el diseño del negativo del circuito es necesario incluir un parámetro adicional que el programa denomina "Ancho de línea". Al recibir instrucciones de ablacionar por completo una región del dibujo el software, por defecto, rellenará esa región con rectas paralelas que el foco del haz irá recorriendo, y el parámetro ancho de línea definirá la separación entre esas paralelas. Por coherencia se ha decidido que el grado de superposición entre dos surcos de ablación paralelos sea el mismo que el del propio surco: 0,66. Teniendo los canales una anchura aproximada de 30 µm les corresponde así un ancho de línea de 10 µm.

Una vez dibujado el circuito en el programa se coloca una capa obtenida mediante PVD de aluminio de 200 nm bajo el láser Rofin Power Line 20E, asegurando que se encuentre en todo momento en el plano focal de la lente de 100 mm de distancia focal ubicada a la salida del haz. Se comprueba también que el marcador de posición del haz se ajusta perfectamente con la posición de la muestra. Una vez que todas las comprobaciones sean positivas, se procede con la ablación.

La ablación de la capa que da forma al circuito dura aproximadamente 15 minutos por cada una de las pasadas que decidamos dar. Lo ideal es que el láser realice dos pasadas, perpendiculares entre ellas, para definir bien todos los bordes de la pieza y evitar que un exceso de carga acumulada en lugares indeseados por efecto punta[9] altere el campo eléctrico deseado. Un segundo motivo es que con un segundo barrido láser sobre la muestra nos aseguramos de eliminar por completo cualquier rastro de material que por diferentes circunstancias no haya sido eliminado de la superficie del sustrato la primera vez.

Tras finalizar el proceso de ablación se observa el resultado con un microscopio Nikon MM-400 para comprobar que el aluminio ha sido eliminado con éxito, que las pistas tienen las dimensiones deseadas, que los bordes están bien definidos y que no hay cortocircuitos. La figura 3.26 muestra dos circuitos fabricados con este procedimiento:

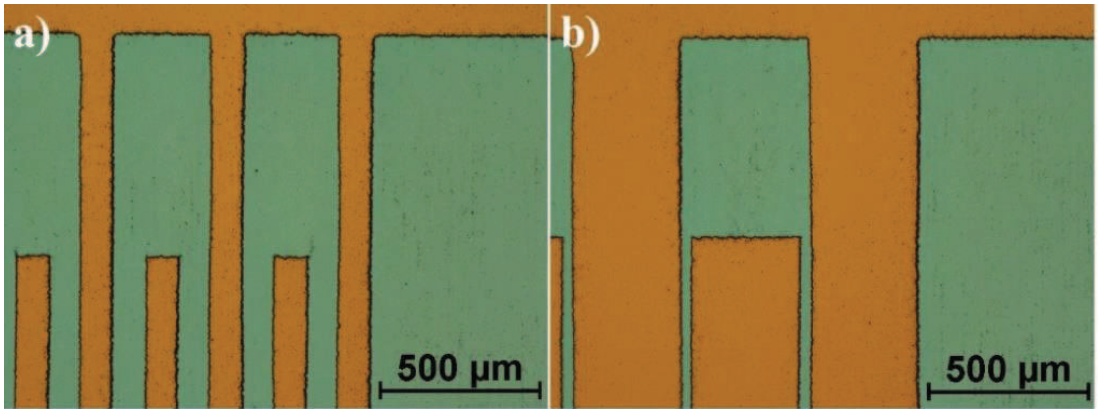


Figura 3.26: Circuitos fabricados mediante ablación láser sobre capas de aluminio de 200 nm de espesor con pistas de a) 100 µm y b) 350 µm.

En los circuitos mostrados en la figura 3.26 se observa que el aluminio que se deseaba eliminar ha sido ablacionado exitosamente, sin restos de material en la superficie del sustrato y en donde ambas regiones (vidrio y aluminio) se diferencian perfectamente. Las pistas y los bordes del circuito están además bien definidos, sin salientes abruptos y con un perfil muy regular. Además, no se aprecia ningún tipo de daño producido por el láser ni en la capa de aluminio ni en el sustrato.

Tras comprobar que la fabricación del circuito se ha realizado con éxito llegamos a la etapa del tratamiento térmico donde los circuitos recién fabricados se introducen en un horno a 200ºC durante dos horas. Los beneficios de esta etapa sobre las propiedades de la capa de material y la eliminación de impurezas superficiales se han discutido previamente en el apartado **3.3.1**.

3.3.4 – Cableado del circuito

El resultado de la peculiar fabricación del circuito ofrece un dispositivo cuyas conexiones electrónicas no se pueden realizar se la forma habitual, y la gran versatilidad disponible en la elección del material, geometría y dimensiones no se traduce en esta última etapa de la fabricación. Métodos habituales como la soldadura o incluso unas

simples pinzas de metal producirían daños irreparables en una capa de aluminio demasiado delicada.

La alternativa más adecuada para esta etapa es usar una resina epoxi conductora como adhesivo entre los cables de cobre y el circuito electroestimulador. Las resinas epoxis son una serie de polímeros denominados poliepóxidos que al reaccionar con ciertos endurecedores polifuncionales concretos se transforman en polímeros termoestables con propiedades ideales para la electrónica, tales como alta resistencia química, térmica y mecánica y una buena conductividad eléctrica.

En el cableado de nuestros circuitos hemos usado una resina epoxi[10] de la casa RS Pro cargada de plata como el elemento principal de su composición. Para aplicar la resina es necesario mezclarla previamente con el líquido endurecedor en una proporción de 1:1 y usar la mezcla resultante como adhesivo entre el circuito y el cableado. Finalmente deben dejarse en curación el tiempo suficiente para que la resina endurezca y adquiera todas sus propiedades. El proceso de curación es más rápido cuanto mayor sea la temperatura a la que se almacene, durando unas 24 horas a temperatura ambiente. En la figura 3.27 se presenta el resultado final de uno de los circuitos electroestimuladores tras pasar por todas las fases de la fabricación y ya cableado:

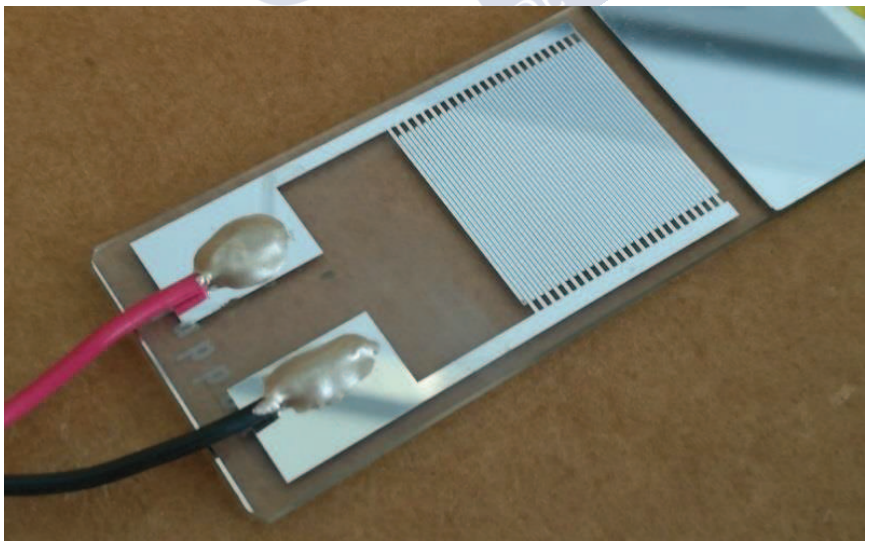


Figura 3.27: Circuito electroestimulador con cables pegados con resina epoxi.

El circuito presentado en la figura 3.27 ha pasado con éxito por todas las etapas del proceso de fabricación y está completamente preparado para inducir impulsos eléctricos sobre un cultivo celular. Dos cables de cobre han sido adheridos a los terminales del circuito, sin producir daños en la capa de aluminio, y serán conectados al generador de señales eléctricas.

3.4-FABRICACIÓN DEL CIRCUITO CON UN LÁSER DE FEMTOSEGUNDOS

Como trabajo complementario a la fabricación del circuito se ha optado por replicar el mismo resultado usando un láser pulsado de femtosegundos. Para ello se dispone de la salida de baja potencia del láser STELA del laboratorio L2A2 situado en Santiago de Compostela, cuya salida son pulsos con una longitud de onda de 800 nm y una duración de pulso de 35 fs con una frecuencia de repetición de 1kHz. Con esta nueva herramienta repetiremos el proceso de parametrización láser y fabricación del circuito, mientras que el resto de etapas se realizarán de la misma forma.

3.4.1 – Parametrización láser

A diferencia de la parametrización láser que se realizó con el láser de femtosegundos esta vez tendremos menos variables para controlar. Debido a que la frecuencia de repetición permanece fija únicamente es posible variar la velocidad de barrido del láser y la energía por pulso.

Sobre una capa de aluminio de 200 nm de espesor se ablacionaron canales con diferentes velocidades de 50 a 250 μm/s y con una potencia del láser de 0,3 a 1,4 mW. Los resultados se muestran en la figura 3.28:

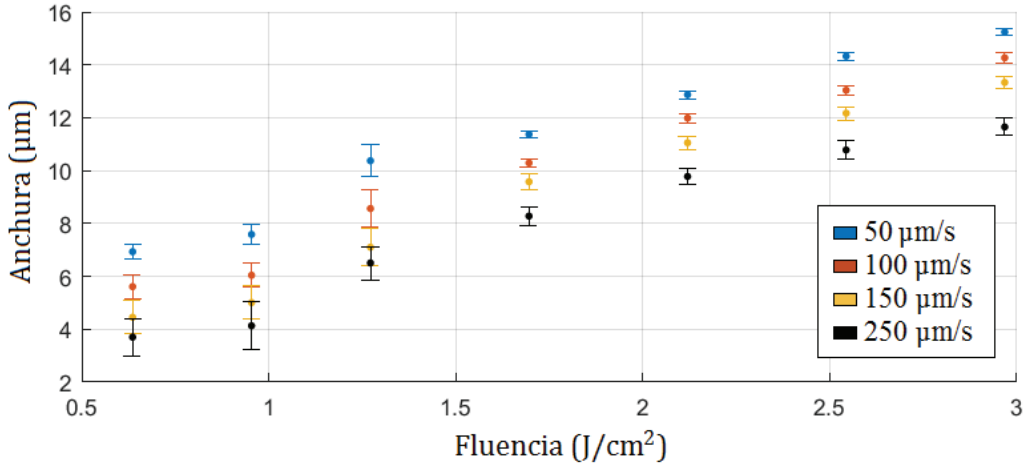


Figura 3.28: Relación entre la fluencia del láser y la anchura del canal ablacionado para diferentes velocidades

En los resultados de la figura 3.28 se observa que, como era de esperar, la anchura del surco ablacionado aumenta con la fluencia aplicada a la superficie. Además, los canales más anchos son los que han sido ablacionados a menor velocidad, al implicar un mayor tiempo de interacción láser-materia y un mayor grado de superposición. De forma general para el rango estudiado la anchura presenta un comportamiento creciente con la fluencia y decreciente con la velocidad de barrido.

Si estudiamos en detalle las imágenes de los canales, tomadas con el microscopio se puede observar que la regularidad del perfil del surco es menor para fluencias bajas. Esto se puede apreciar visualmente en la figura 3.29.

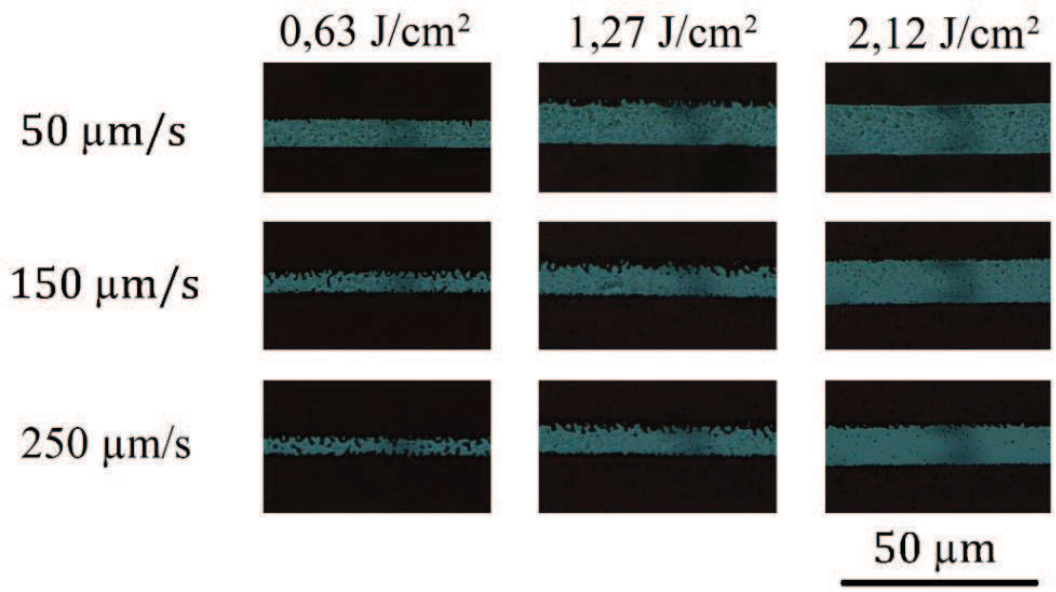


Figura 3.29: Fotografías de los canales de ablación realizados con el láser de fs sobre una capa de aluminio de 200 nm para diferentes velocidades y fluencias

Las imágenes de la figura 3.29 muestran surcos de ablación realizados con diferentes combinaciones de velocidad y fluencia. Las de fluencias más bajas (columna izquierda) presentan los bordes peor definidos, con parte del material sin arrancar. Esta irregularidad se hace más notable a velocidades mayores, pues ha habido incluso menos tiempo de interacción y por tanto se ha arrancado menos material.

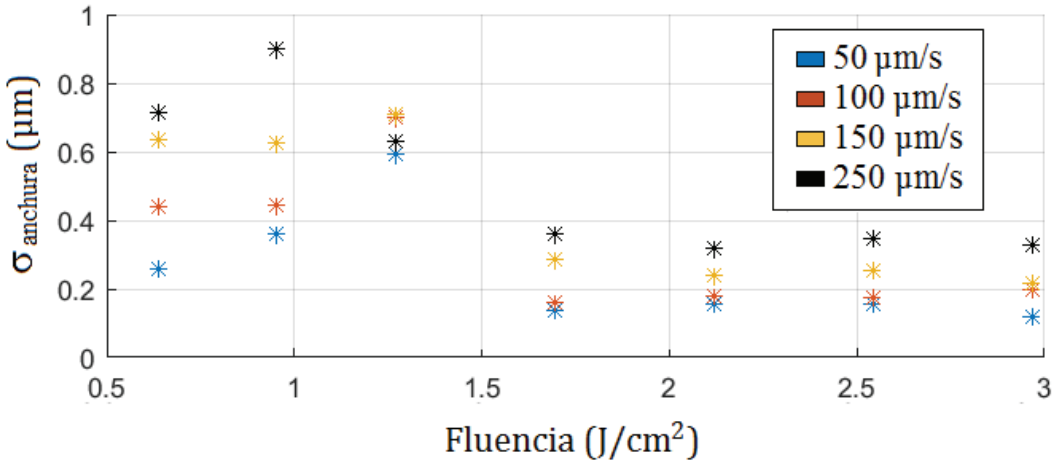


Figura 3.30: Desviación estándar de la anchura de los canales ablacionados

La dependencia de la regularidad del perfil con la velocidad y la fluencia se aprecia mejor al procesar las imágenes en Matlab

obteniendo la desviación estándar de la anchura, tal y como se muestra en la figura 3.30. La lectura de la gráfica indica que el perfil es más regular para fluencias mayores a 1,5 J/cm^2, donde se observa que la desviación estándar se estabiliza las fluencias mayores. Se hace evidente también en esa región la dependencia de la velocidad, siendo la desviación típica menor cuanto más baja sea la velocidad utilizada.

Finalmente, de las figuras 3.28 y 3.30 se concluye que si buscamos la configuración que resulte en el canal más estrecho posible pero a su vez con un perfil altamente regular la mejor configuración corresponde a la de pulsos de 80 μJ de energía (cuya fluencia correspondiente es de 1,69 J/cm^2) a una velocidad de barrido de 100 μm/s. Una energía menor daría como resultado un perfil demasiado irregular, y una velocidad menor daría como resultado un perfil ligeramente más regular pero con un canal notablemente más ancho. En definitiva, con estos parámetros somos capaces de conseguir canales con una anchura de 10,29 ± 0,16 μm.

3.4.2 – Procesado láser

Para realizar el marcado del circuito electroestimulador sobre una capa de aluminio con el láser STELA es necesario previamente dibujar el negativo del circuito en AutoCAD para que el software del láser pueda procesarlo. En este dibujo es necesario que las pistas dibujadas en el programa sean 10 μm más anchas de lo deseado para compensar la pérdida de material durante la ablación. El parámetro de ancho de línea está fijado en 4 μm de separación entre dos líneas paralelas consecutivas.

Tras dibujar el circuito en el programa se fijan los parámetros de velocidad y potencia correspondientes calculados en el apartado anterior. Se coloca una muestra con una capa de aluminio de 200 nm en el plano focal del microscopio y se inicia el marcado. En este caso no se ha realizado el circuito completo, sino únicamente una porción contenida en un área de 7 mm x 7 mm. La figura 3.31 muestra la porción de circuito fabricado con este procedimiento:

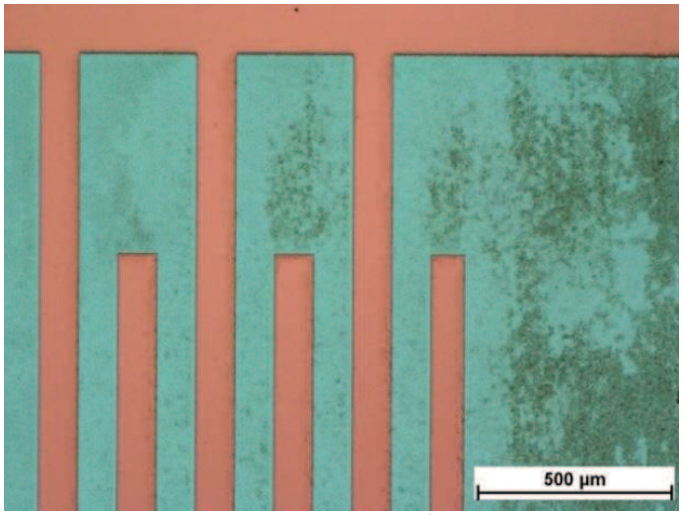


Figura 3.31: Circuito fabricado con el láser de femtosegundo STELA

En la figura 3.31 se muestra una región de un circuito fabricado con la salida de baja potencia del láser STELA. Se observa que al igual que con el procesado del láser de nanosegundos el material ha sido eliminado con éxito sin dañar el sustrato de vidrio, y un vistazo más en detalle muestra los bordes están incluso mejor definidos. Sin embargo en la parte derecha de la imagen hay una gran cantidad de suciedad generada durante la ablación y que ha sido arrastrada y acumulada en esa región.

Como complicación, el tiempo necesario para fabricar esta pieza ha sido excesivamente alto dada su baja velocidad de barrido y la poca anchura de los canales. Se ha tardado 4 horas en fabricar una porción reducida, estimando que para fabricar el circuito completo se hubiese necesitado un tiempo total de aproximadamente 50 horas.

3.5-RESUMEN

En este capítulo se ha desarrollado el procedimiento para conseguir un circuito electroestimulador completamente funcional, explicando el proceso de obtención de capas delgadas y su procesado láser de forma paralela a las simulaciones de campo eléctrico realizadas.

Inicialmente se han expuesto los dos métodos propuestos para la obtención de capas delgadas y se ha llegado a la conclusión de que la

técnica del PVD presenta muchas más ventajas para nuestra aplicación. Se ha detallado el protocolo de limpieza aplicado a los sustratos de vidrio y se han mostrado los resultados de las capas delgadas de material obtenidas con este método.

Paralelamente se han mostrado los modelos utilizados para las simulaciones en COMSOL del campo eléctrico generado por el circuito sobre la superficie de un vidrio delgado. Se han optimizado el campo obtenido en base al material y a la geometría del circuito, y se ha concluido que la elección entre aluminio, plata y cobre es irrelevante para el resultado final. Se ha comprobado la poca influencia del espesor de la capa en el campo eléctrico y se han mostrado las diferentes formas e intensidades del campo eléctrico en función de las dimensiones de las pistas conductoras.

En el proceso de fabricación del circuito electroestimulador se ha utilizado un láser operando en el régimen de nanosegundos y otro en el de femtosegundos. En ambos casos se ha conseguido generar un microcircuito con pistas bien definidas, eliminando con éxito el material depositado y sin dañar el sustrato de vidrio a causa de la interacción láser-materia. Sin embargo, el circuito fabricado con el láser de pulsos de femtosegundos ha acumulado demasiados restos de material arrancado en las regiones en las que más ha pasado el láser.

Para las dimensiones del circuito diseñado el láser de nanosegundo se presenta como la mejor alternativa. A pesar de que el láser de femtosegundos obtiene bordes mejor definidos, las pistas obtenidas con el láser de nanosegundo presentan una definición más que aceptable, con la ventaja de que el proceso es muchísimo más rápido. El campo eléctrico inducido para ambos circuitos no se ve afectado por la diferencia en el acabado de uno y otro sistema láser. Debido al efecto difusor del vidrio delgado, las minúsculas rugosidades del perfil de las pistas del circuito fabricado con el láser de nanosegundo no son perceptibles ni en la forma ni en la magnitud del campo eléctrico inducido al cultivo celular. La única ventaja del sistema del láser de femtosegundo se encuentra en su capacidad de generar microcanales más estrechos, por lo que es la mejor opción cuando se desea crear estructuras de menor dimensiones.

REFERENCIAS

[1] B. Yafouz, N. A. Kadri, and F. Ibrahim, "The design and simulation of a planar microarray dot electrode for a dielectrophoretic lab-on-chip device," *Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 7, no. 12, pp. 12054–12063, 2012.

[2] M. H. Wu and G. M. Whitesides, "Fabrication of arrays of two-dimensional micropatterns using microspheres as lenses for projection photolithography," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 78, no. 16, pp. 2273–2275, 2001.

[3] A. Aragón *et al.*, "Fabrication of a Cell Electrostimulator Using Pulse Laser Deposition and Laser Selective Thin Film Removal," in *Laser Ablation - From Fundamentals to Applications*, T. E. Itina, Ed: IntechOpen, Rijeka, 2017.

[4] J. Degner, F. Singer, L. Cordero, A. R. Boccaccini, and S. Virtanen, "Electrochemical investigations of magnesium in DMEM with biodegradable polycaprolactone coating as corrosion barrier," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 282, pp. 264–270, 2013.

[5] A. Semisch, J. Ohle, B. Witt, and A. Hartwig, "Cytotoxicity and genotoxicity of nano - and microparticulate copper oxide: Role of solubility and intracellular bioavailability," *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 11, p. 10-15, 2014.

[6] M.-T. Chen, C. Jiang, P. T. Vernier, Y.-H. Wu, and M. A. Gundersen, "Two-dimensional nanosecond electric field mapping based on cell electropermeabilization," *PMC Biophys.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–16, 2009.

[7] E. D. Palik, *Handbook of optical constants of solids*, vol. 3. Academic press, Saint Louis, 1998.

[8] F. Rey-Garcia *et al.*, "Fabrication of metal-on-glass high-pitch adapters between VLSI electronics and semiconductor sensors by laser ablation," *J. Light. Technol.*, vol. 31, no. 14, pp. 2327–2331, 2013.

[9] C. B. Moore, G. D. Aulich, and W. Rison, "Measurements of lightning rod responses to nearby strikes," *Geophys. Res. Lett.*, vol. 27, no. 10, pp. 1487–1490, 2000.

[10] B. Ellis, Ed., *Chemistry and Technology of Epoxy Resins*. Chapman & Hali, Dordrecht, 1993.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4 RESULTADOS DE LA ELECTROESTIMULACIÓN CELULAR

En el capítulo anterior se ha descrito el proceso de fabricación y caracterización de un circuito electroestimulador. La segunda parte del proyecto, en la cual se centra este capítulo, consiste en fabricar y validar el dispositivo construido alrededor de dicho circuito.

Para completar el dispositivo se describirá la fabricación del resto de sus componentes que forman el prototipo inicial y su ensamblaje. Junto con este procedimiento se avanzará a través de los distintos cambios en el diseño surgidos a raíz de los impedimentos encontrados a lo largo de la etapa de validación hasta llegar a la versión final, sobre la que se han realizado los experimentos con células. Paralelamente, junto con el diseño del dispositivo se detalla también el instrumental y el software utilizado para generar la señal eléctrica aplicada al circuito.

En la etapa de validación el objetivo es encontrar una respuesta celular al estímulo eléctrico. Se describirán los experimentos en donde cultivos celulares situados sobre el circuito se exponen a campos de diferentes propiedades durante diferentes períodos de tiempo.

Finalmente se expondrán y discutirán los resultados de la respuesta celular a los diferentes tipos de estímulos junto con las conclusiones del capítulo.

4.1-MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.1-Fabricación de los elementos del dispositivo

Para obtener el dispositivo electroestimulador por completo el paso posterior a la fabricación del circuito es ensamblarlo en una estructura compacta con un receptáculo para el cultivo celular. Para mantener el dispositivo compacto se utilizarán dos láminas de policarbonato incoloro de la casa Tenplass de dimensiones 70 mm x 50 mm x 3 mm procesadas manualmente en la fresadora de precisión FF 400 de la casa Proxxon (figura 4.1):

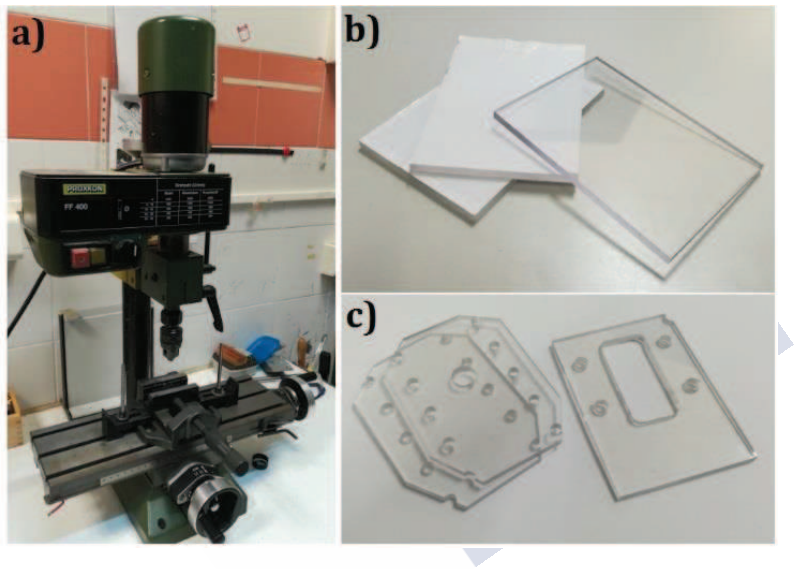


Figura 4.1: a) Fresadora de precisión FF 400 de Proxxon. b) Láminas de policarbonato sin procesar y c) láminas de policarbonato procesadas

Las láminas de policarbonato transparente (figura 4.1b) se perforan usando la fresadora de precisión mostrada en la figura 4.1a. En la figura 4.1c se observa el resultado de diferentes placas procesadas de esta manera, con huecos alineados para compactar dos placas que se sitúen en las partes superior e inferior del dispositivo electroestimulador. Las láminas destinadas a la parte superior presentan un hueco adicional cerca del centro a través del que se introducen las células.

Como receptáculo para el cultivo celular se utiliza una lámina de polidimetilsiloxano (PDMS)[1], un polímero orgánico biocompatible basado en silicio. Esta lámina se fabrica usando el kit 184 Silicone Elastomer de la casa Ellsworth (figura 4.2)

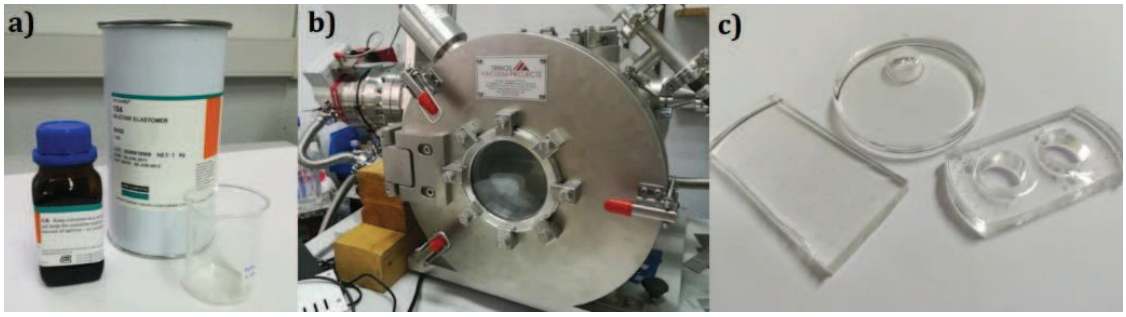


Figura 4.2: a) Componentes del kit 184 Silicone Elastomer. b) Cámara de vacío. c) Láminas de PDMS fabricadas.

La figura 4.2a muestra los componentes necesarios para crear PDMS. La base de silicona se mezcla con el componente endurecedor en una proporción de 10:1 y se remueve hasta asegurar una mezcla homogénea, lo que genera una gran cantidad de burbujas de aire en el interior del compuesto que afectará críticamente a la calidad del resultado final. Para eliminar el gas de su interior se introduce la mezcla en una cámara de vacío de la casa Trinos (figura 4.2b) a una presión inferior a 20 mbar durante aproximadamente 40 minutos, tiempo suficiente para que las burbujas de gas desaparezcan. Finalmente se vierte cuidadosamente la mezcla en un molde y se cura en un horno a 50ºC durante al menos cinco horas. En la figura 4.2c se muestran algunos ejemplos de láminas obtenidas con esta técnica.

4.1.2-Control de la señal eléctrica

La señal eléctrica aplicada al electroestimulador se genera mediante el dispositivo NI USB-6501, de National Instruments. Se trata de un generador con 24 terminales de salida y 6 de tierra que proveen una diferencia de potencial de 5 V. El dispositivo se conecta al ordenador vía USB y se controla a través de un programa externo.

En la figura 4.3 se muestran tanto el dispositivo como sus conexiones con los circuitos. En la figura 4.3b se muestra una fotografía de una conexión entre el dispositivo NI USB-6501 y uno de los circuitos fabricados. Un conjunto de cables sale de los terminales del generador y llegan hasta una regleta en la que también se enchufan los cables del circuito, conectándolos ente sí.

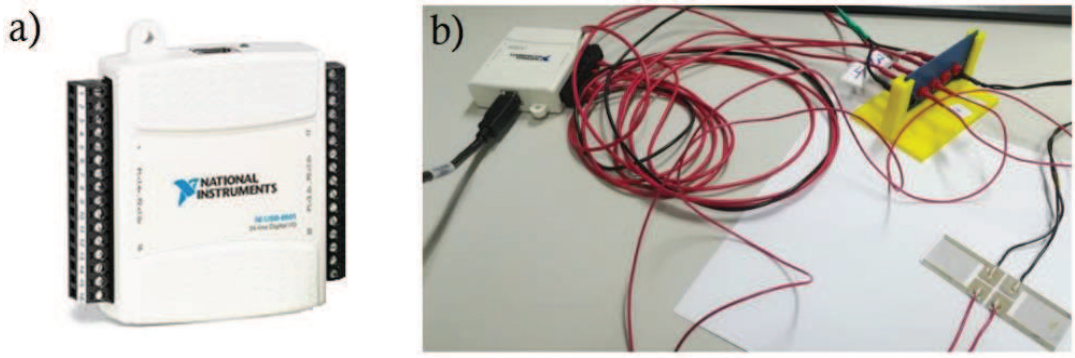


Figura 4.3: a) Dispositivo NI USB-6501 y b) imagen del dispositivo conectado a dos circuitos fabricados sobre un mismo sustrato

El programa que controla la señal eléctrica en cada uno de los terminales ha sido creado en la versión de 2014 del software LabVIEW, de National Instruments.

4.1.3-Protocolo del cultivo celular

Las células utilizadas en los experimentos de electroestimulación fueron cardiomioblastos de rata (H9c2) (ATCC, Manassas, VA, USA). Antes de comenzar a trabajar con ellas se aplica sobre la superficie de una placa de vidrio gelatina de cerdo (Sigma-Aldrich G2500) al 0,1% en agua destilada durante unos 10 minutos a 37ºC. Este tratamiento ayudará a que las células puedan adherirse con facilidad a la superficie.

Una vez preparada la superficie de la placa de vidrio se colocan las células diluidas en medio celular DMEM (del inglés, Dulbecco's Modified Eagle Medium [2][3]) completo (10% FBS (suero bovino-fetal), 1% penilicina/estreptomicina, 1% L-Glutamina) y se espera unas 24 horas hasta el siguiente paso. La cantidad de células se ha estimado usando una cámara de recuento Neubauer (Brand, 718605).

El último paso antes de los experimentos es serodeprivar el cultivo celular, es decir, cambiar el medio en el que se encuentran por un medio DMEN sin el suero FBS. En ausencia de este componente el cultivo no tendrá los nutrientes necesarios para proliferar de forma natural. Tras este paso el cultivo está preparado para la electroestimulación.

Todos los pasos descritos hasta ahora se realizan en el interior de una campana de cultivo de flujo laminar para separar el aire de su interior con el exterior. Previamente la campana se ha irradiado con luz ultravioleta durante 20 minutos para su esterilización.

La estimulación eléctrica del cultivo celular se ha llevado a cabo en el interior de un incubador Galaxy 170 S (Eppendorf) a 37ºC con una concentración de CO_2 del 5%.

4.1.4-Caracterización óptica del cultivo

Las imágenes del cultivo celular se han obtenido usando el microscopio óptico Olympus IX51. Para obtener imágenes de microscopía de fluorescencia se ha utilizado el microscopio confocal Leica TSC SP8, del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.

La fluorescencia en el cultivo celular se ha inducido usando un marcador fluorescente DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) de la casa Abcam[4][5]. Para aplicar este marcador primero se han de fijar las células después de la estimulación eléctrica para evitar su putrefacción en ausencia de medio celular. El proceso de fijación consiste en cambiar el medio DMEM por metanol enfriado a 20ºC y aplicado durante unos 15 minutos, tras lo cual se retira y se guardan las muestras en una nevera a una temperatura de 4ºC.

Para que los componentes del marcador DAPI puedan penetrar en las células es necesario permeabilizar previamente la membrana celular aplicando el componente Triton X-100 (Sigma Aldrich) en una solución al 0,1% a temperatura ambiente durante unos 10 minutos. El siguiente paso consiste en aplicar al cultivo albúmina de suero bovino (BSA) en una solución al 1% a temperatura ambiente durante 30 minutos. Este componente ayudará a bloquear la absorción del marcador DAPI mediante interacciones no deseadas que puedan concurrir en falsos positivos. Finalmente se aplica el componente DAPI al cultivo de forma que cubra toda la superficie de la placa.

El recuento de las células para el procesamiento de las imágenes de fluorescencia se ha realizado usando la aplicación de conteo de partículas del software ImageJ.

4.2-ENSAMBLAJE Y DISEÑO DEL DISPOSITIVO

Para realizar los experimentos necesitaremos un sistema en el que poder encapsular el medio celular mientras recibe el estímulo eléctrico. La idea original se basa en crear una lámina PDMS con un hueco en el centro de la misma en donde se ubicarán las células. La lámina se coloca justo encima del circuito, con un vidrio delgado de 100 µm entre ambos para evitar el contacto directo entre los electrodos y las células. Finalmente, el sistema se ensambla entre dos láminas finas de policarbonato para mantener el dispositivo rígido y compacto. La estructura del dispositivo se muestra en la siguiente figura.

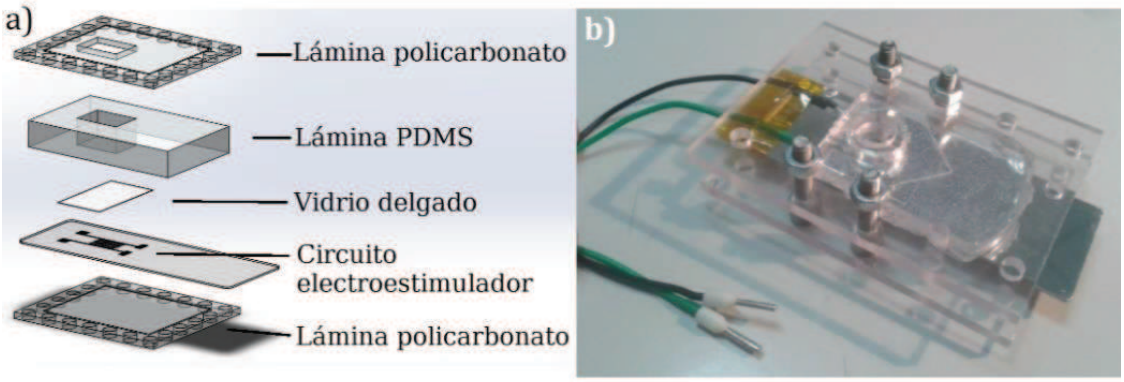


Figura 4.4: a) Estructura del dispositivo electroestimulador y b) fotografía del dispositivo completo

En la figura 4.4a se muestra capa a capa la estructura del dispositivo electroestimulador completo, mientras que en la figura 4.4b se muestra una fotografía del mismo. El ensamblaje se completa con dos pares de tornillos que se colocan a los lados de las dos láminas de policarbonato y mantienen la estructura apretada para evitar fugas de líquido.

Las primeras pruebas con este prototipo evidenciaron que el diseño debía ser mejorado. A pesar de que la estructura se mantenía compacta parte del líquido del medio celular acababa por filtrarse y salir del recinto en el que estaba confinado, lo cual acarrea consecuencias muy graves. En primer lugar, las perjudiciales para el propio cultivo celular:

la ausencia total de medio provocará la muerte celular, y el filtrado de parte del medio puede provocar, en contacto con los electrodos, una corriente eléctrica a través de las células que interfiera con el resultado del experimento. En segundo lugar, las consecuencias más inmediatas son las que tienen que ver con el circuito electroestimulador: en contacto directo con el medio celular, la señal eléctrica aplicada al electroestimulador produce una reacción electroquímica que consume e inhabilita rápidamente los electrodos[6][7]. Las consecuencias de este fenómeno se muestran en la figura 4.5.

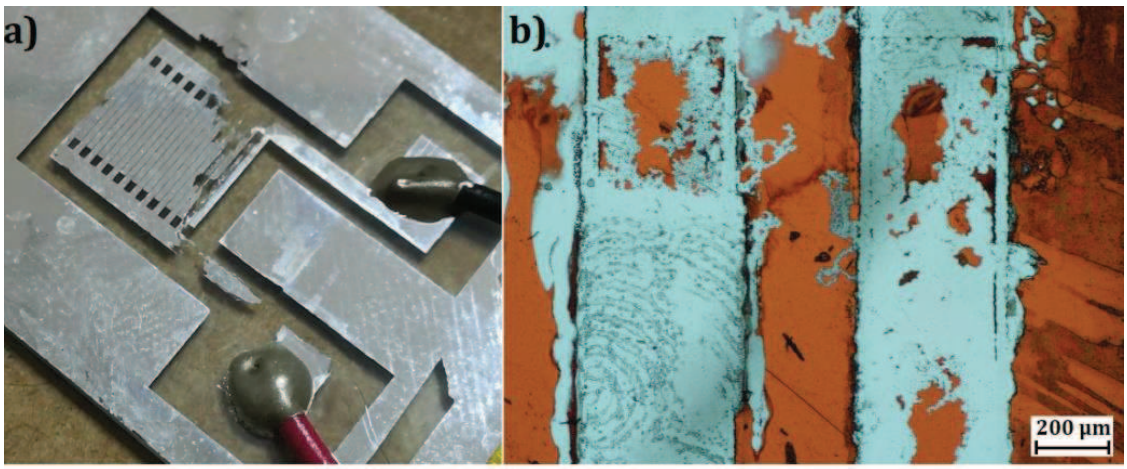


Figura 4.5: a) Fotografía de un circuito electroestimulador tras una reacción electroquímica y b) fotografía ampliada del circuito

El circuito que se muestra en la figura 4.5a es uno de los primeros diseños que se fabricaron y en donde se observan las consecuencias de la reacción electroquímica de los electrodos en contacto con el medio celular. El proceso ocurre en unos pocos segundos, y los daños son irrecuperables, como se observa en la figura 4.5b.

Para corregir este problema se realizaron modificaciones en la lámina de PDMS. Se observó que inicialmente la resina de los electrodos levantaba la lámina en uno de sus extremos, dificultando que el dispositivo estuviese lo suficientemente compacto. Mediante una impresora 3D se diseñó y fabricó un molde para el PDMS con un hueco a modo de receptáculo para las células y dos hendiduras para evitar la resina de los terminales del circuito (Figura 4.6).

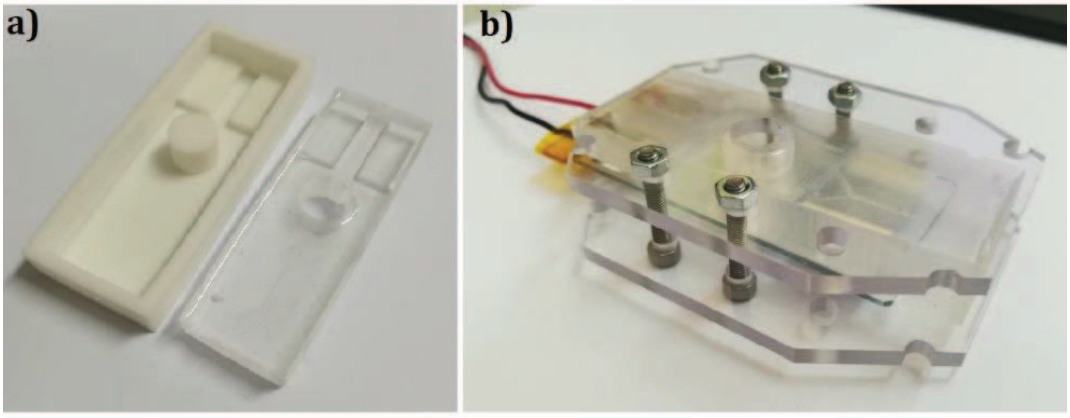


Figura 4.6: a) Fotografía del molde para el PDMS y de una muestra fabricada a partir del mismo y b) fotografía del dispositivo ensamblado

En la fotografía de la figura 4.6a se muestra el molde fabricado con una impresora 3D junto con una lámina obtenida en ese mismo molde. Los huecos de su extremo permiten que la superficie inferior de la lámina se apoye al completo sobre el sustrato de vidrio, sin presentar desniveles y permitiendo que el dispositivo mostrado en la figura 4.6b se compacte minimizando las posibles fugas de líquido celular.

Este nuevo diseño tampoco consiguió solucionar los problemas de filtrado de medio celular. Se optó por desechar la opción de sellar el recinto celular mediante un sistema de compactación y en su lugar se consideró que la opción que ofrecía más seguridad y estabilidad era la de crear un receptáculo específico a medida para las células. Para ello la pieza creada debía cumplir las siguientes condiciones:

1. Las partes de la pieza que puedan estar en contacto con el cultivo celular deben estar formadas íntegramente por materiales biocompatibles.
2. Debe tener como fondo un vidrio delgado para permitir la penetración del campo electrostático.
3. Debe poder cubrirse para evitar la contaminación del cultivo, pero sin sellar por completo el recinto para permitir el flujo de oxígeno.

Los modelos presentados hasta el momento cumplían las dos primeras condiciones, y eran lo suficientemente pequeños como para caber en el

interior de una placa de cultivo, cumpliendo el punto 3. Ante estas restricciones se fabricaron dos nuevos diseños con la idea de adherir una pieza sin fondo a la lámina de vidrio. Las soluciones presentadas se basaban en el uso de metacrilato, un adhesivo biocompatible[8], para pegar al vidrio a una estructura de plástico en donde se ubicaría el cultivo:

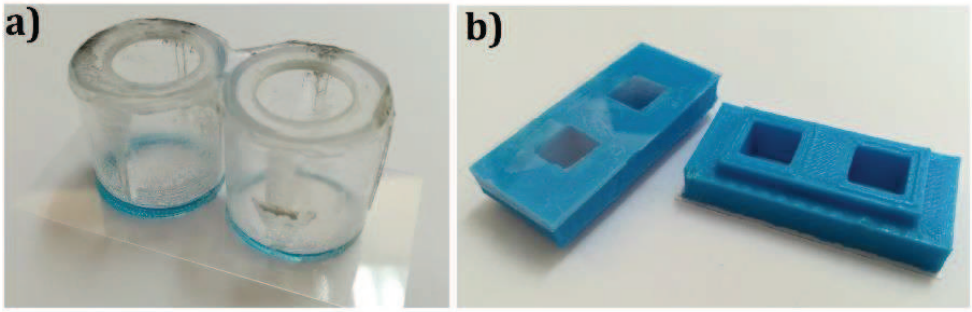


Figura 4.7: Fotografía de una lámina de vidrio ahderida a a) una estructura de dos cilindros de plástico y b) una estructura fabricada mediante impresión 3D

La fotografía presentada en la imagen 4.7a muestra la primera solución propuesta usando un adhesivo de metacrilato. El nuevo modelo sequía perdiendo parte del líquido contenido, en parte a que las rugosidades del borde del cilindro presentaban irregularidades por las que escapaba el medio celular. La segunda solución propuesta se muestra en la figura 4.7b, que mejora el modelo anterior mediante un molde fabricado con impresión 3D con mucha más superficie de adherencia para asegurar un mejor sellado. El nuevo modelo es el que mejor resultados ofrecía de todos los probados pero seguía sin evitar a la perfección el filtrado de líquido.

La solución final consistió en buscar receptáculos alternativos para el cultivo celular que cumpliesen los tres requisitos ya mencionados y que asegurasen un sistema estable sin ningún riesgo de fuga. Para el cultivo celular se usaron unas placas prefabricadas de la casa Eppendorf con una base de vidrio de 145 μm y una superficie tratada para cultivos celulares (figura 4.8):

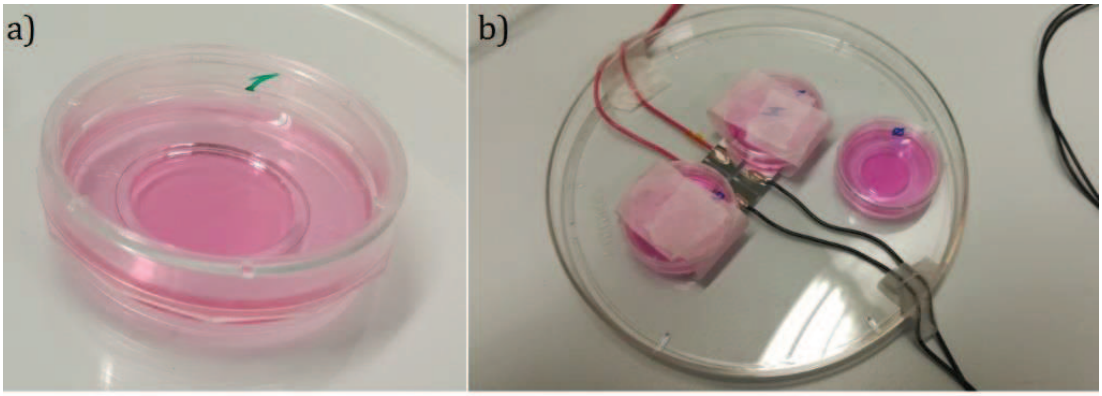


Figura 4.8: a) Fotografía de una placa de cultivo con fondo de vidrio, b) Montaje con placas de cultivo montadas sobre el circuito electroestimulador

La figura 4.8a muestra una de las placas usadas para el cultivo celular. Estas placas presentan un fondo de vidrio de 145 µm en una superficie circular de 18 mm de diámetro. Las placas se colocan directamente sobre la superficie del circuito electroestimulador, ofreciendo la posibilidad de aplicar un estímulo eléctrico a hasta dos placas por cada circuito. En la figura 4.8b se muestran dos placas colocadas sobre un circuito electroestimulador junto a una tercera placa que hará de control.

Tanto las placas como el circuito electroestimulador se introducen en la cámara de cultivo durante el tiempo en el que se aplica el cultivo celular. Los cables de tensión se sacan de la cámara y se conectan al generador, el cual a su vez está conectado a un ordenador donde un software creado en LabVIEW será responsable de controlar la señal eléctrica.

4.3-SOFTWARE GENERADOR DE SEÑALES

Para producir la estimulación se ha creado un software mediante LabVIEW encargado de controlar la señal eléctrica aplicada al circuito. El programa controla directamente el generador NI USB-6501 y cada una de sus salidas, las cuales aplican una señal de 5 V de potencial.

El software ha sido diseñado para generar una señal cuadrada, de frecuencia y duración de pulso variable, ambos parámetros a elección del usuario. Un tercer parámetro a elegir será el tiempo total en el que el generador aplique la señal diseñada.

La estructura del código se basa en una comunicación directa con el generador de National Instruments, conectado al PC vía USB. El generador por defecto carece de un reloj interno que permita desarrollar una señal cuadrada con la introducción de unos pocos parámetros, únicamente se limita a generar valores de tensión de 5 V en los puertos de salida en los que se le ordena. El programa creado en LabVIEW se conecta al generador abriendo comunicación directa con uno de sus puertos de salida mientras que paralelamente otra parte del código simula un reloj interno de frecuencia y duración variable. Durante el tiempo que dura la ejecución del programa ambas partes del código se sincronizan para que la salida de tensión del generador alterne valores de 5 y 0 V con la misma forma y frecuencia que la de la señal simulada por la segunda parte del código. Debido a las limitaciones temporales del programa para ejecutar y reiniciar su propio bucle se ha comprobado que la señal cuadrada generada sólo puede alcanzar como máximo frecuencias de aproximadamente 400 Hz.

Una primera versión del panel frontal del programa puede verse en la figura 4.9.

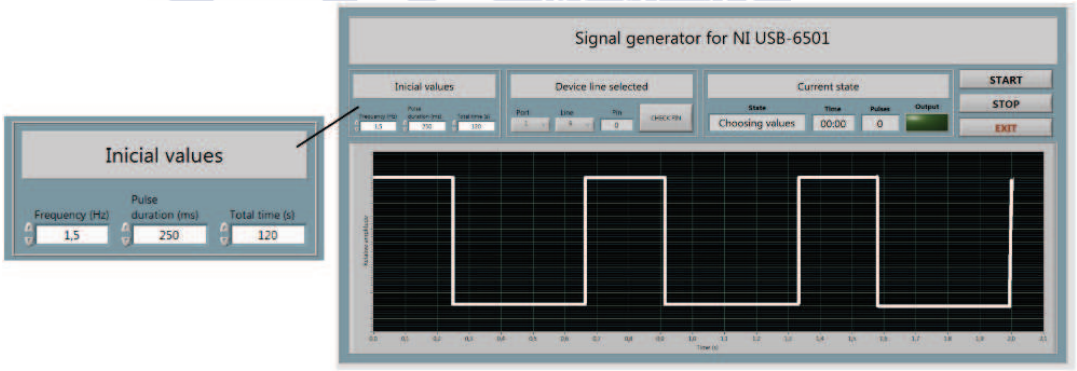


Figura 4.9: Panel frontal del software generador de señales

La imagen del panel frontal mostrada en la figura 4.9 muestra la primera versión del software generador de señales creado en LabVIEW. En el primer panel el programa permite configurar la forma de la señal mediante el ajuste de los parámetros **Frequency (Hz)** y **Pulse duration (ns)** durante un tiempo fijado en **Total time (s)**. En otro panel situado a su derecha están colocadas dos pestañas ampliables que permiten elegir entre el puerto de salida por donde se emitirá la señal. Una vez

fijados los parámetros el programa ofrece una vista previa de la forma de la señal y, tras una confirmación final del usuario, inicia el proceso durante el tiempo establecido. La señal se ejecutará periódicamente de acuerdo con el patrón indicado alternando valores de 5 y 0 V.

A partir de la base de este programa se ha ampliado el código para generar un segundo y definitivo programa que funcione de la misma forma que el anterior pero con la posibilidad de conectarse con varios puertos a la vez y generar hasta seis señales diferentes, una en cada terminal de salida, que se ejecuten de forma simultánea. El panel frontal de esta versión se muestra en la figura 4.10.

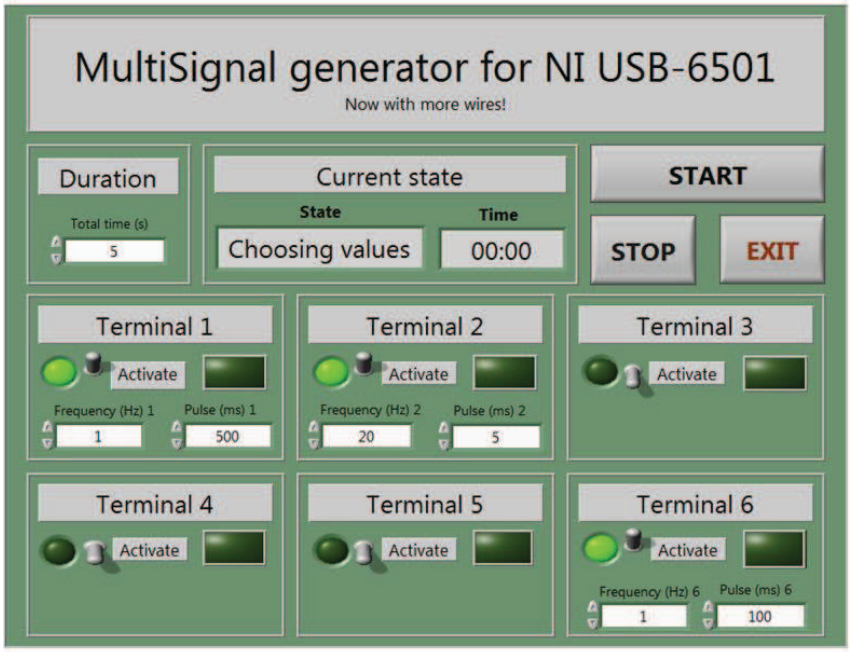


Figura 4.10: Panel frontal del software generador de señales mejorado

El panel frontal de la versión final del software mostrado en la figura 4.10 permite activar hasta seis terminales diferentes, cada uno relacionado con un puerto de salida del NI USB-6501 diferente. Para cada uno de los puertos el programa permite seleccionar una frecuencia y una duración de pulso determinadas.

La estructura del programa es la misma que en la versión anterior pero extrapolada a más terminales de salida. Por un lado, el programa se conecta con el generador e inicia la comunicación con los puertos

seleccionados por el usuario. Paralelamente otro conjunto de estructuras simula hasta un máximo de seis relojes internos, cada uno con su propio ritmo predefinido de forma que durante la ejecución del programa cada uno de estos relojes se sincronice con su puerto de salida asociado. Como resultado se obtienen hasta seis señales cuadradas, cada una con su propia frecuencia y duración de pulso.

Esta versión final comparte las limitaciones en frecuencias que presentaba su predecesora, siendo incapaz de superar los 400 Hz para cada salida de forma individual. Para los casos en los que las seis salidas se encuentran operativas de forma simultánea a la misma frecuencia esta limitación ocurre para 320 Hz, aproximadamente.

4.4-RESULTADOS DE LA ELECTROESTIMULACIÓN CELULAR

Para los primeros experimentos se decidió estimular el cultivo celular con el circuito que ofreciese el campo más homogéneo posible. En función de los resultados del capítulo anterior esto se consigue con un circuito formado por pistas de 100 µm de anchura separadas 100 µm. El campo que genera este circuito a partir de 5 V de diferencia de potencial tiene un valor prácticamente constante en toda la superficie del vidrio de 453 V/m.

En la primera prueba realizada se estimuló eléctricamente un cultivo celular durante 24 horas. Durante la duración del experimento se aplicó al dispositivo una señal cuadrada de 1 Hz de frecuencia con pulsos de 500 ms de duración. Paralelamente se incluyó en la cámara de cultivo una segunda muestra sin estimular a modo de control. En ambos pocillos se sembró una cantidad aproximada de 30,000 células. Las imágenes obtenidas se muestran en la siguiente figura.

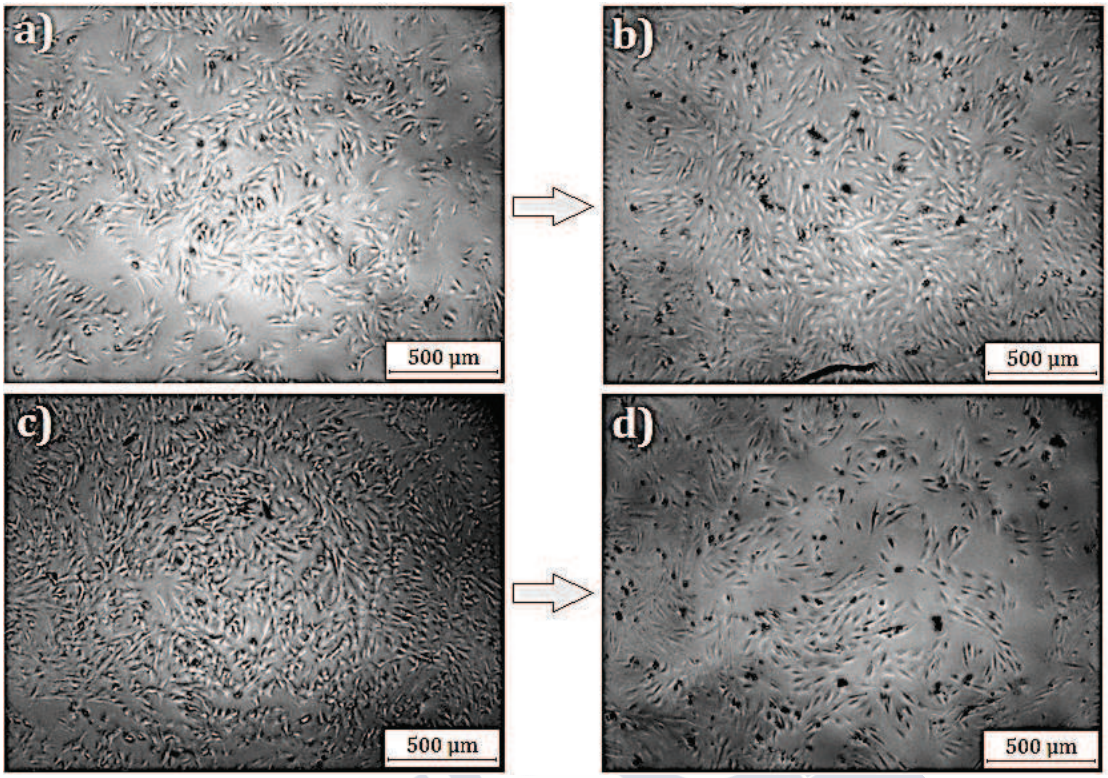


Figura 4.11: Cultivo celular estimulado a) antes del experimento y b) 24 horas después. Cultivo de control c) antes del experimento y d) 24 horas después

La figura 4.11 muestra cuatro imágenes tomadas con el microscopio óptico del cultivo celular. Las imágenes 4.11a y 4.11b muestran respectivamente fotografías del cultivo celular estimulado por el dispositivo antes y después del experimento. A simple vista no se aprecia ningún fenómeno producido por el campo eléctrico. La densidad superficial de células se mantiene constante y su orientación no sigue ningún patrón. En las figuras 4.11c y 4.11d se muestra el cultivo celular de la placa de control antes y después de realizar el experimento. Esta placa no ha sido expuesta a ningún campo eléctrico y tras 24 horas el único cambio aparente es una disminución de la cantidad de células.

Este primer experimento no ha ofrecido ningún resultado concluyente más allá de la aparente diferencia en la densidad de células tras 24 horas. Se decide repetir el experimento con la misma configuración de circuito

estimulando esta vez 4 cultivos celulares simultáneos a diferentes frecuencias usando los parámetros que se detallan en la tabla 4.1:

Tabla 4.1: Parámetros del experimento de estimulación celular

	Frecuencia (Hz)	Duración de pulso (ms)
Muestra 1	Señal continua	-
Muestra 2	1	500
Muestra 3	2	250
Muestra 4	10	50

Junto a estas cuatro muestras se depositará una quinta placa de cultivo a modo de control. Se sigue el protocolo habitual donde las muestras se colocan sobre el circuito electroestimulador y se introducen en la cámara de cultivo. Se configuran los parámetros del programa para inducir una señal diferente en cada muestra y se mantiene el estímulo durante 24 horas. En cada una de las placas se siembra una cantidad aproximada de 30.000 células.

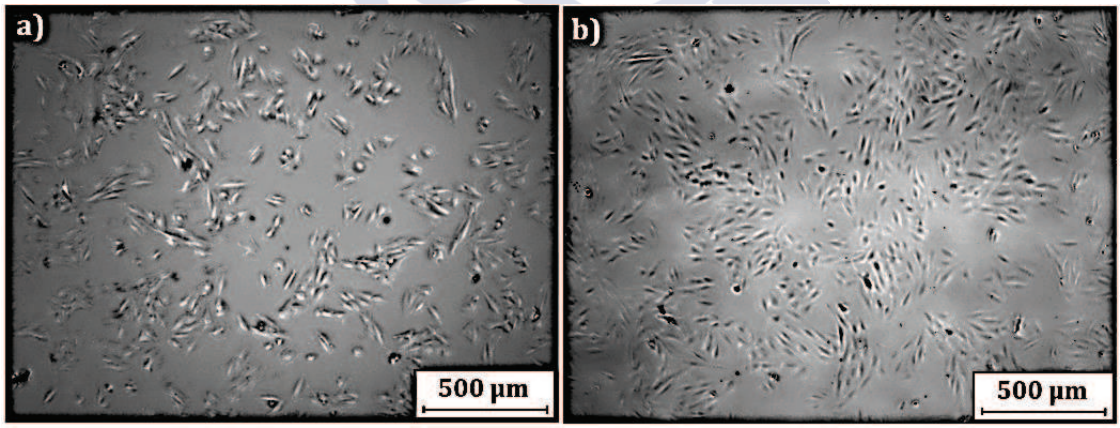


Figura 4.12: Muestra 1 a) antes del experimento y b) después del experimento

La primera de las muestras (figura 4.12), cuyo estímulo ha sido una señal continua, presenta un aparente incremento en la densidad de células después de la exposición al campo.

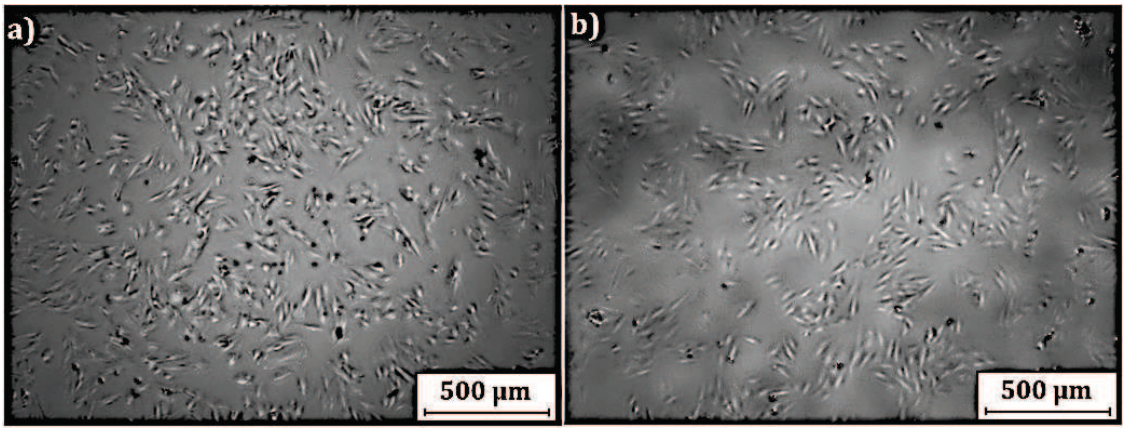


Figura 4.13: Muestra 2 a) antes del experimento y b) después del experimento

Las imágenes de la figura 4.13 muestran el cultivo celular de la placa 2 antes y después del experimento. Este cultivo ha sido estimulado con una frecuencia de 1Hz. Observando ambas imágenes no se aprecian diferencias en cuanto a la cantidad o al estado de las células.

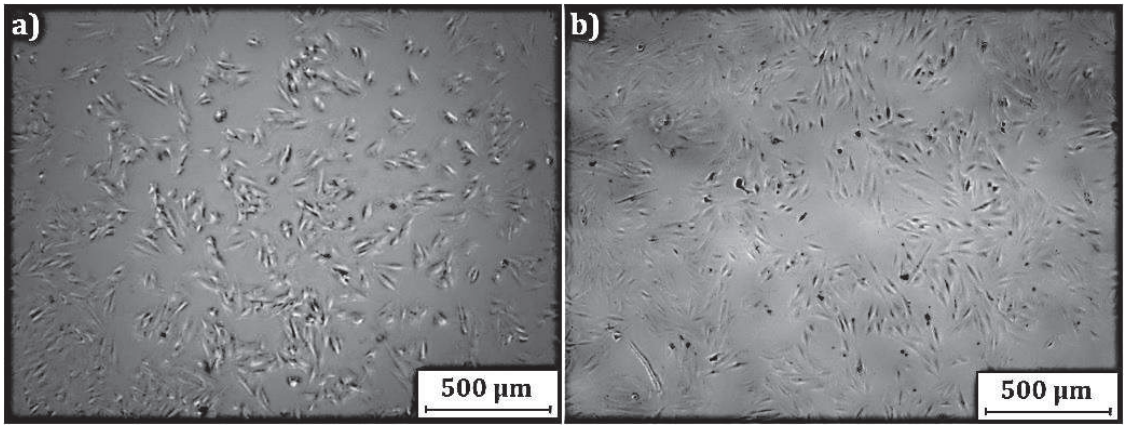


Figura 4.14: Muestra 3 a) antes del experimento y b) después del experimento

En la figura 4.14 se observa el cultivo celular de la muestra 3 antes y después del experimento, estimulado con una frecuencia de 2 Hz. No se aprecian diferencias significativas entre ambas imágenes, manteniéndose aproximadamente constante el número de células.

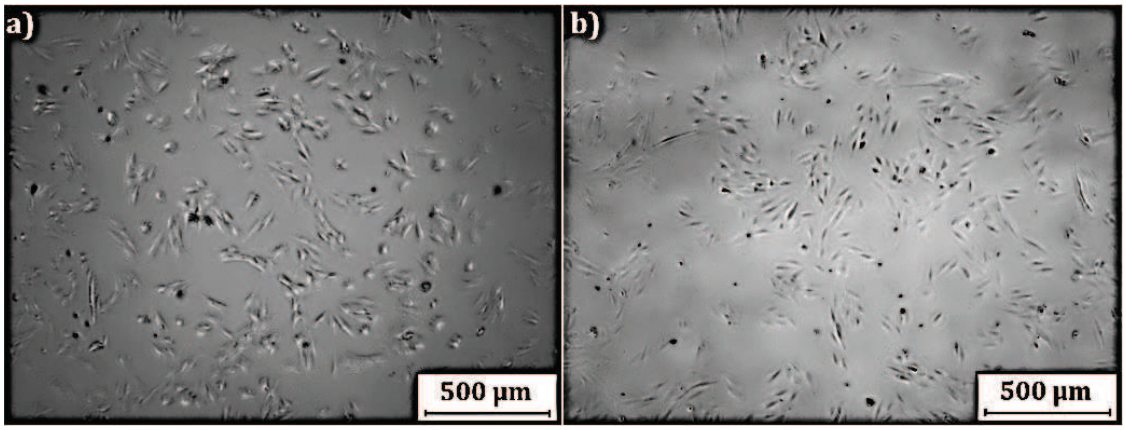


Figura 4.15: Muestra 4 a) antes del experimento y b) después del experimento

La cuarta y última muestra (figura 4.15) ha sido estimulada a mayor frecuencia, 10 Hz, y a primera vista tampoco se observan cambios en el cultivo. La última imagen (figura 4.16) corresponde al control:

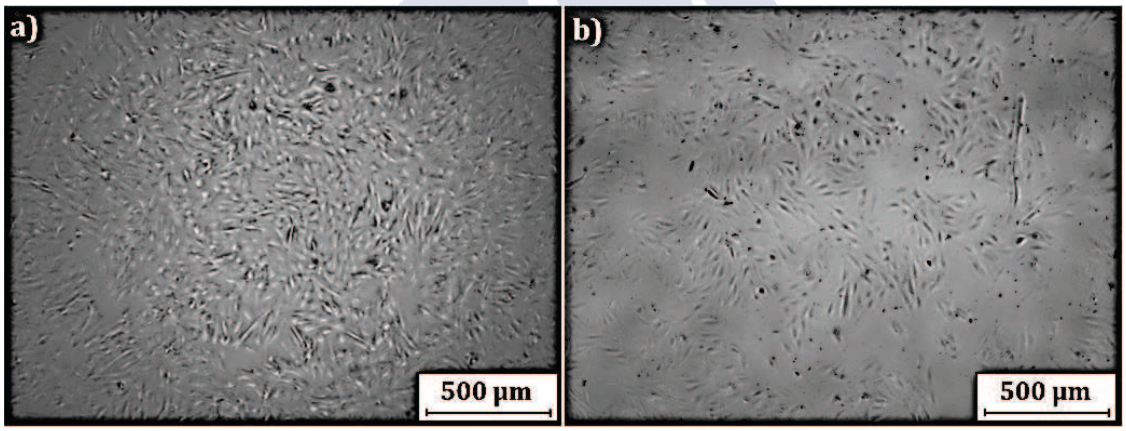


Figura 4.16: Muestra de control a) antes del experimento y b) después 24 horas

En las imágenes de la figura 4.16 de la muestra de control se intuye únicamente un descenso en la cantidad de células tras una diferencia de 24 horas. En resumen, las imágenes obtenidas con este experimento no muestran conclusiones sólidas, pero de la observación de las células antes y después del experimento se puede recopilar la siguiente información:

- En ninguno de los experimentos se observan efectos de reorientación o desplazamientos celulares.

- El único parámetro que presenta una variación que llama la atención es la densidad de células. Esta parece aumentar para el estímulo continuo y disminuir para la muestra de control. Para las muestras con señales de 1, 2 y 10 Hz, la densidad no varía aparentemente.
- No se aprecia ninguna diferencia en el rango de frecuencias estudiado.

Las conclusiones que se extraen de este experimento presentan poca solidez. Puesto que se intuye que existe un incremento en la cantidad de células para una señal continua tras 24 horas de exposición se repite el experimento para tiempos de exposición de 48 y 72 horas. Se prepararán cuatro placas para exponerlas al campo eléctrico, dos de ellas durante 48 horas y otras dos durante 72. En cada tiempo se aplicará una señal continua a una de las muestras y una señal cuadrada de 1 Hz de frecuencia a la segunda. En cada placa la cantidad de células sembradas será de aproximadamente 30.000.

En la figura 4.17 se muestran los resultados de la exposición del cultivo celular al campo eléctrico durante 48 horas. Las figuras 4.17a y 4.17b muestra el estado del cultivo celular antes y después del experimento para una señal continua. En las figuras 4.17c y 4.17d se muestran las imágenes del cultivo celular antes y después del experimento para una señal cuadrada de 1Hz de frecuencia y 500 ms de duración de pulso. Finalmente, las figuras 4.17e y 4.17f muestran el estado del cultivo de control al comienzo del experimento y 48 horas después. De las imágenes mostradas en la figura 4.17 se observa que en el cultivo estimulado con la señal continua el número de células parece aumentar. También se intuye un aumento mucho más ligero en el cultivo con la señal cuadrada dónde, aunque la densidad celular es similar antes y después del experimento, parece que la población de células es mayor tras 48 horas de exposición. Por último, se observa que en el caso del cultivo de control la densidad de células parece ser constante, sin haber ningún tipo aparente de proliferación.

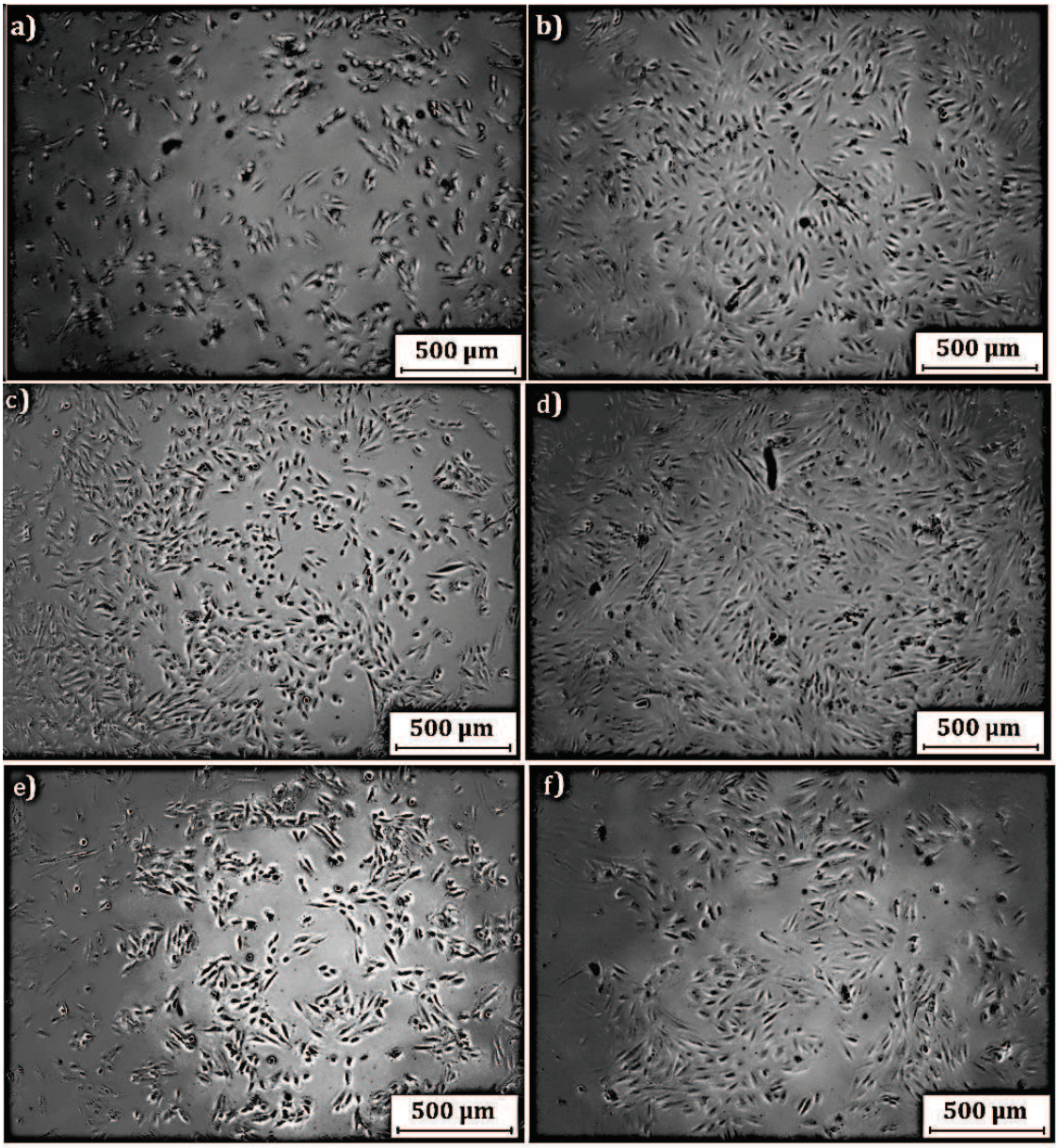


Figura 4.17: Resultados de la exposición con una señal continua a) antes del estímulo y b) después de 48 horas. Exposición con una señal cuadrada de 1 Hz c) antes del estímulo y d) después de 48 horas. Muestra de control e) antes del experimento y f) tras 48 horas.

La figura 4.18 muestra los resultados de la estimulación celular en un período de 72 horas de exposición al campo eléctrico. Las imágenes 4.18a y 4.18b muestran respectivamente los resultados de la estimulación antes y después de la exposición para una señal continua. En las figuras 4.18c y 4.18d se muestran los resultados antes y después

de 72 horas de la estimulación con la señal cuadrada, mientras que las imágenes 4.18e y 4.18f muestran las células de la placa de control antes del experimento y pasadas 72 horas.

Las imágenes más llamativas de la figura 4.18 son las correspondientes al cultivo con el estímulo eléctrico continuo. Se observa una gran proliferación en el número de células entre las figuras 4.18a y 4.18b. En el segundo cultivo, de señal cuadrada, se aprecia un incremento mucho menos pronunciado en la densidad de células. Finalmente, en la placa de control se intuye un incremento mucho más ligero en el número de células tras 72 horas.

Las conclusiones que se pueden extraer de estos últimos experimentos es que todo parece indicar que existe una proliferación de células inducida por el campo electrostático que aumenta con el tiempo de exposición y que es más pronunciada cuando aplicamos una señal continua. Para dar validez y reforzar la solidez de estas conclusiones es necesario un recuento real del incremento de la población celular que permita avalar estas afirmaciones con resultados numéricos. La forma de obtener un recuento de la cantidad de células por unidad de área es a través de un programa capaz de localizar las células individualmente y contar el número total a partir de una imagen.

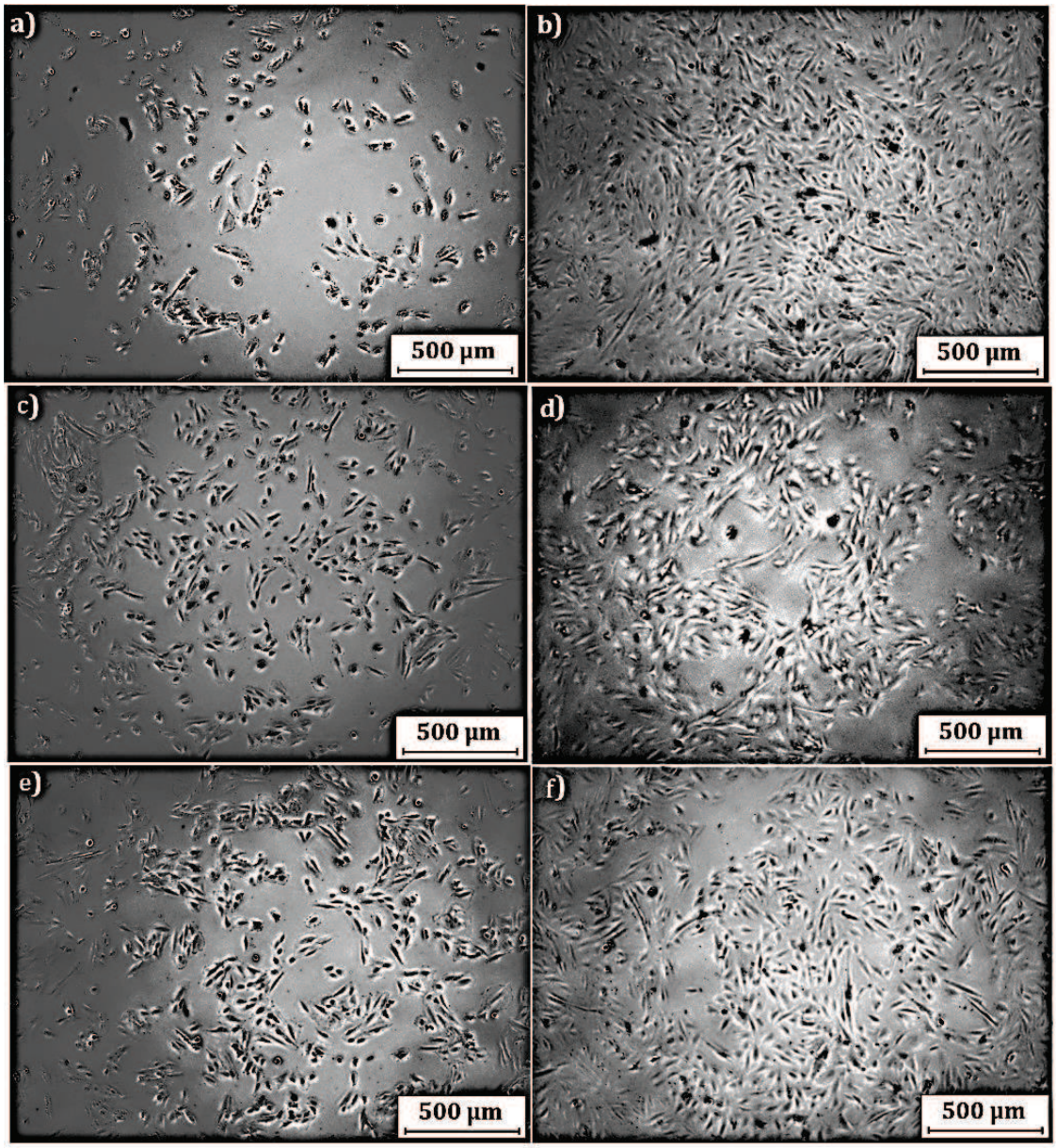


Figura 4.18: Resultados de la exposición con una señal continua a) antes del estímulo y b) después de 72 horas. Exposición con una señal cuadrada de 1 Hz c) antes del estímulo y d) después de 72 horas. Muestra de control e) antes del experimento y f) tras 72 horas.

Las imágenes mostradas hasta ahora no pueden ser fácilmente procesadas para contar las células que aparecen en cada una de las fotografías debido a las dificultades del programa para distinguir una célula de otra o incluso diferenciarlas de una mancha o cualquier otro elemento. La solución pasa por añadir al cultivo un marcador celular

fluorescente que será absorbido por el núcleo, de forma que al usar un microscopio de fluorescencia se pueda excitar al cultivo con la longitud de onda de excitación y obtener una imagen de los núcleos celulares cuyas moléculas reemiten la luz absorbida en la banda de fluorescencia.

Las imágenes obtenidas de este modo ser fácilmente procesadas por un programa de detección de partículas. En la imagen 4.19 se muestra una imagen obtenida de esta manera y procesada con el software ImageJ:

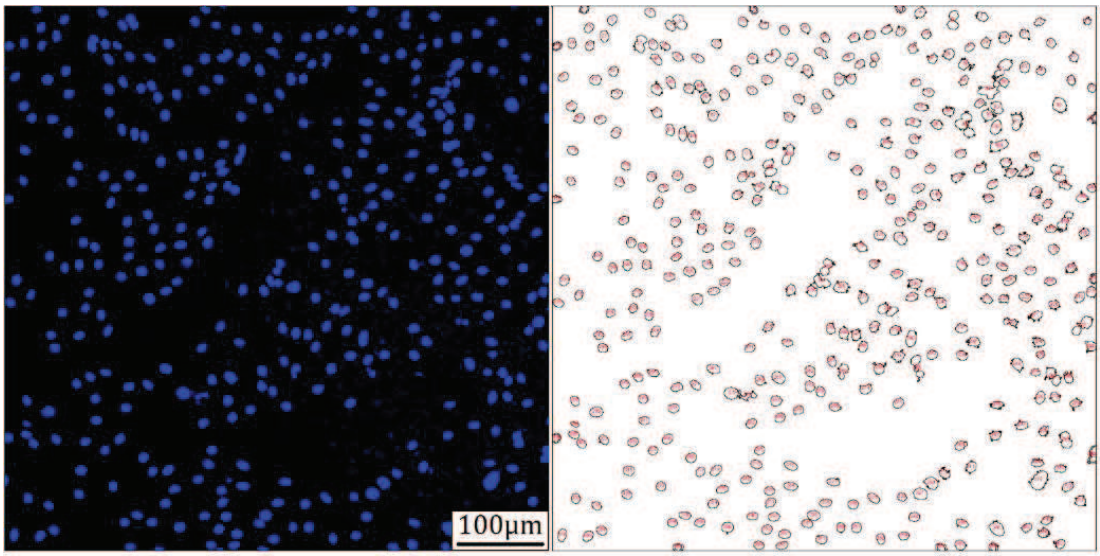


Figura 4.19: a) Imagen de un cultivo celular obtenida con un microscopio de fluorescencia y b) imagen procesada mediante el software ImageJ.

La imagen 4.19a muestra una fotografía obtenida con el microscopio confocal de fluorescencia de cultivo celular al que se le ha aplicado el marcador fluorescente DAPI. En la imagen 4.19b se muestra la misma imagen procesada con el ImageJ. Para procesarla se ha restringido la detección de partículas a cuerpos con un tamaño de al menos 50 píxeles de superficie y con una circularidad de al menos 0.30. Del recuento resultante obtenemos la densidad de células por mm^2.

En el siguiente experimento usaremos una geometría de circuito diferente al de los experimentos anteriores. La configuración elegida consta de pistas de 3000 µm de anchura con una separación de 20 µm. El motivo es que esta geometría produce campos de mayor intensidad

en zonas muy localizadas, mientras que su valor mínimo se ajusta a la intensidad aplicada en los experimentos anteriores (figura 4.20).

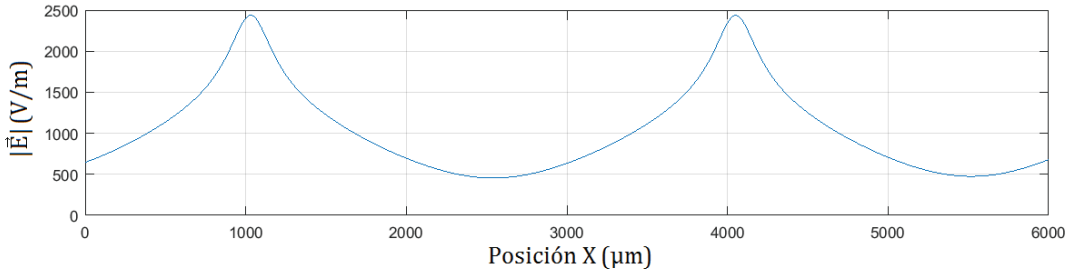


Figura 4.20: Campo eléctrico generado por un circuito con pistas de 3000 µm de anchura separadas 20 µm

En la figura 4.20 se muestra el campo eléctrico producido en la superficie de las placas de cultivo a lo largo de la dirección perpendicular a las pistas. El campo alterna regiones con valores de hasta 2437 V/m mientras que su valor mínimo es de 455 V/m. Mientras que en experimento anterior usábamos un campo homogéneo con un valor de 453 V/m ahora usaremos una configuración donde la región de mínima intensidad del campo tiene prácticamente el mismo valor que el campo inducido por el circuito anterior, pero con regiones donde la intensidad aumenta hasta a cinco veces su valor.

Con esta nueva configuración estimularemos seis placas de cultivo celular con una señal continua. Dos de las placas recibirán el estímulo durante 24 horas, otras dos lo recibirán durante 48 horas y las dos últimas durante 72 horas. Junto a ellas se preparan las correspondientes placas de control. Tras realizar la estimulación celular obtenemos en cada placa una matriz de 4 x 3 imágenes del centro de cada placa, cubriendo una superficie aproximada de 12 mm^2. Las imágenes se procesan mediante el software ImageJ obteniendo en cada caso el número de células por unidad de superficie. La densidad celular para cada uno de los tiempos de exposición se muestra en la figura 4.21.

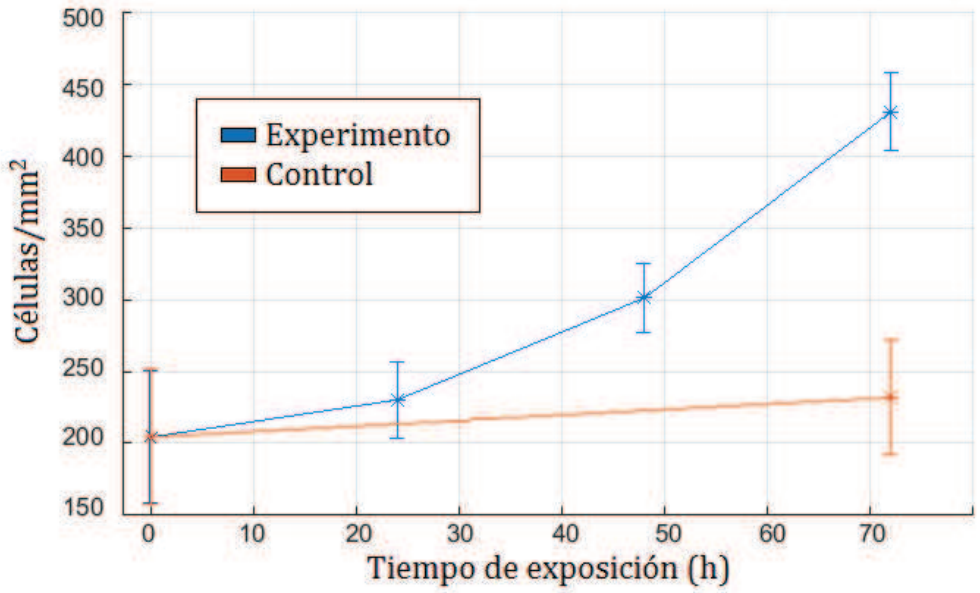


Figura 4.21: Densidad superficial de células en una placa de cultivo tras una estimulación eléctrica continua de 24, 48 y 72 horas

La figura 4.21 muestra el resultado de la electroestimulación celular para el campo eléctrico descrito en la figura 4.20 en función de la densidad superficial de células. Se observa una tendencia creciente en el número de células para las placas estimuladas eléctricamente con el paso del tiempo, donde tras 72 horas de exposición al campo se ha duplicado el número de células por mm^2. En los pocillos de control, sin embargo, la cantidad de células se mantiene prácticamente constante.

En resumen, los experimentos muestran que la exposición continua a un campo electrostático con un valor entre 455 y 2437 V/m de un cultivo de células H9c2 en medio DMEM sin suero promueven una proliferación en la cantidad de las células que aumenta con el paso del tiempo para exposiciones de hasta 72 horas. Se ha comprobado que en los cultivos celulares en las mismas condiciones y privados del estímulo eléctrico no se produce proliferación celular, demostrando que este aumento es únicamente consecuencia de la aplicación de un campo electrostático continuo.

REFERENCIAS

[1] A. Mata, A. J. Fleischman, and S. Roy, "Characterization of Polydimethylsiloxane (PDMS) Properties for Biomedical Micro/Nanosystems," *Biomed. Microdevices*, vol. 7, no. 4, pp. 281–293, 2005.

[2] D. Tie, F. Feyerabend, N. Hort, R. Willumeit, and D. Hoeche, "XPS studies of magnesium surfaces after exposure to Dulbecco's modified eagle medium, Hank's buffered salt solution, and simulated body fluid," *Adv. Eng. Mater.*, vol. 12, no. 12, pp. 699–704, 2010.

[3] M. J. Coelho, A. T. Cabral, and M. H. Fernandes, "Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in α-MEM and in DMEM," *Biomaterials*, vol. 21, no. 11, pp. 1087–1094, 2000.

[4] N. A. Muraleva, N. G. Kolosova, and N. A. Stefanova, "p38 MAPK–dependent alphaB-crystallin phosphorylation in Alzheimer's disease–like pathology in OXYS rats," *Exp. Gerontol.*, vol. 119, no. December 2018, pp. 45–52, 2019.

[5] X. Y. Xu *et al.*, "Role of the P2X7 receptor in inflammation-mediated changes in the osteogenesis of periodontal ligament stem cells," *Cell Death Dis.*, vol. 10, no. 1, 2019.

[6] Q. Wang, S. Zhong, Y. Xie, Z. Zhang, and G. Yang, "Electrochemical Reactions During Constant DC Current Stimulation: An In Vitro Experiment with Cultured Rat Calvarial Cells," *Electro- and Magnetobiology*, vol. 14, no. 1, pp. 31–40, 1995.

[7] J. Degner, F. Singer, L. Cordero, A. R. Boccaccini, and S. Virtanen, "Electrochemical investigations of magnesium in DMEM with biodegradable polycaprolactone coating as corrosion barrier," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 282, pp. 264–270, 2013.

[8] N. B. Bauer *et al.*, "Biodegradable β-Tri-Calciumphosphate/hydroxyethyl methacrylate enhanced three component bone adhesive demonstrates biocompatibility without evidence of systemic toxicity in a rabbit model," *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, vol. 90B, no. 2, pp. 767–777, 2009.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CONCLUSIONES

En esta tesis se ha presentado el proceso completo de fabricación de un dispositivo electroestimulador celular. La fabricación del circuito se ha realizado combinando técnicas de deposición por vaporización física para la obtención de capas de aluminio sobre un sustrato de vidrio con técnicas de ablación láser. La geometría del circuito se ha diseñado en base a un conjunto de simulaciones realizadas con el software COMSOL Multiphysics 5.2a en donde se obtuvo el campo electrostático generado por el circuito sobre la superficie de un vidrio delgado. Tras su fabricación se ha validado el circuito mediante la estimulación eléctrica de cultivos de cardiomioblastos de rata (células H9c2) demostrando experimentalmente que la presencia del estímulo electrostático continuo durante exposiciones de larga duración induce una proliferación en la cantidad de células. Las conclusiones de este trabajo se desarrollan a continuación:

- Mediante las técnicas de deposición por vaporización física y deposición por pulsos láser se han obtenido capas de aluminio delgadas sobre un sustrato de vidrio. Se ha justificado la elección de la técnica del PVD como la más adecuada para este trabajo por su mayor control sobre el espesor de la capa y sobre la homogeneidad del resultado final. Con la técnica del PVD se han generado capas de 200 nm de espesor sobre un sustrato de vidrio y se han caracterizado usando un microscopio óptico y un microscopio de electrones. Se ha aplicado un tratamiento térmico a las capas fabricadas y se ha demostrado que este tratamiento mejora la calidad de la capa y aumenta su conductividad eléctrica, obteniéndose valores de conductividad de $2{,}50 \times 10^5$ S/cm para las capas tratadas térmicamente y de $2{,}27 \times 10^5$ S/cm para las que no.

- Usando el software COMSOL Multiphysics 5.2a se ha creado un modelo bidimensional del sistema experimental para obtener el valor del campo eléctrico generado sobre la superficie de un vidrio delgado por circuitos de diferentes geometrías. Se han realizado simulaciones para comprobar la influencia del material, el espesor de la capa y la anchura y la separación de las pistas. Se ha comprobado que entre la plata, el cobre y el aluminio no hay diferencia apreciable en los resultados. Se ha estudiado la influencia del espesor de la capa en un rango de 100 nm a 10 µm y se ha comprobado que su influencia es despreciable. Finalmente se ha estudiado la influencia de la anchura y la separación de las pistas para un rango de anchuras de 20 a 5000 µm y separaciones de 20 a 500 µm. Se han mostrado los resultados en función del valor máximo y de la homogeneidad del perfil del campo eléctrico generado. Se ha concluido que las pistas con 100 µm de ancho y otras 100 µm de separación son las que proveen el campo más homogéneo posible. Otras configuraciones presentan igual interés en función de la intensidad de campo que se desee alcanzar.

- Durante la etapa de fabricación mediante ablación láser se ha buscado el conjunto de parámetros óptimo para conseguir el marcado de mayor calidad sobre las capas de aluminio de 200 nm. Con el láser de nanosegundos se ha parametrizado en función de la fluencia, la frecuencia de pulsos y la velocidad de movimiento del haz, concluyéndose que la mejor configuración se encuentra para una fluencia de 9,08 J/cm^2, una frecuencia de pulsos de 12 kHz y una velocidad de barrido de 60 mm/s. Con esta configuración se pueden obtener canales de 29,66 ± 0,59 µm de anchura. Del mismo modo se ha realizado el proceso de parametrización para un láser de femtosegundo en función de la fluencia del haz y de la velocidad de movimiento de la muestra, llegando a la conclusión de que el mejor resultado se consigue con una fluencia de 1,69 J/cm^2 a una velocidad de 100 µm/s, con lo que se consiguen canales de 10,29 ± 0,16 µm de anchura. Comparando los resultados de ambos láseres se ha llegado a la conclusión de que los resultados obtenidos con el láser de

femtosegundos presentan mejor calidad, pero el tiempo necesario para procesar la pieza es demasiado alto, de unas 50 horas estimadas. Por el contrario el resultado del marcado con láser de nanosegundos ofrece un acabo de calidad suficiente con un tiempo de procesado de unos 17 minutos.

- Para la aplicación de la señal eléctrica al circuito se ha contado con un generador de señales de National Instruments. El control y la generación de la señal se ha llevado a cabo con un programa creado en LabVIEW que permite la creación de una señal cuadrada de frecuencia y duración de pulso a elegir por el usuario, con una salida de hasta seis señales diferentes para la realización de varios experimentos simultáneos. Debido a las limitaciones del programa la frecuencia máxima permitida para la señal de salida es de 400 Hz.

- El encapsulado del dispositivo final se ha realizado fabricando una lámina de PDMS y procesando dos láminas delgadas de policarbonato. El resultado no conseguía evitar que el medio celular se filtrase al circuito, provocando una grave corrosión debido a reacciones electroquímicas. En consecuencia se han testeado diferentes métodos de encapsulamiento sin que ninguno de ellos resolviese el problema de forma satisfactoria. Finalmente se han utilizado unos pocillos especiales de fondo de vidrio para sembrar el cultivo celular.

- Se han realizado unas primeras estimulaciones sobre un cultivo de células H9c2 con un circuito de 100 µm de ancho y 100 µm de separación que inducía un campo plano de 453 V/m. Con esta configuración se han estimulado cultivos celulares con señales de 1 Hz, 2 Hz y 10 Hz y otra continua durante 24 horas. Mediante la observación de los resultados con un microscopio óptico se ha intuido una proliferación celular en el caso de la señal continua. Se ha repetido la estimulación para exposiciones de 48 y 72 horas y los resultados muestran un aparente aumento en el número de células relacionado con el tiempo de exposición.

- Para contrastar los resultados obtenidos con datos numéricos se han repetido los experimentos usando un marcador DAPI para obtener imágenes de fluorescencia del cultivo celular. Se ha cambiado la configuración del circuito por uno de 3000 μm de anchura de pista con una separación de 20 μm que provee un campo electrostático con valores máximos y mínimos de 2473 y 455 V/m respectivamente. Se han estimulado cultivos celulares con una señal continua durante 24, 48 y 72 horas y se han obtenido imágenes del cultivo mediante un microscopio de fluorescencia. Las imágenes han sido procesadas usando la aplicación de recuento de partículas del software ImageJ. Los resultados numéricos muestran un aumento en la proliferación de células debido al estímulo eléctrico que aumenta con el tiempo de exposición. Se han comparado los resultados con las muestras de control y estos últimos no presentaron ningún tipo de proliferación, demostrando que la exposición al campo electrostático inducido por el dispositivo electroestimulador aumenta la cantidad de células en el cultivo.

Con el dispositivo fabricado se ha logrado aumentar la cantidad de células H9c2 para un estímulo eléctrico continuo durante 72 horas. De cara a continuar esta línea de investigación sería interesante estudiar este efecto para diferentes condiciones. En primer lugar, sería interesante observar la influencia de la intensidad del campo en el incremento en la cantidad de células, buscando si existe un valor máximo del campo a partir del cual se modifique esta tendencia. En segundo lugar sería de gran interés estudiar, para un mismo campo eléctrico, los resultados de aplicar al cultivo estímulos de diferentes frecuencias. Para un estudio satisfactorio sería necesario generar la señal eléctrica con un dispositivo que permita alcanzar frecuencias de MHz o incluso GHz. Por último, resultaría también interesante analizar la estimulación eléctrica con estas condiciones para diferentes tipos de células, estudiando los fenómenos que puedan surgir en otro tipo de cultivos.

PUBLICACIONES

A. L. Aragón, M. Cebro-Márquez, E. Pérez, A. Pazos, R. Lage, J. R. González-Juanatey, I. Moscoso, C. Bao-Varela, D. Nieto. "Laser microfabrication of a bioelectronics-on-a-chip platform for micro-scale cell stimulation". *Optics and Laser Engineering,* Estado: en revisión (Enviado el 13/08/2019)

A. L. Aragón, C. Bao-Varela, A. Fernández, E. Pérez, A. Pazos, D. Nieto "Fabrication and characterization of a cell electrostimulator device combining physical vapor deposition and laser ablation". SPIE Proceedings Volume 10453, *Third International Conference on Applications of Optics and Photonics*; 104530G (2017) DOI: 10.1117/12.2271624.

A. L. Aragón, C. Bao-Varela, A. Fernández, E. Pérez, A. Pazos, D. Nieto. "Fabrication of a Cell Electrostimulator Using Pulse Laser Deposition and Laser Selective Thin Film Removal," in *Laser Ablation - From Fundamentals to Applications*, T. E. Itina, Ed: IntechOpen, Rijeka, 2017. DOI: 10.5772/intechopen.70677.

A. Gargallo, A. I. Gómez-Varela, H. González-Núñez, T. Delgado, C. Almaguer, F. Cambronero, A. García-Sánchez, D. Pallarés, M. Aymerich, A. L. Aragón, M. T.Flores-Arias, "Spreading Optics in the primary school". *Journal of Physics: Conference Series*, vol. 605, pp. 1 - 6. 2015. DOI: 10.1088/1742-6596/605/1/012040.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

PARTICIPACIONES EN CONGRESOS

A. L. Aragón, C. Bao-Varela, E. Pérez, A. Pazos, D. Nieto, "Fabrication and characterization of a cell electrostimulator device combining physical vapor deposition and laser ablation", *III International Conference on Applications of Optics and Photonics*, 8-12 de mayo de 2017, Faro (Portugal). **Best student SPIE award.**

A. L. Aragón, C. Bao-Varela, E. Pérez, A. Pazos, D. Nieto, "Diseño y fabricación de un prototipo de electroestimulador mediante técnicas láser", *X Reunión Nacional de Optoelectrónica (Optoel 2017)*, 12-14 de julio de 2017, Santiago de Compostela (España).

D. Nieto, A. L. Aragón, C. Bao-Varela, G. O'Connor, "Laser-based microfabrication of an electroestimulator device for cardiac cell stimulation", *International Conference on Biofabrication*, 15-18 de octubre 2017, Beijing (China).

A. L. Aragón, C. Bao-Varela, D. Nieto, "Fabricación de un electroestimulador celular con aplicaciones en investigación biomédica", *XII Reunión Nacional de Óptica*, 3-6 de julio de 2018, Castellón (España).

A. L. Aragón, C. Bao-Varela, E. Pérez, A. Pazos, D. Nieto, "Estudio comparativo de la fabricación de un circuito electroestimulador mediante ablación láser con nanosegundos y femtosegundos", *XI Reunión Española de Optoelectrónica,* 3-6 de julio de 2019, Zaragoza (España).

J. Arines, C. Bao-Varela, M. Blanco. M Aymerich, A. L. Aragón, F. Cambronero, M. T. Flores-Arias, "El láser STELA (Santiago Terawatt Láser) para experimentación en los límites de la óptica no lineal", *X Iberoamerican*

Optics Meetings, XIII Latinoamerican Meetings on Optics, Lasers and Applications, 23-27 de septiembre de 2019, Cancún (México).

OTRAS CONTRIBUCIONES

F. Cambronero, A. Gargallo, A. I. Gómez-Varela, T. Delgado, C. Almaguer, A. García-Sánchez, A. L. Aragón, M. Aymerich, S. Williamson, M. T. Flores-Arias, "Spreading optics in the society", *4th EPS YM Leadership meeting*, 29 de mayo de 2015, Castelldefels (España).

A. Gargallo, A. I. Gómez-Varela, F. Cambronero, T. Delgado, M. Aymerich, A. L. Aragón, A. García-Sánchez, M. T. Flores-Arias, "Actividades divulgativas para el Año Internacional de la Luz de USC-OSA", *XI Reunión Nacional de Óptica*, 1-4 de septiembre de 2015, Salamanca (España).

A. I. Gómez-Varela, C. Bao-Varela, A. Gargallo, F. Cambronero, M. Aymerich, T. Delgado, A. L. Aragón, A. Sánchez-García, S. Williamson. M. T. Flores-Arias, "Talleres de Experimentación de Color para las Enseñanzas de Educación Primaria", *XI Congreso Nacional del Color*, 19-22 de julio de 2016, Ourense (España)

F. Cambronero, A. Gargallo, A. I. Gómez-Varela, T. Delgado, C. Almaguer, A. García-Sánchez, A. L. Aragón, M. Aymerich, S. Williamson, A. Amorín, M. T. Flores-Arias, "Spreading knowledge in photonics: overview of the USC-OSA Student Chapter", *Student Leadership Conference*, 17 de octubre, 2016, Rochester (EEUU).

M. Aymerich, F. Cambronero, A. L. Aragón, T. Delgado, A. I. Gómez-Varela, A. Gargallo, S. Williamson, A. Amorín, A. Sánchez- García, C. Bao-Varela, M. T. Flores-Arias, "The USC-OSA-EPS Section Activities in Optics", *III International Conference on Applications of Optics and Photonics*, 8-12 de mayo de 2017, Faro (Portugal).

M. Aymerich, F. Cambronero, A. L. Aragón, T. Delgado, A. I. Gómez-Varela, A. Gargallo, S. Williamson, A. Amorín, A. Sánchez- García, C. Bao-Varela, M. T. Flores-Arias, "La actividad del grupo USC-OSA-EPS Student Chapter en la divulgación de la Óptica", *X Reunión Nacional de Optoelectrónica (Optoel 2017)*, 12-14 de julio de 2017, Santiago de Compostela (España).

M. Aymerich, F. Cambronero, A. L. Aragón, Manuel Blanco, Damián Rodríguez, Adán Amorín, Sandra Williamson, Saúl López, Verónica Mieites, Carmen Bao-Varela, María Teresa Flores-Arias, "Actividades realizadas por el grupo USC-OSA USC-EPS para acercar la Óptica y la Fotónica a nuestra sociedad"*, XII Reunión Nacional de Óptica*, 3-6 de julio de 2018, Castellón (España).